

**STZ İLE İNDÜKLENMİŞ TİP 1 DİYABET SIÇANLARDA
HİDROKSİTİROZOL'ÜN TESTİKÜLER PRDX6 EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYFER GÜNGÖR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi HAKAN SOYLU

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**STZ İLE İNDÜKLENMİŞ TİP 1 DİYABET SIÇANLARDA
HİDROKSİTİROZOL'ÜN TESTİKÜLER PRDX6 EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayfer GÜNGÖR tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANSTEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Dr.Öğr.Üyesi Hakan SOYLU
Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr.Öğr.Üyesi Hakan SOYLU
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Meryem ÇAM
Arel Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR
Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 25/07/2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25/07/2023

Ayfer GÜNGÖR

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR hocama şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

25/07/2023

Ayfer GÜNGÖR



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
SİMGELER	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	3
2.1. DENEY HAYVANLARI	3
2.2. DENEY GRUPLARI.....	3
2.3. DİYABET OLUŞTURMA MODELİ	4
2.4. KULLANILAN KİMYALASAL VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI.....	5
2.4.1. Hidroksitirozolun Hazırlanması.....	5
2.4.2. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı.....	5
2.4.3. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS).....	5
2.4.4. Sitrat Tamponu	5
2.4.5. %30 Akrilamid -Bisakrilamid solüsyonu	5
2.4.6. 4x Tris- HCl/SDS (Ph :8,8) Hazırlanışı	6
2.4.7. 4x Tris -HCl/SDS (Ph :6,8) Hazırlanışı	6
2.4.8. %10'luk APS	6
2.4.9. 10x Tris Tamponlu Tuz Solüsyonu (TBS) Stok Hazırlanışı.....	6
2.4.10. TBS-Tween 20 Hazırlanışı (TBS-T)	6
2.4.11. %5'lik Yağsız Süt Tozu Hazırlanışı	6
2.4.12. Blotlama Solüsyonu Hazırlanışı.....	6
2.4.13. 5x Stok Elektrophorez Solüsyonu	6
2.4.14. 1x Elektrophorez Solüsyonu.....	7
2.5. IŞIK MİKROSKOBU İNCELEMESİ DOKULARIN HAZIRLANMASI	7
2.6. PRDX6'NIN İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYANMASI	7
2.7. SEMİ KANTİTATİF DEĞERLENDİRMELER.....	9
2.8. İMAGEJ PROGRAMI İLE İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARININ ANALİZİ.....	9
2.9. WESTERN BLOT PROTOKOLÜ.....	9
2.10. İSTATİKSEL ANALİZ	11
3. GENEL BİLGİLER	12
3.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ	12
3.1.1. Testis Embriyolojisi	12
3.1.2. Testis Histolojisi	14
3.1.2.1. Seminifer Tübüller	15
3.1.2.2. Spermatogenik hücreler	16
3.1.3. Sertoli hücreleri.....	18

3.1.4. İntertisyel Doku	20
3.2. DİABETES MELLİTUS (DM)	20
3.2.1. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması.....	21
3.2.1.1. Tip I Diabetes Mellitus (T1DM).....	21
3.2.1.2. Tip II diabetes mellitus (T2DM).....	22
3.3. DİABETES MELLİTUSUN TESTİSLE İLİŞKİSİ.....	22
3.3.1. Hidroksitirozol (HT)	24
3.3.2. Prdx6	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. BULGULAR.....	28
4.1.1. İmmünohistokimyasal bulgular	28
4.1.2. Western Blot Bulguları	33
4.2. TARTIŞMA.....	34
5. SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Skrotumdan üretraya kadar; testis, epididimis, bezler ve ductus deferens, aralarındaki komşusal ilişkiler şematik olarak gösteren şekil [18].	12
Şekil 3.2. A. Sekizinci haftada testisin enine kesiti, tunica albuginea, testis kordonları, rete testis ve primordiyal germ hücrelerini gösteriyor. B. Dördüncü ayda testis ve genital kanal.	13
Şekil 3.3. Testis anatomisi ve histolojisi, a , testisin kısmi olarak sagittal kesitinin şematik görünümü, b , seminifer tübülün enine kesiti [18].	14
Şekil 3.4. Spermatogenez ve sperm yapısı	18
Şekil 4.1. Prdx6'nın immunohistokimyasal boyamasının gruplardaki temsili mikrografları. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. Yeşil ok; spermatogonyum hücresi, kırmızı ok; Sertoli hücresi, Siyah ok; primer spermatosit, mavi ok; geç spermatid, Sarı ok; Leydig hücresi, Pembe; spermatidi göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.....	29
Şekil 4.2. Testis dokusunda Prdx6 proteinin immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı ,b ise STZ'ye göre anlamlılığı gösterir. .	30
Şekil 4.3. Kontrol grubu Prdx6 ekspresyonu. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.....	31
Şekil 4.4 HT (hidroksitirozol) grubu Prdx6 ekspresyonu. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.....	31
Şekil 4.5. STZ (streptozotosin) grubu Prdx6 ekspresyonu. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.....	32
Şekil 4.6. STZ+HT (streptozotosin+hidroksitirozol) grubu Prdx6 ekspresyonu. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.....	33
Şekil 4.7. Prdx6 protein seviyesinin Western blot analizi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı gösterir. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin.....	34

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

- Çizelge 2.1.** Hayvanlara uygulanan ajanlar, dozları ve uygulanma şekilleri ve süreleri..... 4
- Çizelge 4.1.** Kontrol, HT (hidroksitirozol), STZ (streptozotosin) and STZ+HT gruplarında Prdx6'nın semi-kantitatif dağılımı. 0: negatif; (+): zayıf pozitif; ++: pozitif; +++: yoğun pozitif; ++++: çok yoğun pozitif 28

KISALTMALAR

ADD	Amerika Diyabet Derneği
APS	Amonyum Persülfat
AMH	Anti-Müllerian Hormon
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BTB	Kan Testis Bariyeri
CYS	Cystein
DAB	Di-Amino-Benzidin
dH₂O	Distile su
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DÜDAM	Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi
EVOO	Sızma Zeytinyağı
ER	Endoplazmik Retikulum
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GDM	Gestasyonel Diabetes Mellitus
GPx	Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidrojen Klorür
HE	Hemotoksilen-Eozin Boyası
HT	Hidroksitirozol
İp	İntraperitoneal
iPLA₂	Kalsiyumdan bağımsız Fosforilaz A ₂
kDA	Kilodalton
LH	Luteinleştirici Hormon
NaOH	Sodyum Hidroksit
ONOO⁻	Peksinitrit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PLA₂	Fosforilaz A ₂
Prx	Peroksiredoksin
Prdx6	Peroksiredoksin 6
PIK	Proteaz İnhibitör Kokteyli
PVDF	Polyvinylidende Flouride
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
S	Standart
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SRY	Y komozomunun cinsiyet tanımlayıcı bölgesi
STZ	Streptozotosin
T1DM	Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
TBS	Tris tampon Salın
TBS-T	Tris tampon Salın 20
WHO	Dünya Sağlık Organizasyonu

SİMGELER

cm	Santimetre
dL	Desilitre
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
p	Anlamlılık
XY	Erkek cinsiyet Kromozomları
°C	Derece
µm	Mikrometre



ÖZET

STZ İLE İNDÜKLENMİŞ TİP 1 DİYABET SIÇANLARDA HİDROKSİTİROZOL'ÜN TESTİKÜLER PRDX6 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayfer GÜNGÖR

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU

Temmuz 2023, 44 sayfa

Diabetes mellitus, yüksek kan şekeriyle ilişkili olarak gelişen ve insülin eksikliği ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. Diyabete bağlı ortaya çıkan oksidatif stres, tüm doğurganlık sorunlarının başlangıcıdır ve spermatogenezde yer alan tüm sinyal yollarını etkilemektedir. Diabetes mellitus, erektil disfonksiyon, ejakülasyon, üreme organlarında ve semen kalitesinde değişikliklere neden olmaktadır. Hidroksitirozol, diyabete bağlı testislerde meydana gelen spermatogenik fonksiyon hasarını azaltır ve bu hasara karşı korur. Biz bu çalışmamızda testislerde meydana gelen spermatogenik fonksiyon hasarını azalttığı ve bu hasara karşı koruyucu olduğu bilinen hidroksitirozolün, spermatozoanın canlılığı, hareketliliği ve fertilizasyon yeteneğinde önemli rol alan Prdx6 proteininin ekspresyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmada 28 erkek rat kullanıldı. Ratlar kontrol (sadece salin), hidroksitirozol (30 gün boyunca intraperitoneal olarak 10 mg/kg hidroksitirozol), streptozotosin (tek doz intraperitoneal olarak 55 mg/kg streptozotosin), streptozotosin+hidroksitirozol (tek doz intraperitoneal olarak 55 mg/kg streptozotosin ve 30 gün boyunca intraperitoneal olarak 10 mg/kg hidroksitirozol) olmak üzere dört gruba ayrıldı. İmmunohistokimya ve Western blot yöntemleriyle Prdx6 proteininin ekspresyonu belirlendi. Prdx6 ekspresyonu streptozotosin grubunda kontrol ve hidroksitirozol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde artış gösterdi. Streptozotosin+hidroksitirozol grubunda ise kontrol, hidroksitirozol ve streptozotosin gruplarına göre Prdx6 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı. Sonuç olarak streptozotosin uygulaması Prdx6 ekspresyonunu artırmıştır. Ancak streptozotosin sonrası hidroksitirozol uygulaması Prdx6 ekspresyonunun düşmesine neden olmuştur. Bu bulgular bize hidroksitirozolün diyabetik testisteki koruyucu rolünü Prdx6'dan bağımsız bir şekilde yaptığını düşündürmüştür.

Anahtar Sözcükler: Diabetes Mellitus, Streptozotosin, Hidroksitirozol, Testis, Prdx6.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF HYDROXYTYROSOL ON TESTICULAR PRDX6 EXPRESSION IN STZ-INDUCED TYPE 1 DIABETES RATS

Ayfer GÜNGÖR

Düzce University

Graduate School of Education, Department of Histology and Embriyology

Master Thesis

Supervisor: Asst.Prof.Dr. Hakan SOYLU

July 2023, 44 pages

Diabetes mellitus is a metabolic disease that develops due to high blood sugar and is characterized by insulin deficiency. Oxidative stress due to diabetes is the beginning of all fertility problems and affects all signaling pathways in spermatogenesis. It causes diabetes mellitus, erectile dysfunction, ejaculation, changes in reproductive organs and semen quality. Hydroxytyrosol is a powerful natural antioxidant in olive oil. This component reduces and protects against spermatogenic function damage in testicles due to diabetes. In this study, we aimed to investigate the effect of hydroxytyrosol, which is known to reduce and protect against spermatogenic function damage in the testicles, on the expression of Prdx6 protein, which plays an important role in the viability, motility and fertilization ability of spermatozoa. Twenty eight male rats were used in the study. Rats were divided into four groups as control (saline only), hydroxytyrosol (10 mg/kg hydroxytyrosol intraperitoneally for 30 days), streptozotocin (single dose 55 mg/kg streptozotocin intraperitoneally), streptozotocin + hydroxytyrosol (single dose intraperitoneally 55 mg/kg streptozotocin and 30 days intraperitoneally 10 mg/kg hydroxytyrosol). Expression of Prdx6 protein was determined by immunohistochemistry and Western blot methods. Prdx6 expression was significantly increased in the streptozotocin group compared to the control and hydroxytyrosol groups. In the streptozotocin+hydroxytyrosol group, Prdx6 expression was statistically significantly decreased compared to the control, hydroxytyrosol and streptozotocin groups. As a result, streptozotocin application increased Prdx6 expression. However, hydroxytyrosol application after streptozotocin caused a decrease in Prdx6 expression. These findings suggested that hydroxytyrosol exerts its protective role in diabetic testis independently of Prdx6.

Keywords: Diabetes Mellitus, Streptozotocin, Hydroxytyrosol, Testis, Prdx6

1. GİRİŞ

Anormal derecede yüksek kan şekeri seviyeleri ile teşhis edilen endokrin sistem hastalığı olan Diabetes Mellitus (DM), dünya çapında en yaygın ve en hızlı büyüyen hastalıklardan biridir [1]. DM, insan hayatını ciddi tehlikeye atan, yetersiz insülin sekresyonu, insüline direnç veya her ikisinden kaynaklanan metabolik bir bozukluktur [2-4]. Tip 1 diyabet, çoğunlukla mutlak insülin eksikliği ile, pankreas beta hücrelerinin ağırlıklı olarak immünolojik aracılı yıkımına bağlı olarak gelişmektedir [5, 6]. Diyabet kişilerin yaşam kalitesini olumsuz etkilemekle birlikte ve erkek kısırlılığı da dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, diyabetik böbrek hastalığı, diyabetik retinopati ve nöropati gibi birçok komplikasyonları vardır [1, 7, 8]. Tip 1 DM (T1DM), hiperglisemi ve insülin eksikliğinin etkileriyle erkek fertilitasını, gonadal ekseni, semen parametrelerini ve spermatogenezi etkileyebileceğini düşünülmektedir [9]. DM, spermatogenezde yer alan birçok sinyal yolunu etkiler. Diyabette artan ROS ve buna bağlı ortaya çıkan oksidatif stres, tüm doğurganlık sorunlarının başlangıcıdır ve spermatogenezde yer alan tüm sinyal yollarını etkilemektedir [10]. Diyabetin neden olduğu metabolik bozukluk, erkek doğurganlığı ve üreme sağlığını etkileyen oksidatif strese yol açmaktadır. DM, erektil disfonksiyon, ejakülasyon, üreme organlarında ve semen kalitesinde değişikliklere neden olmaktadır. Diyabetli erkek hastaların yaklaşık yarısında semen kalitesinde azalma ve üreme işlevinde bozulma meydana geldiği gösterilmiştir [3]. Birçok çalışma, sertoli hücrelerinde metabolizma bozukluğunun ve leydig hücrelerinde artan apoptozun, diyabetiklerde testiküler yapı değişikliğine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Oksidatif stres, diyabetik komplikasyonların gelişmesine katkıda bulunur. Eşzamanlı olarak, oksidatif stres erkek kısırlığının önde gelen nedenlerinden biridir [11, 12]. Hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol, HT), zeytinyağında bulunan, antioksidan anti-inflamatuar özelliklere sahip doğal bir antioksidandır ve insanlar tarafından yüzyıllardır herhangi bir yan etkisi bildirilmeden tüketilmiştir [13]. HT, serbest radikalleri ortadan kaldırmak, lipid peroksidasyonunu önlemek ve hipokloröz asit radikallerini bloke etmek gibi bazı antioksidan özelliklere sahiptir. HT, oksidatif stresin neden olduğu inflamasyon, kanser, diyabet ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde de rol oynar. Hidroksitirozölün, diyabete bağlı testislerde meydana gelen spermatogenik fonksiyon hasarını azalttığı ve

bu hasara karşı koruyucu olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [14]. Peroksiredoksin 6 (Prdx6), hücre sitoplazmasında indirgeyici ajan olarak glutasyonu kullanan, peroksidaz ve fosfolipaz A2 aktivitelerine sahip bir enzimdir. Hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktır [15]. Prdx6 spermatozoanın canlılığında, hareketliliğinde ve doğurganlık yeterliliğinde önemli rol üstlenir. Prdx'ler testis ve spermatozoada bol miktarda olmasına rağmen, spermatogenezin farklı aşamalarında ve perinatal germ hücrelerinde potansiyel rolleri tam olarak bilinmemektedir [16].

Diyabetik hastalarda infertilite sıklığı iyi bilinmesine rağmen, diyabetle ilişkili infertilite komplikasyonlarında yer alan moleküler sinyal yolaklarına dair net çalışmalar yoktur ve Diabetes Mellitus'un (DM) erkek infertilitesine neden olduğu mekanizmalar net bir şekilde açıklanmamıştır. Moleküler sinyal yolaklarındaki değişikliklerin belirlenmesi, diyabetik kısırlık komplikasyonlarının kontrolü ve tedavisi için gelecekte uygulanabilir bir terapötik hedef sunuyor gibi görünüyor. Yapılan bu çalışmada da streptozotosinle indüklenmiş Tip-1 diyabet rat modelinde, diyabetin neden olduğu oksidatif strese bağlı testiküler hasarı azalttığı bilinen hidroksitirozolün, spermilerin canlılığı ve hareketliliği etkisinde önemli rolü olan antioksidatif Prdx6 proteinin ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 2018/5/2 karar numarası ile onaylandı. Hayvan uygulamaları Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları uygulama ve araştırma merkezinde yürütüldü.

2.1. Deney Hayvanları

Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden (DÜHAM) çalışmada kullanılmak üzere 28 adet 3-5 aylık yaşta, 270 ± 30 gr ağırlıklığında erkek Wistar sıçan temini sağlandı. Hayvanlar standart koşullarda, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne uygun $25 \pm 3^\circ$ C oda ısısında, 60 ± 5 nemli bir ortamda ve 4'lü ve 5'li gruplar halinde özel olarak hazırlanmış kafeslerde her gün altları temizlenerek barındırıldı. Çalışma süresince çelik yemlikler içinde yem ve paslanmaz çelik bilyeli cam biberonlarda su *ad libitum* olarak verildi. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun belirlemiş olduğu kurallara uyularak tüm deneysel ve cerrahi işlemler gerçekleştirildi.

2.2. Deney grupları

Deneysel çalışmalar, 28 adet sıçan tartılıp ağırlıkları kaydedilerek rastgele dört gruba ayrıldı; Grup 1: sadece salin uygulanan kontrol grubu (n=5), Grup 2: sadece tek doz streptozotosin uygulanan diyabetik kontrol grubu (grubun kısaltma adı; STZ) (n=9), Grup 3: 30 gün süresince hidroksitirozol uygulanan hidroksitirozol kontrol grubu (grubun kısaltma adı; HT) (n=5), Grup 4: sadece tek doz streptozotocin ve 30 gün süresince hidroksitirozol uygulanan tedavi grubu (grubun kısaltma adı; STZ+HT) (n=9). Deneye başlamadan önce sıçanların kan glukoz seviyeleri Accu-Chek Nano Performa hızlı kan ölçüm cihazı ile belirlendi. Çıkan sonuçlara göre kan glukoz değerleri normal çıkan denekler seçilerek çalışmaya başlandı.

Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla streptozotosin (Sigma Aldrich, Cat# 18883-66-4) kullanıldı. Steril distile su ile çözölen streptozotosin, Grup 2 ve 4'ü oluşturan sıçanlara tek doz 55 mg/kg intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildi. Streptozotosin enjeksiyonundan 48 saat sonra hayvanların kan glukoz seviyeleri kuyruk veninden

lanset ile delinerek hızlı kan ölçüm cihazı ile ölçüldü. Kan glukoz değerleri ≥ 250 mg/dl olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Bu şartı sağlayan Grup 4 sıçanlara 30 gün boyunca günde bir defa 10 mg/kg hidroksitirozol (HT) intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. Tüm gruptaki sıçanlar 30 gün sonunda tartılarak açlık kan şekerleri ölçüldü. Anestezi uygulaması ketamin (90 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) ile ip olarak uygulandı. Testiküler dokular alındıktan sonra hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek çalışma sonlandırıldı. Çıkarılan testisler hassas terazi ile tartılarak yarısı immunohistokimya için bouin solüsyonuna, diğer yarısı ise Western blot yöntemi için -80 °C'ye kaldırıldı.

Çizelge 2.1. Hayvanlara uygulanan ajanlar, dozları ve uygulanma şekilleri ve süreleri.

Grup No	Grup Adı	Verilen Maddeler	Verilen Miktar	Veriliş Şekli	Hayvan Sayısı
1	Kontrol Grubu	Salin	1 ml/kg	ip	5
2	Diyabet Kontrol	Streptozotosin (tek doz)	55 mg/kg	ip	9
3	HT Kontrol	Hidroksitirozol (30 gün)	10 mg/kg	ip	5
4	HT ve STZ	Hidroksitirozol (30 gün) + Streptozotosin (tek doz)	10 mg/kg ve 55 mg/kg	ip	9

2.3. Diyabet Oluşturma Modeli

Deneyisel diyabet oluşturmak amacıyla streptozotosin (Sigma Aldrich, #18883-66-4) kullanıldı. Streptozotosin (STZ), pankreatik adacık β -hücre yıkımına neden olan bir antibiyotiktir ve laboratuvar hayvanlarında deneyisel olarak tip 1 diabetes mellitus (T1DM) modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılır [17]. Sıçanlar uygulama öncesinde hiperglisemiden korunması için 12 saat aç bırakıldılar. Streptozotosin enjeksiyonundan önce sıçanlar tartıldı ve kuyruk ucundan lansetle alınan kanda açlık kan glukoz değerleri ölçüldü. Sıçanların vücut ağırlığına göre STZ çözelti miktarı hesaplandı. STZ uygulaması tek doz 55 mg/kg ip olarak yapıldı. Diyabet tayini yapabilmek için 48

saat sonra kuyruk ucundan kan alınarak glukoz değerleri ölçüldü. Çıkan sonuçlara göre ≥ 250 mg / dl ve üzeri kan glukoz değerleri olan sıçanlar diyabetik kabul edildi.

2.4. Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanması

2.4.1. Hidroksitirozol'un Hazırlanması

Diyabetik testislerde antioksidatif koruyucu rolünü ve Prdx6 üzerine etkisini öğrenmek amacıyla hidroksitirozol (Cayman, #70604) %99 saflıkta satın alma yoluyla temin edildi. 5 ml steril distile suda 1 gram stok hidroksitirozol çözüldü. Stok hidroksitirozolden günlük 225 µl (45 mg) olacak şekilde falkon tüpe alındı ve üzerine 8775 µl steril distile su eklendi. Her gün saat 10:00 ile 12:00 arasında deneklere 10 mg/kg olacak şekilde ip enjeksiyon yapıldı. Bu işleme 30 gün süresince devam edildi.

2.4.2. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı

Testis dokularının tespiti için bouin solüsyonu kullanıldı. 1 lt distile su içinde molekül ağırlığı kadar tartılan pikrik asitte (12.2 g) iyice çözdürüldü ve dipte tortu kalmamasına dikkat edildi. 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi, 25 ml %37'lik formaldehitte karıştırılarak bouin solüsyonu hazırlandı. Bu karışıma 1 ml glasiyal asetik asit yavaşça eklenerek tekrar karıştırıldı.

2.4.3. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)

PBS çözeltisi 2 litre distile su (dH₂O) içinde, 2.85 gr disodyum hidrojen fosfat (Carlo Erba Reagent, #480141), 16 gr sodyum klorür (Isolab chemicals, #969.036.1000) ve 0.8 gr potasyum dihidrofosfat (Isolab chemicals, #960.066.1000) çözülerek pH'sı 7.2 ile 7.4 arasında olacak şekilde ayarlanarak hazırlandı.

2.4.4. Sitrat Tamponu

Sirat tamponu hazırlanırken 900 ml distile su (dH₂O) içerisine 2,10 gr sitrik asit (Isolab chemicals, #910.046.1000) eklendi ve tamamen çözünmesi için karıştırıldı. Daha sonra pH'sı 6 olana kadar NaOH (Isolab chemicals, #969.112.1000) ekleme yapıldı.

2.4.5. %30 Akrilamid -Bisakrilamid solüsyonu

40 ml disteli su içerisine 15,4 gr akrilamid bisakrilamid (Bio Basic, #A800011-0500)

solüsyonu ilave edilerek çözünmesi tamamlandı.

2.4.6. 4x Tris- HCl/SDS (Ph :8,8) Hazırlanışı

9 gr toz halindeki Tris (Serva, #37190.02) distile su içerisine atılarak çözünmesi sağlandı. Ph değeri 8,8 olacak şekilde hidroklorik asit (HCl) (Merck ,#100314) ile ayarlandı. 50 ml olacak şekilde distile su ilavesi yapıldıktan sonra 0,2 gr sodyum dodesil sülfat (SDS)(Serva ,#20765.01) eklenerek solüsyon hazır hali getirildi.

2.4.7. 4x Tris -HCl/SDS (Ph :6,8) Hazırlanışı

3,25 gr toz halindeki tris 20 ml distile su içerisine atılarak çözünmesi sağlandı. PH değeri 6.8 olacak şekilde ayarlandı. 50 ml olacak şekilde distile su ilavesi yapıldıktan sonra 0.2 gr SDS eklenerek solüsyon hazır hali getirildi.

2.4.8. %10'luk APS

1 ml distile su içerisine 0.1 gr amonyum per sülfat (APS)(Serva, #13375.05) ilave edilerek hazırlandı.

2.4.9. 10x Tris Tamponlu Tuz Solüsyonu (TBS) Stok Hazırlanışı

800 ml distile su içerisine 60.55 gr tris, 87.66 gr sodyum klorür eklenerek çözündürülerek hazırlandı. PH değeri 7.4 olacak şekilde ayarlama yapıldı.

2.4.10. TBS-Tween 20 Hazırlanışı (TBS-T)

100 ml 10x TBS stok üzerine 900 ml distile su ilavesi yapıldı. 1 ml tween 20 eklendi ve karıştırılarak homojenize dağılması sağlandı.

2.4.11. %5'lik Yağsız Süt Tozu Hazırlanışı

50 ml TBS-T içerisine 2.5 gr yağsız süt tozu ilave edilerek çözündürüldü.

2.4.12. Blotlama Solüsyonu Hazırlanışı

750 ml distile su içerisine 14.3 gr Glisin (Serva, #23390) ve 3 gr Tris ilavesi ile çözündürülüp, 200 ml metanol (CarloErba, #UN1230) ilavesiyle solüsyon 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

2.4.13. 5x Stok Elektroforez Solüsyonu

600 ml distile su içerisine 9 gr Tris, 43.2 gr Glisin, 3 gr SDS ilave edilerek çözündürüldü.

2.4.14. 1x Elekrtoforez Solüsyonu

180 ml 5x stok elektroforez solüsyonu üzerine 700 ml distile su ilave edilerek hazırlandı.

2.5. Işık mikroskobu incelemesi için dokuların hazırlanması

1. Dokular 24 saat bouin solüsyonunda fikse edildi.
2. 15 dakika %70'lik etil alkolde bekletildi.
3. 15 dakika % 80'lik etil alkolde bekletildi.
4. 30 dakika % 90'lik etil alkolde bekletildi.
5. 30 dakika % 90'lik etil alkolde bekletildi.
6. 30 dakika % 96'lik etil alkolde bekletildi.
7. 30 dakika % 96'lik alkolde bekletildi.
8. 45 dakika % 96'lik etil alkolde bekletildi.
9. 45 dakika Asetonda bekletildi.
10. 10 dakika 1. Ksilen'de bekletildi.
11. 20 dakika 2. Ksilen'de bekletildi.
12. 10 dakika Parafin-1'de 75°C sıcaklıktaki etüvde bekletildi.
13. 20 dakika Parafin-2'de 75°C sıcaklıktaki etüvde bekletildi
14. 30 dakika Parafin-3'de 75°C sıcaklıktaki etüvde bekletildi
15. Takip edilen dokular metal gömme kaplarında parafine gömülerek etiketleme yapıldı.

Hazırlanan bloklardan mikrotom cihazı ile 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Daha sonra su banyosunda düzleştirme yapılarak lam üzerine alındı. Bu kesitlerde Peroxiredoksin 6 (Prdx6) (Abcam, #ab59543) antikoru ile immünohistokimyasal boyama yapıldı.

2.6. Prdx6'nın immunohistokimyasal boyanması

1. Tüm gruplar için hazırlanan bloklardan pozitif yüklü immün lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

2. Kesitler 75 °C'lik etüvde 40 dakika bekletildi.
3. Deparafinizasyon için 1. ksilende 10 dakika, 2. ksilende 10 dakika bekletildi.
4. Daha sonra her birinde 5 dakika olmak üzere %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi.
5. Sonrasında kesitler distile suda 5 dakika bekletildi.
6. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 0.01 M sitrat tamponuna konularak mikrodalga fırında 750 Watt'ta 8 dakika kaynatıldıktan sonra oda ısısında 20 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.
7. PBS (pH: 7.2 - 7.4) ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
8. Endojen peroksidaz aktivitesinin baskılanması amacıyla kesitler %3' lük hidrojen peroksit ile 15 dakika inkübe edildi.
9. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
10. Pap-pen çizimi: Hidrofobik kalemle kesitlerin etrafı çizilerek sınırlandırıldı.
11. UV bloklama: Kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin (IgG) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu ile 7 dakika muamele edildi.
12. Serumun fazlası alınarak kesitlere Prdx6 primer antikoru (1:750 dilüsyonda, Abcam, # ab73350) damlatıldı.
13. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine uygun izotip kontrol uygulandı.
14. Kesitler nem kutusunda oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
15. Süre sonunda kesitler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
16. Daha sonra 60 dakika biotinlenmiş sekonder antikor ile 1:500 dilüsyonunda nem kutusunda oda ısısında 30 dakika inkübe edildi ve akabinde PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
17. Yıkama sonrası horseradish enzimi konjuge edilmiş streptavidin kompleksi (Thermo Scientific, #TS125HR) ile 15 dakika oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. Sonrasında da PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkama yapıldı.

18. Sinyalleri geliştirmek için dokular 3 dakika 30 saniye Di Amino Benzidin (DAB) kromojeni (ScyTek Laboratories,#ack500) ile muamele edilerek reaksiyon gereekleştirilerek distile suda yıkandı.
19. Kesitlere Mayer Hematoksilen ile 1 dakika zıt boyama yapıldı.
20. Akan suda yıkanan kesitler her birinde 10 dip olmak kaydıyla %70, %80, %90'lık etil alkol serilerinden geçirildi.
21. %100'lık etil alkolde 4 dakika tutularak dehidrate edildi.
22. 1. ksilende 5 dakika, 2. ksilende 5 dakika olacak şekilde bekletildi.
23. Oda sıcaklığında kuruyan lamalar entellan kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

2.7. Semi Kantitatif Değerlendirmeler

Prdx6 ile immünohistokimyasal boyanan hücreler ve bunların boyama yoğunlukları semi kantitatif olarak değerlendirildi. Skorlama řu şekilde yapıldı: 0 = negatif; (+) = zayıf pozitif; ++ = pozitif; +++ = yoğun pozitif; ++++ = çok yoğun pozitif.

2.8. İmageJ programı ile immünohistokimya sonuçlarının analizi

Olympus BX50 mikroskobu ile Zeiss Axiocam ICc5 kamera kullanıldı. Kontrol, HT, STZ ve STZ+HT grupları kesitlerinin Prdx6 boyamalarının fotoğrafları çekildi. İmmünohistokimyasal boyama yoğunlukları İmageJ programında değerlendirildi. Her her hayvanın kesitinden ayrı ayrı 10'ar adet fotoğraf alınarak değerlendirme yapıldı. Boyanan alanın tamamı (hematoksilen + DAB) seçildikten sonra yalnızca DAP-pozitif alanlar seçildi. Boyanma yoğunluğu, DAB-pozitif alanın yoğunluğunun, toplam boyanma yoğunluğuna bölünmesi ve çıkan sonucun 100 ile çarpımı yoluyla belirlendi, ortalama yoğunluk yüzde olarak 0-100 aralığında olacak şekilde ifade edildi.

2.9. Western Blot Protokolü

Dokular -80 C°'de saklanan ortamdan çıkartılarak erimesi beklendi. Gerekli sayıdaki epondorf tüpler üzerine doku isimleri yazıldı. Daha sonra cam üzerine alınan dokular bisturi yardımı ile mekanik olarak parçalandı. Parçalanan dokuların ağırlıkları tartılıp not edildikten sonra epondorf tüplerinin içine konuldu. 1ml lizis buffera 30 µl proteaz

inhibitör kokteyli (PIK) (Roche, #1169749800) ilave edildikten sonra dokuların yer aldığı ependorflara 0.2 gram dokuya 600 µl lizis buffer ve proteaz inhibitör kokteyli karışımı eklendi. 15 dk bir vortex yapılan dokular 1 saat inkübe edildikten sonra sonikatör ile parçalandı. Ependorflarda ki hücreler +4°C de 10.000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak ve içerdiği protein oranı BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23225) kullanılarak tespit edildi. Örnekler elektroforezden önce 95°C’deki suda 5 dakika kaynatıldı. Elektroforez jeli için gerekli olan amonyum per sülfat (APS) hazırlandı. Protein miktarları eşit olacak şekilde her kuyucuğa 10 µl örnek yüklendi ve mini protean sistem tankının içine yerleştirildi. Mini protean sistem tankına elektroforez solusyonu eklendi ve tank güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağı aracılığı ile 100 Volt, 50 miliamperde yaklaşık 80 dakika boyunca proteinler elektroforez edildi. Jel üzerinde proteinler yürütüldükten sonra, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrana aktarmak için üstte ve altta 3’er adet filtre kâğıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. Proteinleri içeren jel üzerine PVDF membran konularak hazırlanan sandviç mini protean sistemindeki tank blot içerisine alındı. Transfer solüsyonu mini protean tankına eklendi ve +4°C’de 32 voltta gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra elde edilen membran, TBS-T ile hazırlanan %5’lik yağsız süt tozu ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde blokladı. Daha sonra membran, üreticinin tavsiyesi dikkate alınarak hazırlanmış ve bloklama solüsyonu içinde sulandırılmış olan primer antikor Prdx6 (1/2000, Abcam, # ab73350) ve internal kontrol olarak da β-aktin (1/2000, Cell Signaling, #13E5) kullanılarak +4°C’de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkama yapıldı. Ertesi gün membran, bloklama solüsyonu hazırlanmış konjuge sekonder antikor ile 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkama yapıldı. Membran, chemiluminisansla (BioRad, #1705061) 5 dakika inkübe edilir sonrasında karanlık oda içerisinde membranlardaki sinyaller X-ray filme ekspozite edildi. Film, geliştirici ve tespitten geçirildikten sonra distile su ile yıkanıp kurutuldu. Kurutulan filmler taranarak bilgisayara aktarıldı ve İmagej programı kullanılarak her bandın boyanma yoğunlukları analiz edildi. Elde edilen Prdx6 verileri β-aktin’e oranlanarak normalize edildi. Normalize edilen veriler GraphPad Prism 9 ile analiz edildi.

2.10. İstatiksel Analiz

Elde edilen verilerin analizi GraphPad Prism 9 ile yapılmıştır. Tüm immünohistokimya ve Western blotting verileri one-way ANOVA takiben Holm -Sidak metodu kullanılarak analiz edildi. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ kabul edildi.

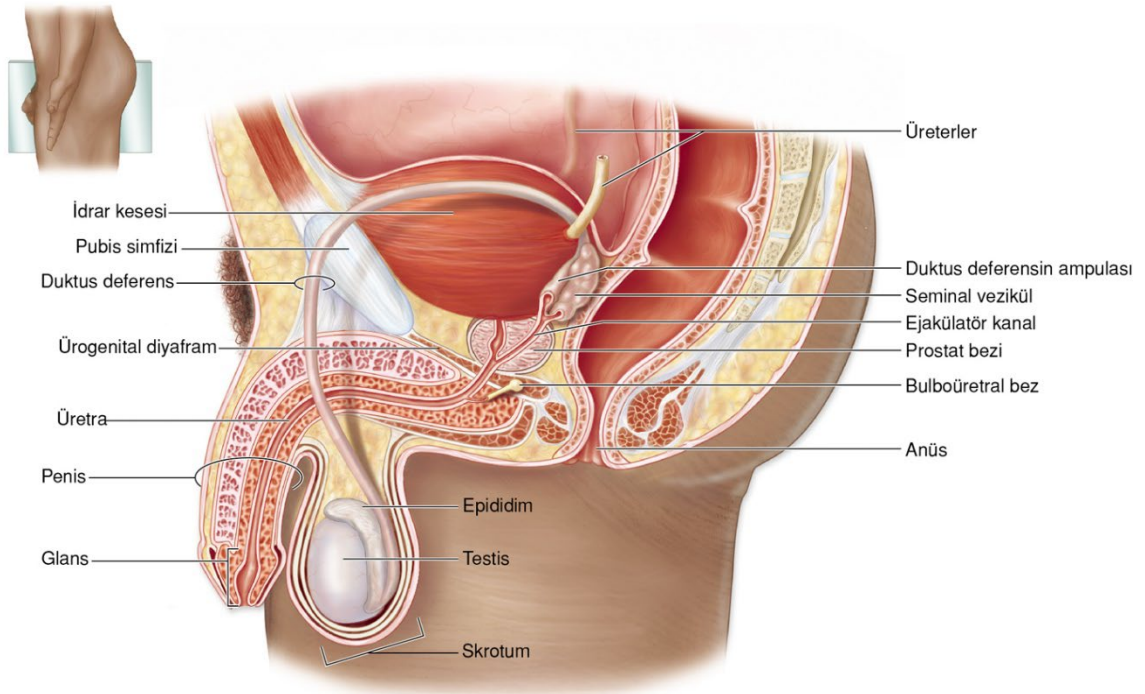


3. GENEL BİLGİLER

3.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi skrotum içine yerleşmiş bir çift testis, genital kanallar (epididimis, duktus deferens), yardımcı bezler (seminal veziküller, prostat bezi, bulboüretal bezler) ve penis olmak üzere dört ana bölümden oluşur (Şekil 3.1) [18].

Testisler yapısında bulunan bazı endokrin hücreler sayesinde androjenleri salgılama ve sperm üretiminde görevlidirler. Genital kanallar spermatozoaların penil üretradan dışarı atılmasında görev alırlar. Yardımcı bezler salgılarıyla semen kitlesini oluşturur ve ejaküle spermatozoonlara gerekli besinleri sağlarlar. Penis erektile dokudan oluşur ve çiftleşme organı olarak görev alır [18].

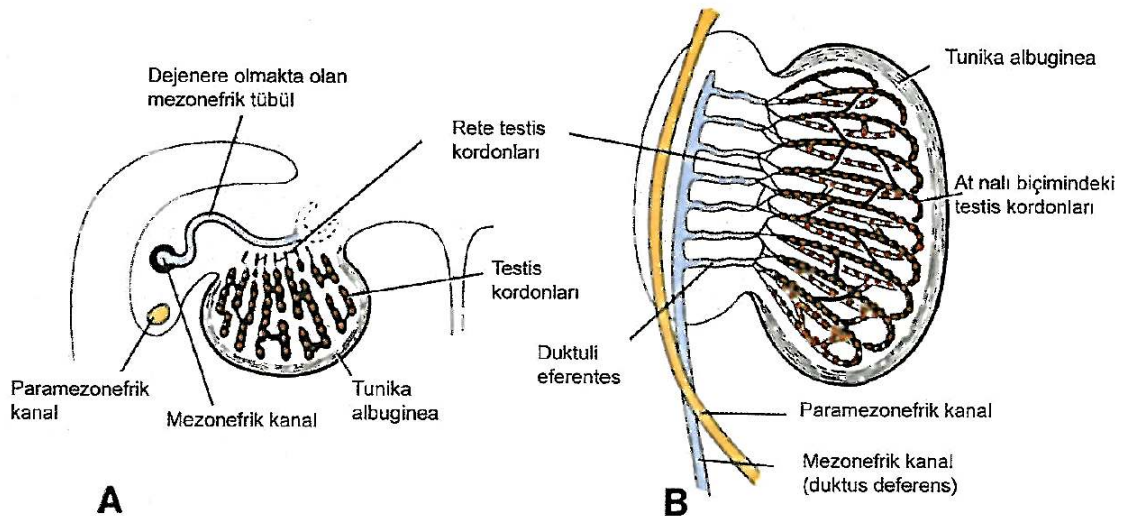


Şekil 3.1. Skrotumdan üretraya kadar; testis, epididimis, bezler ve ductus deferens, aralarındaki komşusal ilişkiler şematik olarak gösteren şekil [18].

3.1.1. Testis Embriyolojisi

Cinsiyetin belirlenmesi genetik açıdan fertilizasyonda belirlenmiş olsa da 7.haftadan önce benzerlikleri nedeniyle gonad gelişimi birbirinden ayırt edilememektedir. Bu yüzden bu

dönemdeki gonad ‘farklanmamış gonad’ olarak adlandırılır. Embriyo genetik olarak erkek ise, primordial germ hücreleri bir XY cinsiyet kromozomu kompleksi taşır. Testisin gelişimi sürecinde Y kromozomu üzerindeki *SRY* (sex determining region on Y chromosome) geninin kodladığı testis belirleyici faktörün etkisi ile ilkel seks kordonları çoğalmaya devam eder ve medullar kordları oluşturmak için medullanın derinliklerine nüfuz eder (Şekil 3.2 A).



Şekil 3.2. A. Sekizinci haftada testisin enine kesiti, tunica albuginea, testis kordonları, rete testis ve primordial germ hücrelerini gösteriyor. B. Dördüncü ayda testis ve genital kanal [19].

Oluşan gonadın hilyumuna doğru kordonlar rete testisin tübüllerini oluşturmak için küçük hücre şeritlerinden oluşan bir ağa ayrılır (Şekil 3.2.A, B). Gelişimin daha ileri evrelerinde, yoğun bir fibröz bağ dokusu tabakası olan tunica albuginea, testis kordonlarını yüzey epitelinden ayırır (Şekil 3.2) [19].

Dördüncü ayda testis kordonları at nalı şeklini alır ve uçları rete testis ile devam eder (Şekil 3.2.B). Testis kordonları artık ilkel germ hücrelerinden ve gonadal kabartının yüzey epitelinden türetilen Sertoli destek hücrelerinden oluşmaktadır [19] .

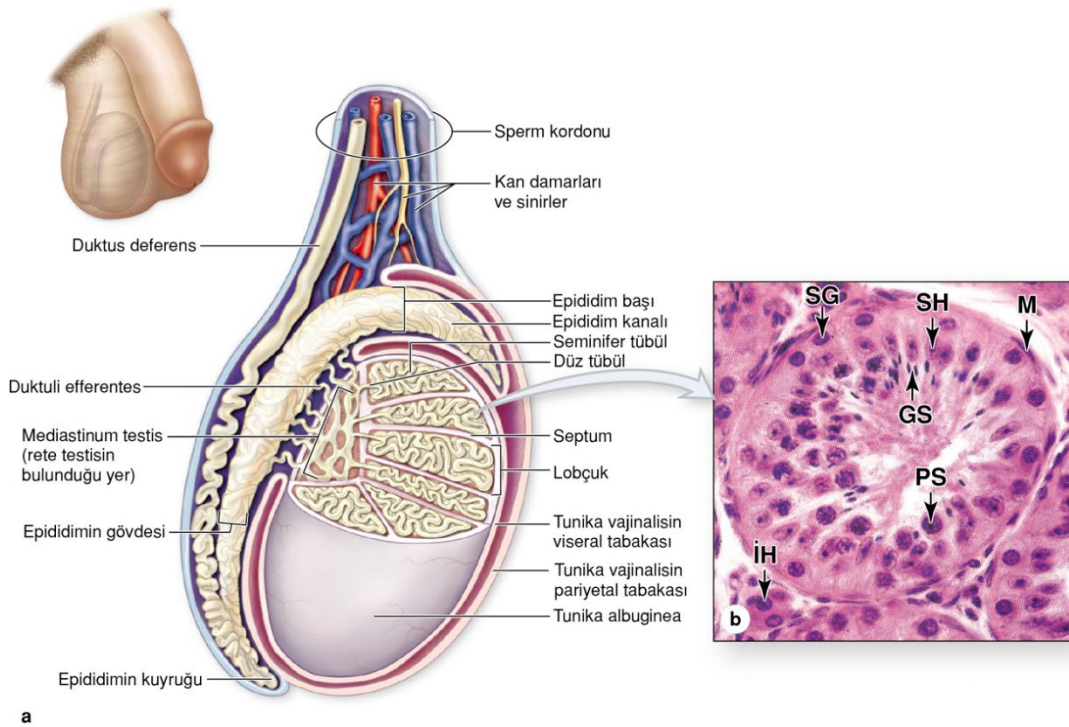
Gonadal sırtın orijinal mezenşiminden türetilen interstisyel Leydig hücreleri, testis kordonları arasında yer alır. Gelişimleri bu kordonların farklılaşmaya başlamasından kısa bir süre sonra gelişmeye başlar. Gebeliğin sekizinci haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlar ve testis, genital kanalların ve dış genital organların farklılaşmasını etkiler hale gelmiştir [19].

Testis kordonları puberteye kadar solid kalır ve sonra pubertede bir lümen kazanır ve

böylece seminifer tübüleri oluşturur. Seminifer tübüller kanalize edildikten sonra, sırasıyla duktuli efferentes'e giren rete testis tübüllerine bağlanırlar. Bu efferent kanallar, mezonefrik sistemin boşaltım tübüllerinin kalan kısımlarıdır. Duktus deferens olarak bilinen bu kanallar rete testis ile mezonefrik veya wolflian kanallarını birbirine bağlarlar (Şekil 3.2.B) [20].

3.1.2. Testis Histolojisi

Testisler karın boşluğunun dışında, skrotum adı verilen bir torba içerisine yerleşmiş oval biçimli cinsiyet bezleridir (Şekil 3.2) [21]. Testisler eni 3 cm , boyu 5 cm uzunluğunda fasulye şeklinde organdırlar [21].



Şekil 3.3. Testis anatomisi ve histolojisi, **a**, testisin kısmi olarak sagittal kesitinin şematik görünümü, **b**, seminifer tübülün enine kesiti [18].

Testisler tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasküloza olmak üzere dıştan içe doğru üç tabakadan oluşan kapsül ile kuşatılmıştır [22]. Testiküler kapsülün en dış tabakası olan tunica vaginalis tek katlı mezotelyal hücrelerden oluştuğundan genellikle preparatlarda izlenmesi güçtür. Yoğun fibroelastik bağ dokusu olan tunica albuginea kapsülün en kalın ve belirgin tabakasıdır (Şekil 3.2) [23]. Kan damarları içeren gevşek

bağ dokusundan oluşan tunica vasküloza kapsülün en iç tabakasını oluşturmaktadır [24]. Testisin posterior yüzeyi boyunca kalınlaşan tunica albuginea mediastinum testis adını alır (Şekil 3.2) [18]. Kan, lenf damarlarının ve sinirlerin testise girip çıktığı yer bu kısımdır [25]. Mediastinum testisten bezin içine uzanan fibröz septumlar bezi testis lobülleri denilen yaklaşık olarak 250 adet pramidal bölmeye ayırır. Her lobülün içerisinde interstisyel veya leydig hücreleri denilen testosteron salgılayan hücreler bulunur. Bu hücreler seminifer tübüllerin arasını dolduran gevşek bağ dokusu içindedirler ve tek tek veya kümeler halinde bulunurlar. İntertisyel dokuda fibroblastlar, lenf damarları ve pencereci kapiller de bulunmaktadır [26]. Testosteron üreten bu hücreler, merkezi çekirdekli, sitoplazmaları eozinofilik ve yağ damlacıkları içeren geniş yuvarlak ya da poligonal yapıdadır. Hipofiz bezinden salınan lüteinleştirici hormon (LH) testosteron salınımı için interstisyel hücreleri tetiklemektedir. Ergenlik döneminde testosteron salınımını başlatan temel olay hipotalamusun gonadotropin salgılatıcı hormonu üretmesidir. Testosteron hem spermatogenez hem de fetal ve embriyonik dönemde cinsel gelişim için önemli bir hormondur [18]. Testis lobüllerinin her birinde aşırı kıvrımlı sayıları 1 ile 4 arasında değişebilen seminifer tübüller bulunur [18]. Spermatogenez ve spermiyogenez bu tübüllerde gerçekleşir [26] ve erkek üreme hücreleri olan spermatozoonlar üretilir [27].

3.1.2.1. Seminifer Tübüller

Spermilerin oluşturulduğu tübüllerdir ve günde 2×10^8 civarında sperm üretebilirler. Her testiste yaklaşık olarak 250-1000 civarında seminifer tübül bulunur ve boyları 30- 70 cm uzunluğunda olup 150-250 μm çapındadır. Toplam uzunlukları 250 metreyi bulmaktadır. Aşırı kıvrımları olan bu tübüller, kanallar şeklinde uzanarak mediastinum testis içerisinde gömülü rete testise, oldukça kısa ve dar olan düz tübüller ile bağlanırlar [18]. Rete testis mediastinum testis içerisinde yer alır ve toplanan spermeleri taşıma görevi görür [28]. Rete testisin kanallarının epididimise bağlanmasını sağlayan yapılar ise duktuli efferenteslerdir [18]. Tübüllerin epiteli çok katlı kübik epitel olup germinal epitel olarak adlandırılırlar. Tunika propiye, elastik fibrillerce zengin olan bazal membranın hemen dışında fibröz bağ doku katmanıdır. Bu tabakada, fibroblastlar ve kasılabilen miyoid hücreler bulunmaktadır. Seminifer tübüllerin epitelinde, bazal lamina üzerine spermatogenik hücreler ve sertoli hücreleri olmak üzere iki farklı hücre grubu bulunmaktadır [29].

3.1.2.2. Spermatogenik hücreler

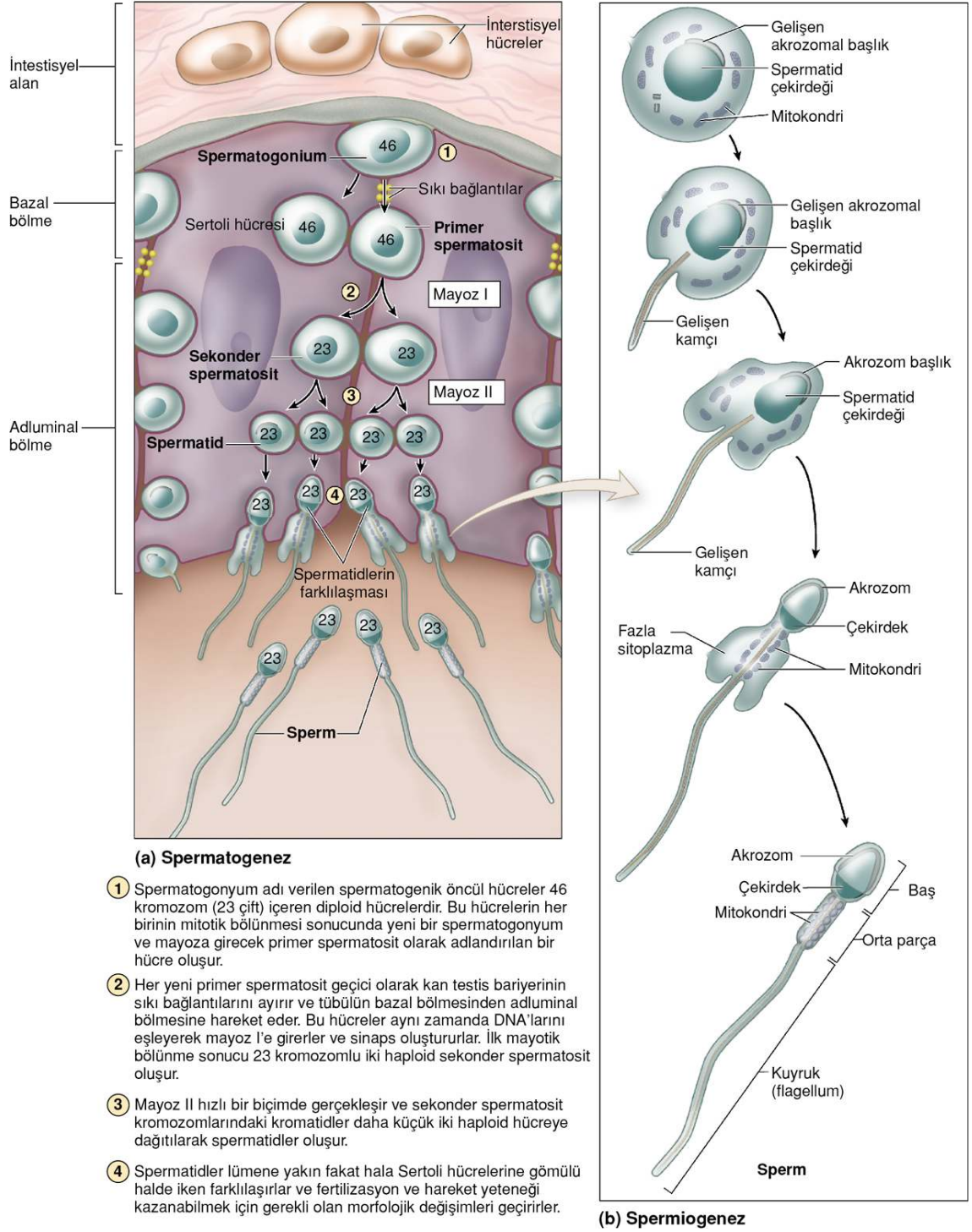
Bazal lamina ile lümen arasında 4-8 tabaka halinde bulunan hücre gruplarıdır. Spermatogenik seri hücrelerinin üretimi (spermatogenez) ve spermatozoonlara farklılaşmasına (spermiyogenez) kadar geçen tüm aşamalar burada gerçekleşir. Spermatogenez, spermatogonyumların oluşumu ile başlayan ve spermatozoonların üretimini sağlayan bir evredir. Spermatogonyumlar bazal membran üzerinde, küçük ve yuvarlak hücrelerdir. 12 μm çapındaki bu hücreler kök hücre olarak davranırlar ve sertoli hücreleri ile yakın ilişki halindedirler [18].

Spermatogenez, haploid spermatozoanın germ hücrelerinden geliştiği bir süreçtir. Primer spermatositler, seminifer tübülün dış kısmından daha merkezi bir konuma hareket eder ve bazal membrandan seminifer tübül lümenine uzanan Sertoli hücrelerinin etrafına tutunur. Sertoli hücreleri, gelişmekte olan spermatositlere yapısal ve metabolik destek sağlamak, gelişmekte olan gametlerin gelişimi ve olgunlaşması için gerekli ortamı sağlamak ve kan-testis bariyerini (BTB) oluşturarak spermatidleri immün saldırıdan korumak gibi çeşitli işlevlere sahiptir [7].

Spermatogonyumlar cinsel olgunluk çağında mitoz bölünmeler geçirerek A ve B tipi spermatogonyum olmak üzere iki farklı tip hücre oluştururlar. A tipi spermatogonyumlar oval ve koyu boyanan çekirdekli hücrelerdir. Bu hücreler kök hücre olarak bölünürler ve A tipi oval soluk çekirdekli hücreleri oluştururlar. Bu hücreler daha hızlı bölünme yeteneğindedirler. A tipi spermatogonyumlar birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı halde kalırlar. A tipi spermatogonyumlar daha sonra yoğun kromatin içeren yuvarlak çekirdekli B tipi spermatogonyumlara farklılanırlar. B tipi spermatogonyumlar son bir mitoz bölünme daha geçirir ve büyüyerek ökromatik çekirdekli primer spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositler tübülün en büyük hücreleridir. 46 kromozomlu bu hücreler mayoz bölünme geçirerek mayozun profazını yaklaşık 3 haftada tamamlarlar. Mayoz bölünme tamamlandığında 23 kromozomlu sekonder spermatositler (23,2N) oluşur. Sekonder spermatositler hızlı bir interfaz evresini içeren ikinci mayozu dakikalar içinde tamamlayarak 23 kromozomlu N miktarda DNA içeren erken spermatid hücrelerini (23,1 N) oluşturur. Bu gelişme aşamalarında sekonder spermatositler primer spermatositlerin, spermatidlerde sekonder spermatositlerin yarısı kadar görünümündedir. Spermiyogenez, spermatidlerin spermatozoonlara farklılaşma aşamasıdır. Seminifer tübül lümenine yakın haploid kromozomlu erken spermatidler oldukça küçüktür (7 -8 μm) [18].

Spermiyogenez birbirini takip eden evrelerden oluşur. Golgi fazı evresinde golgi kompleksinden küçük salgı granülleri oluşur. Bu granüller birleşerek membranla çevrili daha büyük olan akrozomal vezikülü oluştururlar. Bu vezikül çekirdeğin ön yüzeyinde gelişerek bu alanı kaplar ve Akrozomal kep adını alır. Akrozomal başlık çekirdeğin yarısını kaplar. İçerisinde eritici enzimlerin bulunduğu bu kısım sayesinde spermiyum yumurtanın zarlarını (korona radiyata ve zona pellusida) delerek yumurta içerisine girebilir. Bu da döllenmenin ilk basamaklarından biridir. Çekirdeğin ön kısmında akrozom oluşurken arka kısmına sentriyollerin göç etmesiyle flagella aksonemi oluşmaya başlar. Kuyruk etrafı fibröz bir kılıf tarafından sarılarak uzamasına devam eder. Sitoplazmanın bir kısmı kuyruk ucuna doğru kayar. Geri kalan kısım ise boğumlanır ve sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek artık cismi oluşturur. Mitokondriyumlar bir kılıf şeklinde kuyruğun ilk bölümünü kuşatırlar. Orta parça olarak adlandırılan bu bölge kuyruğun hareketi için gerekli olan ATP'yi üretir. Sertoli hücreleri içerisinde gömülü olan spermin nükleusu yoğunlaşıp uzar ve spermin başını yapar. Morfolojik olarak gelişimi tamamlanmış olan spermiyumlar fonksiyonel değildir. Olgun ama hareketli olmayan spermatozoonlar tübül lümenine bırakılırlar [29].





Şekil 3.4. Spermatogenez ve sperm yapısı [29]

3.1.3. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri, spermatogenezin düzenleyicisi olarak görev yapan somatik hücrelerdir [30]. Sertoli hücreleri bazal laminaya tutunmuş spermatogenik serideki hücreleri saran uzun prizmatik epitel hücreleridir. Apikal uçları seminifer tübül lümenine kadar uzanır.

Sitoplazmik sınırları belli olmayan hücrelerdir. Sınırlarının net olarak belli olmamasının temel nedeni spermatogenik seri hücreler içerisinde doğru çok sayıda uzantı yapmasıdır. Belirgin nükleolusları olan bu hücreler çok gelişmiş golgi cisimciği ve düz ER (Endoplazmik Retikulum), az gelişmiş granüllü ER, çok sayıda mitokondri ve lizozom içerirler. Çekirdeklerinin oval veya üçgen şeklinde olması ve çekirdekçiklerinin oldukça belirgin olması bu hücrelerin ayırt edilmesini sağlar [18]. İki sertoli hücresinin arasında yaptığı sıkı bağlantılar seminifer tübül epitelinde kan testis bariyerini oluşturmaktadır. Kan testis bariyeri, mayoz bölünme ile oluşan yeni genetiği farklı hücrelere karşı antijenlerin ve antikörlerin geçişini engelleyerek vücudun otoimmün saldırılarına karşı koruma sağlamaktadır. Bu kan testis bariyeri tübül lümenini bazal ve adlüminal olmak üzere iki kompartmana ayırmaktadır. Spermatogenez aşamasında primer spermatositler kan testis bariyerini bağlantı noktalarından ayırarak tübülün bazal kompartmanından adlüminal kompartmanına ulaşır. Kan testis bariyerinin üzerinde bulunan sertoli hücreleri sitoplazmik katlantıları içerisinde pakiten primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidler görülmektedir. Sertoli hücreleri arasında bulunan gap junction adı verilen oluklu bağlantılar iyonik ve kimyasal madde alışverişine imkan sağlamaktadır. Spermatogenik hücreler bu bağlantılar sayesinde hücrelerdeki etkinliklerini düzenli bir şekilde yürütebilmektedir. Sertoli hücrelerinin lümenine uzanan apikal sitoplazmasında spermatidlerin kamçı gelişimi tamamlanır ve püsküllü uzantılar şeklinde görülürler [18].

Sertoli hücrelerinin genel görevleri şunlardır;

1.Destek görevi: Gelişmekte olan spermatozoonları destekler, korur ve beslenmelerini düzenler.

2. Fagositoz: Spermatid oluşumu sırasında sitoplazma kalıntıları olan artık cisimleri fagositozla yok eder. Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında bulunan lizozomlar sayesinde gerçekleştirilir.

3.Salgılama: Sertoli hücreleri hem endokrin hem ekzokrin salgıları vardır. Seminifer tübül lümenine sürekli salınan salgılar spermin dışarı taşınmasını sağlar. Ayrıca sertoli hücrelerinden salınan farklı maddelerde çeşitli görevler üstlenir. Bunlar;

- FSH (Folikül Stimüle Edici Hormon) etkisiyle salınan androjen bağlayıcı protein spermatogenez için gerekli olan testosteron yoğunluğunu ayarlar.
- İnhibin glikoproteini salgısı ile FSH üretimini baskılar.

- Glikoprotein yapıdaki anti-müllerian hormonu (AMH) ile embriyonik dönemde erkek fetüste müller kanalının gerilemesini sağlar [18].

3.1.4. İntertisyel Doku

Seminifer tübüller arasını dolduran gevşek bağ dokusudur. Doku içerisinde fibroblast, makrofaj, mast hücreleri, Leydig hücreleri, lenf damarı ve pencereci kapiller bulunur. Ergenlik döneminde intertisyel hücreler veya Leydig hücresi olarak adlandırılan işlevsel hücrelerde belirginleşir [18].

Leydig Hücreleri

Yuvarlak veya poligonal şekilli, merkezi çekirdekli ve küçük yağ damlacıklarınca zengin olan bu hücreler kan damarlarının etrafında tek tek veya gruplar halinde bulunurlar. Bu hücreler erkek cinsiyeti özelliklerini taşıyan testosteron hormonu üretirler. Tübüler kristali mitokondri ve düz endoplazmik retikulum enzimleri testosteron üretimini gerçekleştirirler. Leydig hücreleri testosteron salınımına fetal gelişimin 3. ve 4. aylarında başlar. Bu olay fetüsün erkek birey olarak gelişimi için önemli bir olaydır [29]. Hamilelikle birlikte plasentadan salınan testis gonadotropini intertisyel hücreleri uyarır ve erkek genital sistemin kanal ve bezlerinin gelişmesi için gerekli testosteron üretimini sağlar. Hamileliğin 4. ayından sonra hücreler geriler fibroblast benzeri morfoloji kazanır ve puberte dönemine kadar bekler. Ergenlikle birlikte tekrar hipofizden salınan LH uyarımıyla testosteron salınımı düzenlenir [18].

3.2. DİABETES MELLİTUS (DM)

Diabetes Mellitus, anormal düzeyde yüksek kan glukoz seviyeleri ile dikkat çeken bir endokrin sistem hastalığıdır [31]. İnsülin salgısının yetersizliği ya da etkisini kaybetmesi hücrelerin glukoz yoksunluğu çekmesine neden olur. Bu durum kandaki glukoz seviyesinin yükselmesi yani hiperglisemi olarak adlandırılır [18]. Hücrelerin ve dokuların yeterli düzeyde glukoz alamaması karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmalarında da bozulmalara yol açmaktadır [32].

Diyabet kelimesi ilk olarak Memphis'li Apollonius tarafından MÖ 250 ila 300 yıllarında kullanılmaya başlamıştır. Eski Yunan, Hint ve Mısır uygarlıkları idrarın bu durumdaki tatlılığını keşfederek bal anlamına gelen ‘mellitus’ kelimesinin yayılmasıyla ortaya çıkmıştır. 1922 yılında Banting, Best ve Collip tarafından Toronto üniversitesinde

ineklerin pankreasından izole etikleri insülin ile birçok ağır diyabet hastalarını ölüme mahkum olmaktan kurtarmıştır [31, 32]. İnsülin, glukozun kan dolaşımından vücudumuzdaki hücrelere girmesine yardımcı olan bir hormondur. Hücreler glukozu, fonksiyonlarını yerine getirmek için gerekli olan enerji olarak kullanırlar. Glukoz hücrelere giremediğinde kanda birikir ve kan plazmasındaki yoğunluğu artar [33].

Diabetes mellitus giderek yaygınlaşan bir hastalık olup, insüline bağımlı olan Tip 1 (T1DM) ve insüline bağımlı olmayan Tip 2 (T2DM) diyabet olarak iki ana tipi vardır. T2DM tüm vakaların %90'nı oluşturmaktadır. Diabetes mellitus tüm vücut sistemlerini etkileyen komplikasyonlar gösterir. Tedavi sürecinde geç kalınırsa ölümcül sonuçlarla karşılaşılma olasılığı yüksektir [34].

3.2.1. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

Dünya sağlık organizasyonu (WHO) ve Amerika Diyabet Derneği (ADD) göre günümüzde diyabet sınıflandırması;

- **Tip I diabetes mellitus (T1 DM);** İnsüline bağımlı diabetes mellitus olarak adlandırıldığı gibi 'Genç diyabeti' olarak da bilinir. İnsülin salgısını üreten pankreas beta hücrelerinin harabiyeti sonucu ortaya çıkar.
- **Tip II diabetes mellitus (T2 DM);** İnsülin bağımlı olmayan diyabet olarak adlandırılır. İnsülin duyarlılığındaki azalma sonucunda gelişir. İnsülin direncinin gelişmesine obezite ve düşük tempolu yaşam neden olmaktadır.
- **Gestasyonel diabetes mellitus (GDM);** Gebelik döneminde ortaya çıkan glukoz intoleransı olarak tanımlanır. Gebeliğin üçüncü ayında belirir ve gebelik sonlandığında ortadan kalktığı gibi bazı kadınlarda ise ileriki yaşlarda T2DM geliştirme riski yüksektir.
- **Diğer sipesifikler;** Olgunlukta başlayan genç diyabeti, neonatal diyabet, streoid kullanımına bağlı nedenlerle ortaya çıkabilen çeşitli kategorilerde diyabetlerde vardır [31].

3.2.1.1. Tip I Diabetes Mellitus (T1DM)

T1DM çocukluk veya ergenlik döneminde görüldüğü gibi her yaşta rastlanabilen insülin sekresyonunda azalmaya bağlı ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterizedir. Bu hastalar düzenli insülin enjeksiyonu ile tedavi edilmektedir [31, 35]. T1DM, çocuklar da en çok

görülen kronik hastalıklardan biri olsa da her yaşta görülebilir. Genellikle diyabetli kişilerin yaklaşık %5 ile %10'unu temsil eder [36]. T1DM, pankreas beta (β) hücrelerinin yıkımı veya insülin sentezini bozan bazı hastalıklar sonucu ortaya çıkabilmektedir [36]. T1DM olan bireylerde β hücrelerdeki yıkımlar viral kaynaklı veya otoimmün bozukluklara bağlı olabildiği gibi bazı durumlarda da kalıtsal olarak da ortaya çıkmaktadır [34, 37]. Aylar veya yıllar içerisinde oluşan bu yıkımlar insülin eksikliğine sebep olmaktadır [38].

Hastalarda en sık polidipsi (aşırı su tüketimi), poliüri (sık idrara çıkma), polifaji (anormal derecede güçlü bir açlık hissi), bulanık görme ve hiperglisemi semptomları gözlenir. Ayrıca hastalarda hızlı kilo kaybı görülmektedir. Kan glukozundaki artış, karaciğerde yağ kullanımının artması ve vücut proteinlerindeki azalma hastalığın teşhisinde önemli bulgularındandır [32]. İnsülin olmadan diyabetik ketoasidoz gelişir ve hayatı tehdit eder [36]. Kas ve yağın parçalanmasıyla artan lipoliz ve keton üretimi yorgunluk ve halsizlik ile sonuçlanır. Dünya çapında coğrafi farklılıklar gösterse de Amerika Birleşik Devletlerinde 1.24 milyon insan Tip 1 diyabetliken bu insidansın en düşük olduğu ülkeler Çin ve Venezuela'dır [36].

3.2.1.2. Tip II diabetes mellitus (T2DM)

T2DM, insülin direnci olan, olumsuz yaşam tarzı ve obeziteye bağlı olarak gelişen hiperglisemi ile seyreden bir diyabet tipidir [31, 35]. T2DM'de insüline yanıt azalır ve bu insülin direnci olarak tanımlanır. Buna bağlı olarak insülin salgılama kapasitesi zamanla giderek kötüleşir. T2DM, pankreasın kişinin insülin ihtiyacını karşılayamaması üzerine eklenen, artmış insülin direncinden kaynaklanır [39]. T2DM, tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Daha çok 45 yaş üstü kişilerde görülse de artan obezite seviyeleri, fiziksel hareketsizlik ve enerji yoğun diyetler nedeniyle çocuklarda, ergenlerde ve genç erişkinlerde giderek daha fazla görülmektedir [36].

3.3. Diabetes mellitusun testisle ilişkisi

Diabetes mellitus (DM), yüksek kan şekeri seviyeleri (hiperglisemi) ile karakterize edilen metabolik bozukluklardan biridir [40]. Son bilgiler, DM 'un evrensel olarak 415 milyondan fazla yetişkini etkilediğini göstermektedir [40, 41]. Artan prevalans, 2040 yılına kadar 640 milyondan fazla yetişkinin diyabet hastası olacağını öngörmektedir [41].

Diyabete bağlı ortaya çıkan hiperglisemi, kardiyovasküler hastalıklar, nöropati, nefropati, retinopati ve erkek infertilitesi gibi birçok hastalığın kaynağıdır [42, 43]. Günümüzde bazı diyabetik erkek bireylerde infertilite komplikasyonları olduğu gösterilmiştir [44]. Diyabet hastalarının büyük çoğunluğunu erkekler oluşturmaktadır [45]. Ayrıca diyabetik erkeklerde infertilite görülme sıklığı kadınlara göre daha fazladır [46]. Çalışmalardan elde edilen bulgular, diyabet gibi kronik hastalığı ve obezitesi olan erkeklerde geç başlangıçlı hipogonadizmin yaygın olduğunu ortaya koymaktadır [47]. Farklı çalışmalarda, diyabetik erkekler ve diyabetik hayvan modellerinde, değişmiş spermatogenez, testislerde dejeneratif ve apoptotik değişiklikler, Sertoli/kan testis bariyerinde değişen glukoz metabolizması, azalmış testosteron sentezi ve sekresyonu, ejaklatuvar disfonksiyon ve azalmış libido gözlenmiştir [48].

Erkek reme işlev bozukluğu bağlamında, çalışmaların çoğunda testis morfolojisindeki değişiklikler araştırılmıştır [40, 41]. Çeşitli çalışmalardan elde edilen veriler, diyabetik olgularda testisin kaput, korpus ve kaudal bölgelerinin kütlesinin azaldığını ve testis tübüllerinde spermatozoa sayısının azaldığını göstermiştir [41]. Ayrıca diyabet hastalarında yüksek kan glukoz miktarı ile epididim kanalında germ hücre populusyonunda azalma ve histolojik yapısında stereosilyada azalma, inflamasyon ile epitel hücrelerinin kümelenmesi ve lipid vakuolizasyonu durumu görülebilir [49, 50]. Ayrıca diyabet hastalarında testis stromasında hipertrofi, inflamasyonlu hücreler, prostatik intraepitelyal neoplazi ve genişlemiş salgı organelleri gibi testis dokusunda başka histolojik değişiklikler de görülür [51]. Ayrıca diyabetik kemirgenlerde, hiperglisemi seminal veziküllerin ağırlığını azaltabilmektedir [52]. Diyabetik sıçan modellerinde, testis ağırlığının, Leydig hücrelerinin sayısının, seminifer tübüllerin çapının ve germinal epitelin yksekliliğinin azaldığı bildirilmiştir [53]. Ayrıca diyabetik sıçan testisinde Leydig hücrelerindeki yağ damlacıklarının ve vakuollerin sayısı artar ve interstisyel matrisin hacmi artar [53] .

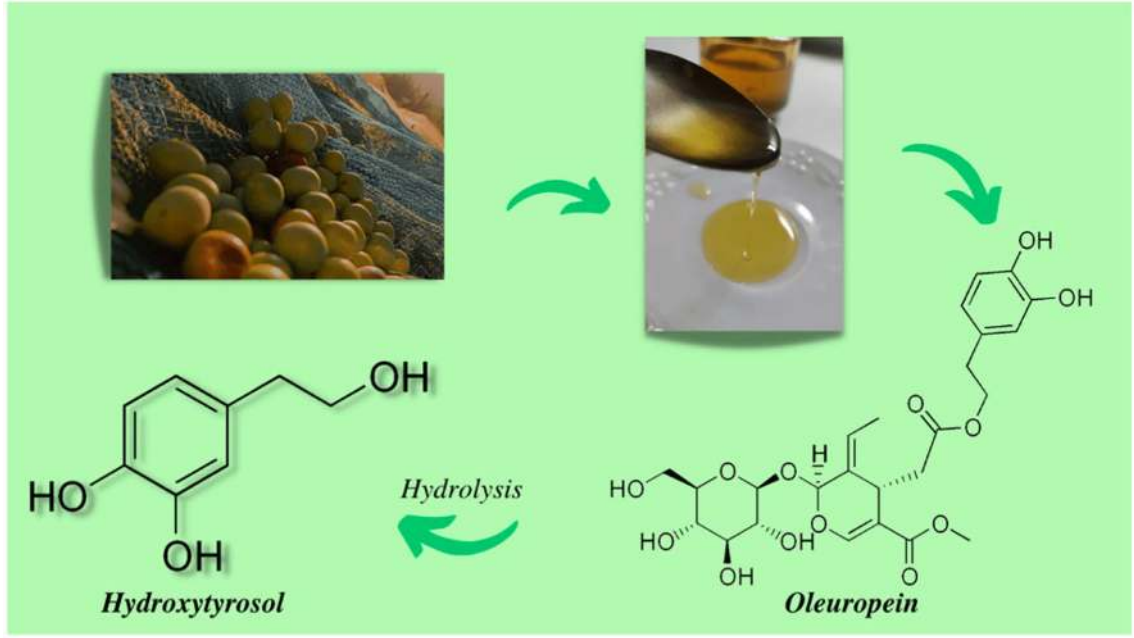
Literatür sperm kalitesi ile doğurganlık arasında doğrudan bir ilişki olduğunu onaylamıştır. Tip 1 diyabetli hastalarda, sperm DNA onarımında, mitokondriyal DNA delesyonlarında ve sperm motilitesinde azalma gözlenebileceği bildirilmiştir [54]. Ayrıca serum insülin seviyesinin spermin akrozomunu ve plazma zarını etkilediği bildirilmiştir [55]. Diyabetik hastalarında sperm hareketliliği azalır ve anormal sperm morfolojisi artar [49]. Spermatogenez sürecinde gözlenen, spermatogonia'nın çoğalması ve farklılaşması,

spermatozit aşamasındaki bölünmeler ve spermiyogenez hiperglisemiden etkilenir [50]. Farklı çalışmalar, diyabetin önemli bir komplikasyonunda, sperm sayısı, hareketliliği, semen hacmi ve olağandışı sperm morfolojisi ile dikkat çeken üreme işlev bozuklukları olduğunu bildirmiştir [41, 56].

3.3.1. Hidroksitirozol (HT)

Son yıllarda yapılan çalışmalar, bitki bazlı diyetlerin yararlı etkileri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu şekilde, bitkiye dayalı en yaygın beslenme modellerinden biri de Akdeniz diyetidir. Bu tür bir diyetin, birçok kronik hastalıkların görülme sıklığının azalmasını sağladığı ve sağlıklı uzun ömüre katkısı gibi birçok olumlu etkisinin varlığı yaygın olarak kabul edilmektedir [57]. Akdeniz diyetinin, farklı kronik dejeneratif hastalıkları, önemli kardiyovasküler olayları, diyabet, obezite ve bazı kanser türlerinin insidansında azalma, genel morbidite ve mortaliteye karşı koruma, oksidatif stres belirteçlerinde azalma, lipid profilinde iyileşme, insülin duyarlılığı, inflamatuvar ve endotelial fonksiyonun yanı sıra antitrombotik özellikleri insanlarda yapılan birçok deneme ve epidemiyolojik çalışma ile doğrulanmıştır [58]. Bu geleneksel diyetin temelini zeytinyağı oluşturmaktadır. Sızma zeytinyağı, oldukça bol miktarda doymamış yağ asitleri ve yağda çözünen vitaminler, klorofiller, fitosteroller ve polifenoller gibi küçük bileşenler açısından değerli bir kaynak sunar [59]. Bununla birlikte, sağlığı uzun yaşamayı destekleyici özelliklere gelince, zeytinyağı polifenolleri araştırma ilgisinin merkezinde görünmektedir [60]. Zeytinyağı polifenollerinin, antioksidan, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, nöroprotektif, antikanser, antidiyabetik, antiobezite, antisteatotik, antimikrobiyal ve diğer birçok etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [61, 62]. Çok sayıda araştırmaya göre, bu etkiler çoğunlukla oleuropein, oleocanthal ve oleacein gibi ana secoiridoid türevlerine ve basit fenoller hidroksitirozol (HT) ve tirosole atfedilebilir [59, 63]. HT, ana zeytin polifenolleri arasında en güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir (Şekil 3.3). Antioksidan etkisini antioksidan enzimlerin aktivitesini ve sentezini uyararak göstermektedir [64]. Hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol, HT) tüm sofralık zeytin türlerinde bulunur [65]. HT, serbest radikal toplayıcı ve metal şelatör olarak işlev görmektedir. Başlangıçta çok çeşitli HT biyolojik aktiviteleri, güçlü antioksidan aktivitesi ile ilişkilendirilse de HT'nin farklı hücresel sinyal yollarını aktive ederek oksidatif strese karşı endojen savunma sistemlerini arttırdığı ve buna bağlı olarak antioksidan koruma sağlayabileceği öne sürülmüştür [63]. HT güçlü serbest radikal süpürücü ve antioksidan özelliklerinden

dolayı potansiyel anti-diyabetik etkiler gösterebilir. HT, diyabetik vaskülopatiyeye yol açan başlıca biyokimyasal süreçleri etkileyerek çeşitli diyabetik hayvan modellerinde hipoglisemik aktivite gösterir [66]. Diyabet modelinde, HT'nin diyabetik nöropatiyi etkili bir şekilde önleyebileceği gösterilmiştir [67]. HT'nin hücrelerde insülin duyarlılığını iyileştirdiği ve uygun insülin sinyalini geri kazandırdığı gösterilmiştir [68].



Şekil 3.3. Zeytinyağında bulunan oleuropeinin hidrolizinin bir türevi olan hidroksitirosolün kimyasal yapısı [69].

3.3.2. Prdx6

Peroksiredoksin 6 (Prdx6), peroksitleri ve peroksitlenmiş makromolekülleri hidrolize ederek hücreleri oksidatif stresten kurtaran peroksiredoksinler adı verilen bir antioksidan enzim ailesinin üyesidir. Prdx'ler hidrojen peroksit (H_2O_2), organik hidroperoksitler ve peroksinitrit ($ONOO^-$) dahil olmak üzere peroksitleri uzaklaştırmak için peroksidadaz aktivitesine sahiptir [70, 71]. Peroksiredoksin (Prdx) ailesinin nörodejenerasyon, diyabet, akut ve kronik akciğer hasarı, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda yer aldıkları bildirilmiştir [1]. Prdx ailesi, memelilerde altı izoformu vardır. Memeli Prdx'leri katalitik aktivitelerinde rol oynayan Cysteine (Cys) sayısına göre Prdx1, Prdx2, Prdx3, Prdx4, Prdx5 ve Prdx6 olarak sınıflandırılırlar [72]. Bu altı Prdx üyesi (Prdx1–Prdx6) hücrelerde yaygın olarak dağılarak çeşitli biyolojik işlevleri yerine getirirler. Peroksiredoksin 6

(Prdx6), peroksidaz ailesinin 1-Cys Prx alt birimi içeren tek memeli üyesidir. Yapısal ve fonksiyonel özellikleri bakımından diğer alt ailelerle benzerlikler taşımaktadır [73].

Prdx6 proteini 26 kDa ve 224 amino asitten oluşur. Prdx6 iki işlevli bir enzim olarak çalışır. İlk işlevi antioksidan özelliği sağlayan peroksidaz aktivitesidir ve katalitik döngüyü tamamlar. Prdx6'nın diğer enzimatik işlevi ise kalsiyumdan bağımsız bir fosfolipaz A₂ (PLA₂) aktivitesidir ve fosfolipitlerin asil grubu hidrolizini katalize eder. Dolayısıyla Prdx6, hem glutatyon peroksidaz (GPx) hem de kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz PLA₂ aktivitelerine sahip olması bakımından benzersizdir. Prdx6, peroksidaz aktivitesi aracılığıyla kısa zincirli hidroperoksitleri azaltarak oksidatif stresi sınırlayarak antioksidan etki gösterir. Diğer taraftan, Prdx6'ya özgü fosfolipaz A₂ aktivitesi oksidanların oluşumuna yol açar. Bu nedenle, peroksidaz aktivitesi oksidatif strese karşı korumada çok önemliyken, fosfolipaz A₂ aktivitesi ise reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Prdx6'nın bu iki paradoksal yeteneği, bu enzimin oksidatif streste düzenleyici bir rolüne işaret etmektedir. Prdx6, vasküler homeostazı sürdürmek ve en uygun ROS seviyelerini mümkün kılmak üzere iki aktivite yoluyla ROS seviyelerinin ince ayarını yapan bir regülatör veya yeniden ayarlama görevi yapmaktadır [74].

Prdx6 ekspresyonu doğal yaşlanma veya doğrudan patolojik bir süreç yoluyla azaldığında, aşırı ROS hücrel anormalliklere neden olmaktadır. Farklı çalışmalarda Prdx6'nın sayısız uyaran tarafından üretilen oksidatif stresi hafiflettiği gösterilmiştir [75]. Dünya çapında infertilite ile mücadele eden çiftlerin oranı 1980'lerde %8 civarında iken son yıllarda bu oranın neredeyse %17'lere çıkmasıyla birlikte infertilitenin ciddi oranda yükselme eğiliminde olduğu anlaşılmaktadır [76, 77]. Bu hastaların fertil bireylere kıyasla seminal plazma ve spermatozoadaki Prdx miktarlarının azaldığı gözlemlenmiştir [76, 78]. Prdx'lerin totalindeki miktarının düşmesi ve oksidasyon durumu nedeniyle, hücrelerdeki antioksidan koruma %20'den daha az bir seviyeye gelmiştir. Bu Prdx'lerin total miktarındaki azalma hastalarda gözlemlenen sperm fonksiyonundaki bozulmayı ve kötü DNA kalitesini açıklamaktadır [78]. Prdx6'nın kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A₂ (iPLA₂) ve peroksidaz aktiviteleri, sperm canlılığı ve motilitenin sürdürülmesi ve karmaşık kapasitasyon sürecinde spermatozoanın dölleme yeteneği kazanabilmesi için ROS'un düzenlenmesinde önemli bir rol oynar [79]. Prdx1 ve Prdx6'nın ekspresyonun azalması, erkek infertilitesiyle yakından ilişkili olan artmış sperm lipid

peroksidasyonuna, DNA hasarına ve sperm motilitesinin bozulmasına sebep olmaktadır [70]. Prdx6^{-/-} farelerden alınan spermatozoa örnekleri, *in vitro* ve *in vivo* olarak oksidatif strese oldukça duyarlıdır. Prdx6^{-/-} farelerde daha yüksek seviyelerde lipid peroksidasyonu, S-glutatifonize ve oksitlenmiş (işlevsiz) protein içeriği, anormal sperm kromatin yapısı ve kısır erkeklere benzer (anormal üreme sonuçları, düşük sperm hareketliliği ve proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasar) sperm fenotipi gösterdi [80]. Varikosel veya idiyopatik infertilitesi olan erkeklerden alınan spermatozoalarda Prdx6 miktarının azaldığı saptanmıştır [78]. Ayrıca Prdx6'nın insan spermatozoasının tüm hücresel bölümlerinde geniş bir dağılımı olduğu ve buda Prdx6'nın spermatozoanın korunmasındaki ana rolünü vurgulamaktadır [81]. Prdx6 proteini insan testisinde sertoli ve leydig hücrelerinde çok yoğun pozitif, erken spermatidler de ise pozitif bir ekspresyon gösterir. Prdx6 proteini ayrıca oksidatif strese bağlı azalan sperm hareketliliğini de önemli ölçüde artırır [82].

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

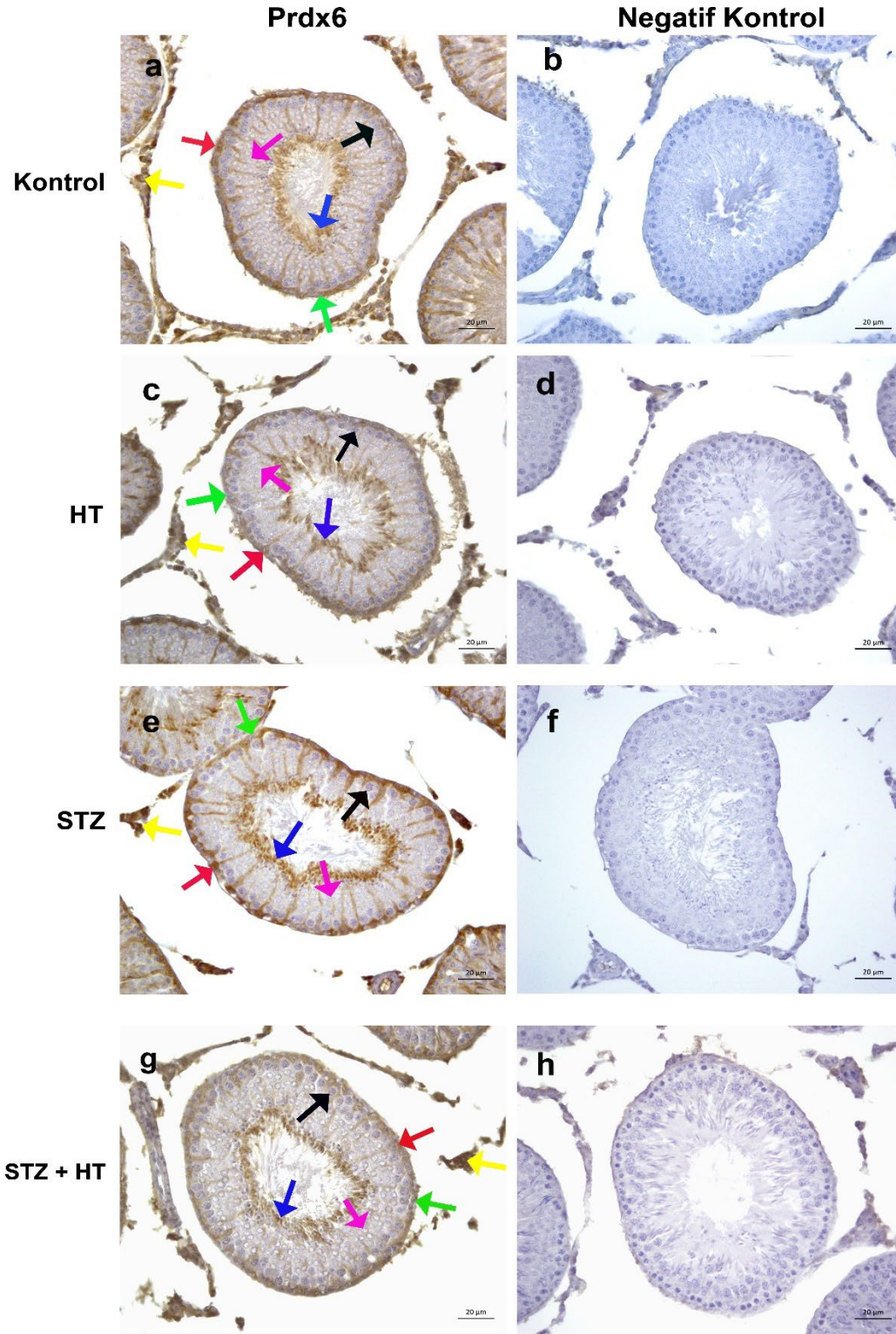
4.1. Bulgular

4.1.1. İmmünohistokimyasal bulgular

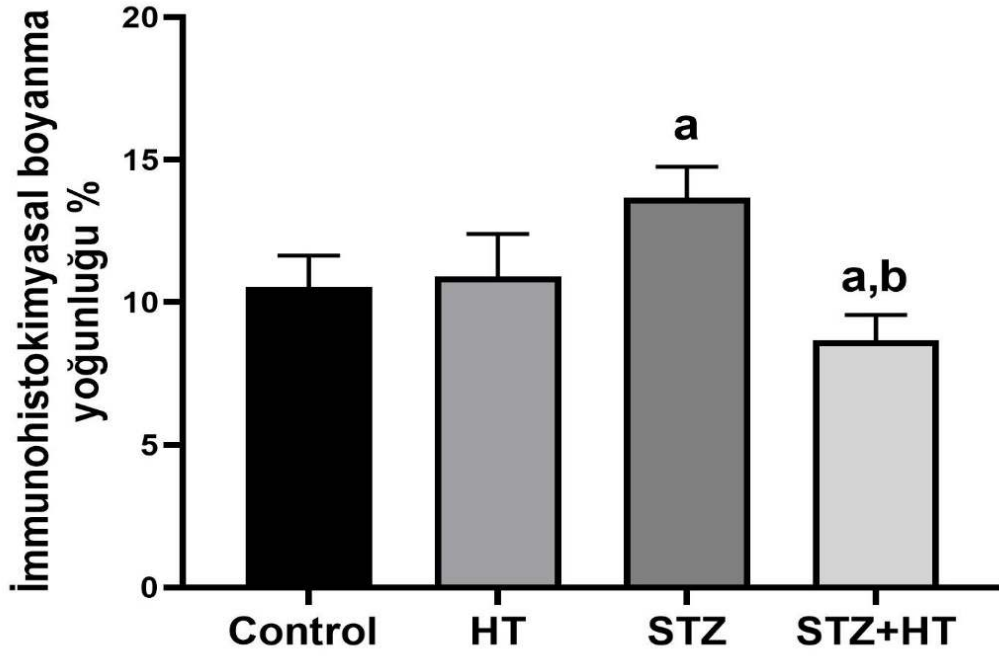
Olympus Cx41 mikroskopta AxioCam Zeiss dijital kamera ile immünohistokimyasal olarak boyanan dokuların fotoğrafları çekildi. İmmünohistokimyasal boyanma yüzdeleri ImageJ programı kullanarak hesaplandı. GraphPad Prism 8 InStat analiz programında elde edilen veriler değerlendirildi ve tüm verilerde gruplar arasındaki farklılıklar one-way ANOVA'yı takiben Holm-Sidak metodu kullanılarak incelendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilerek Prdx6 antikoru için analiz yapıldı. Testiste Prdx6 ekspresyonu hem sitoplazmik hem de nükleerdi (Şekil 4.1). Prdx6'nın hücresel immünohistokimya boyanma yoğunlukları dağılımı Çizelge 4.1'de verilmiştir. Kontrol ve HT grubu Prdx6 ekspresyonu benzerdi, ancak STZ grubunda kontrol ve HT gruplarına kıyasla arttı (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Prdx6 ekspresyonu STZ+HT grubunda ise kontrol, HT ve STZ gruplarına göre azalmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Kontrol, HT (hidroksitirozol), STZ (streptozotosin) and STZ+HT gruplarında Prdx6'nın semi-kantitatif dağılımı. 0: negatif; (+): zayıf pozitif; ++: pozitif; +++: yoğun pozitif; ++++: çok yoğun pozitif

Prdx6				
Hücreler	Kontrol	HT	STZ	STZ+HT
Sertoli hücresi	++	++	+++	(+)
Spermatogonyum	-	-	-	-
Primer spermatosit	-	-	-	-
Erken spermatid	-	-	-	-
Geç spermatid	++	++	+++	+
Leydig hücresi	++	++	+++	+

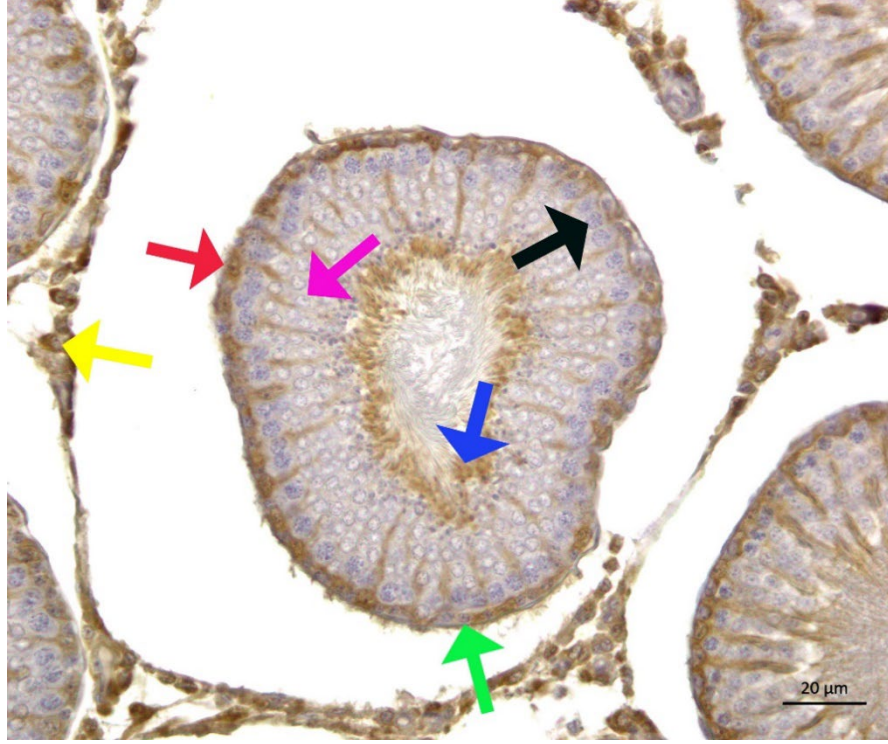


Şekil 4.1. Prdx6'nın immunohistokimyasal boyamasının gruptaki temsili mikrografları. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. Yeşil ok; spermatogonyum hücresi, kırmızı ok; Sertoli hücresi, Siyah ok; primer spermatosit, mavi ok; geç spermatid, Sarı ok; Leydig hücresi, Pembe; spermatidi göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.

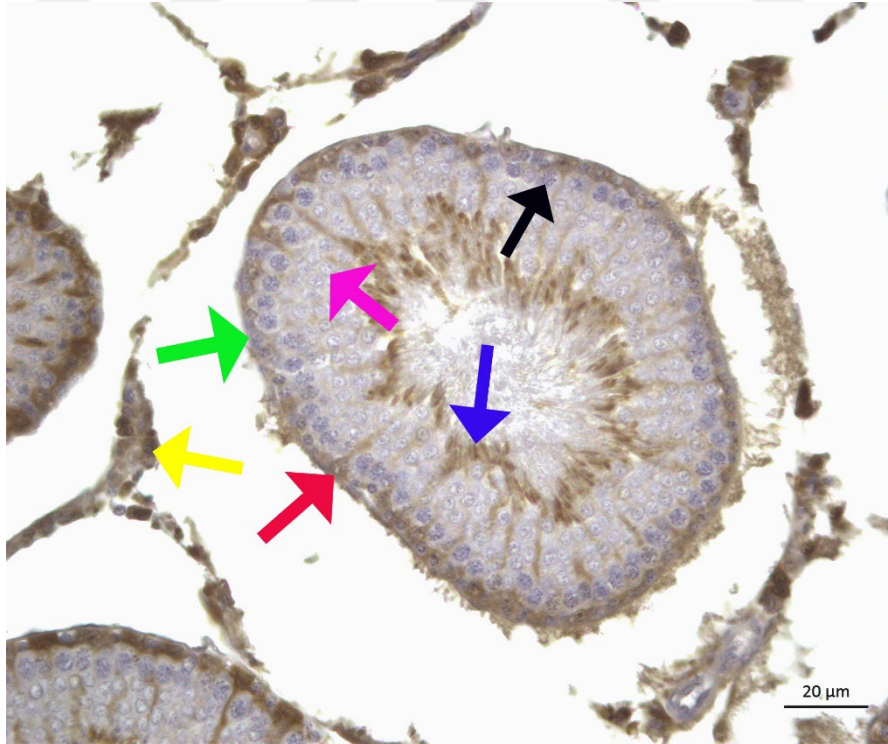


Şekil 4.2. Testis dokusunda Prdx6 proteinin immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı, b ise STZ'ye göre anlamlılığı gösterir.

Kontrol ve HT grupları Prdx6 ekspresyonu benzerdi ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0.001$) (Şekil 4.1.a-d ve Şekil 4.2). Kontrol ve HT grupları Prdx6 ekspresyonunun hücresel dağılımı Sertoli hücreleri, geç spermatidler ve Leydig hücrelerinde yoğun pozitif, spermatogonyum, primer spermatositler ve erken spermatidlerde negatifti (Çizelge 4.1, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

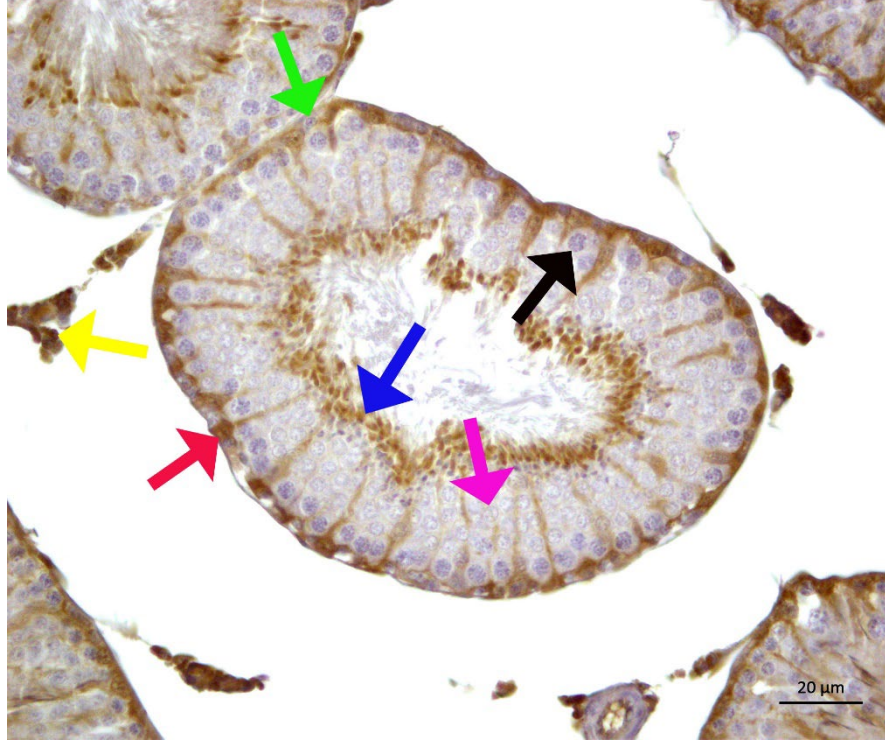


Şekil 4.3. Kontrol grubu Prdx6 ekspresyonu. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μ m'dir.



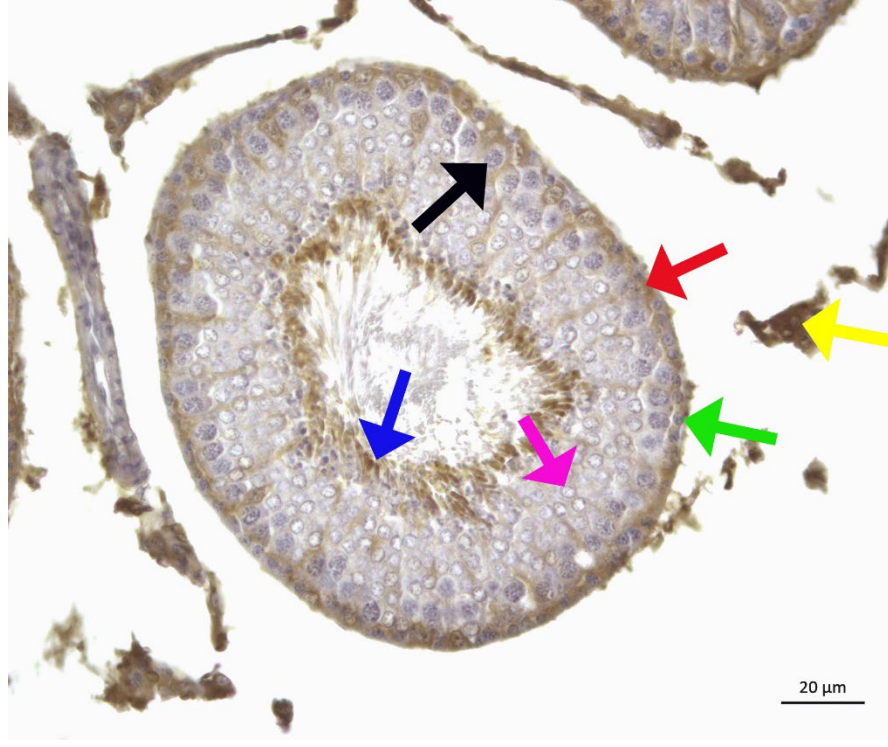
Şekil 4.4 HT (hidroksitirozol) grubu Prdx6 ekspresyonu. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μ m'dir.

STZ grubunda Prdx6 ekspresyonu kontrol ve HT gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı ($p<0.05$) (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). STZ grubu Prdx6 ekspresyonunun hücresel dağılımı Sertoli hücreleri, geç spermatidler ve Leydig hücrelerinde çok yoğun pozitif, spermatogonyum, primer spermatositler ve erken spermatidlerde negatifti (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.5. STZ (streptozotosin) grubu Prdx6 ekspresyonu. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.

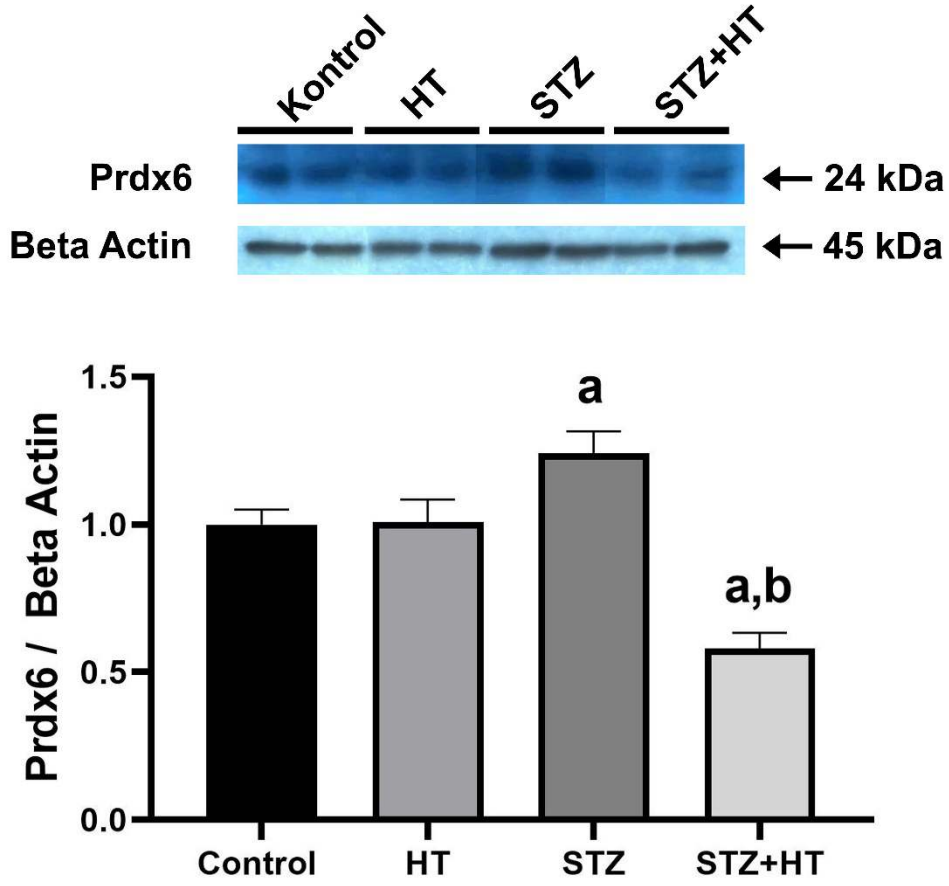
STZ+HT grubunun Prdx6 ekspersyonu, kontrol, HT ve STZ gruplarına göre istatikselsel olarak anlamlı bir şekilde azaldı ($p<0.05$) (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). STZ+HT grubu Prdx6 ekspresyonunun hücresel dağılımı, Sertoli hücrelerinde zayıf pozitif, geç spermatidler ve Leydig hücrelerinde pozitif, spermatogonyum, primer spermatositler ve erken spermatidlerde ise negatifti (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.6. STZ+HT (streptozotosin+hidroksitirozol) grubu Prdx6 ekspresyonu. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 μ m'dir.

4.1.2. Western Blot Bulguları

Western blot sonucu elde edilen Prdx6 bandları ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Elde edilen veriler beta aktine oranlanarak normalize edildikten sonra GraphPad Prism 8 InStat programı ile gruplar arasındaki farklılıklar one-way ANOVA'yı takiben Holm-Sidak metodu kullanılarak analiz edildi. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi. Prdx6 proteinin western blot bulguları, immunohistokimya bulguları ile uyumluydu. Prdx6 protein seviyesi kontrol ve HT gruplarında benzerdi ($p > 0.05$) (Şekil 4.7). STZ grubu Prdx6 protein seviyesi kontrol ve HT gruplarına kıyasla arttı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$) (Şekil 4.7). STZ+HT grubunda Prdx6 protein seviyesi kontrol, HT ve STZ gruplarına kıyasla düşüktü ve bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p < 0.05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Prdx6 protein seviyesinin Western blot analizi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı gösterir. HT; hidroksitirosol, STZ; streptozotosin.

4.2. Tartışma

Diyabetes mellitus (DM), anormal derecede yüksek kan şekeri seviyesi ile teşhis edilen bir endokrin sistem hastalığıdır. DM dünya çapında en yaygın ve hızla yayılmaya devam eden hastalıklardan biridir. Diyabet, beta hücre disfonksiyonu, insülin direnci veya her ikisinde de ortaya çıkan insülin yetersizliğinden kaynaklanan yüksek kan glukoz seviyeleri ile karakterize edilen kronik bir metabolik hastalıktır [1, 83]. Diabetes mellitus (DM), karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarındaki değişikliklerin az ya da çok ölçüde eşlik ettiği kronik hiperglisemi varlığı ile karakterize edilmektedir [84, 85]. Kronik hiperglisemi, insülinin sekresyonunda veya etkisinde bozukluklara yol açarak, çeşitli doku ve organların (gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları) uzun vadeli hasarı ve işlev bozukluğuna neden olur [86]. Ayrıca diyabetin bu komplikasyonlarına ek olarak erkek üreme sisteminde de işlev bozukluğuna sebep olmaktadır. Diyabet erkek fertilitasını ve üreme sağlığını etkileyen oksidatif strese yol açmaktadır [3]. DM, erkek

fertilitesini, erektil disfonksiyon, ejakülasyon ve üreme organlarında yapısal değişiklikler ve semen kalitesindeki değişiklikler ile etkilemektedir [3]. DM'nin ereksiyon ve ejakülasyon işlevi üzerinde olumsuz bir etkisinin yanı sıra semen hacminde, sperm sayısında, sperm hareketliliğinde ve anormal sperm morfolojisinde bir bozulmaya neden olmaktadır [87]. Hidroksitirozol (HT), in vitro antioksidan özelliklere sahip fenolik bir fitokimyasaldır. Zeytin yaprağı ve yağında bulunabilen doğal bir bileşiktir ve ana kaynağı sızma zeytinyağıdır. HT antioksidatif ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir [88]. HT, oksidatif stresin neden olduğu inflamasyon, kanser, diyabet ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde rol oynar [15]. HT ile tedavi edilen diyabetik ratların testisinde oksidatif enzimatik aktivite, lipid peroksidasyon profilleri, sperm sayısı, morfoloji ve hareketliliğinde düzelme gözlenmiştir [14]. Çalışmamızda streptozotosin ile indüklenmiş tip 1 diyabet modelinde antioksidatif, antidiyabetik ve anti-inflamatuar etkinliği bilinen hidroksitirozolün, erkek fertilitesinde önemli rolleri olan ve testis hücrelerini oksidatif strese karşı koruyan Prdx6 proteinin ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. Çalışma sonunda STZ grubu Prdx6 ekspresyonunun kontrol ve HT grubuna kıyasla önemli derecede arttığını, ancak hidroksitirozol verilen STZ+HT grubunda tüm gruplara göre anlamlı derecede azaldığını belirledik. Hidroksitirozolün STZ+HT testis hücrelerinde Prdx6 ekspresyonunu STZ grubuna göre azalttığını belirledik.

Bu çalışmada kontrol ve HT grupları Prdx6 ekspresyonu benzerdi. Ancak diyabet oluşturmak için streptozotosin uygulanan STZ grubu Prdx6 ekspresyonu kontrol ve HT grubuna kıyasla belirgin şekilde artmıştır. Oksidatif stres diyabet oluşumu ve komplikasyonlarının ilerlemesinde ciddi bir temel role sahiptir [89]. Hiperglisemi, serbest radikal üretimini artıran ve antioksidan savunma mekanizmalarını azaltan oksidatif dengesizliği destekleyebilir. Bu dengesizlik lipidler, amino asitler, nükleik asitler ve proteinler gibi hücresel yapılarda ciddi hasara neden olur [90]. Erkek infertilitesinde oksidatif stres önemli bir faktördür [91]. Oksidatif stres testis hasarına neden olan önemli bir faktördür [92]. Metabolizma hızı yüksek olan testis gibi dokularda oksidatif stres yıkıcı olabilmektedir [93]. Diyabetin neden olduğu testis hasarının ana nedenlerinin inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres olduğuna dair artan kanıtlar vardır [94, 95]. Prdx6'nın kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A₂ (iPLA₂) ve peroksidaz aktiviteleri, sperm canlılığı ve motilitenin sürdürülmesi ve karmaşık kapasitasyon sürecinde spermatozoanın dölleme yeteneği kazanabilmesi için ROS'un düzenlenmesinde önemli bir rol oynar [79]. Ayrıca Prdx6'nın insan spermatozoasının tüm hücresel bölümlerinde geniş bir dağılıma sahip

olduğu ve bu da Prdx6'nın spermatozoanın korunmasındaki ana rolünü vurgulamaktadır [81]. Daha önce yapılmış olan bu çalışmalar dikkate alındığında, STZ grubunda, streptozotosin ile indüklenmiş diyabete bağlı oluşan hipergliseminin sebep olduğu oksidatif stresin tekrar dengelenmesi yani redoks homeostazisinin sağlanabilmesi için Prdx6 ekspresyonu artmış olabilir.

Bu çalışmada streptozotosin ile diyabet oluşturulduktan sonra hidroksitirozol uygulanan STZ+HT grubunda, Prdx6 ekspresyonu kontrol, HT ve STZ gruplarına kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Farklı çalışmalarda, diyabetik erkekler ve diyabetik hayvan modellerinde, değişmiş spermatogenez, testislerde dejeneratif ve apoptotik değişiklikler, Sertoli/kan testis bariyerinde değişen glukoz metabolizması, azalmış testosteron sentezi ve sekresyonu, ejakülatuar disfonksiyon ve azalmış libido gözlenmiştir [48]. Diyabetin neden olduğu testis hasarının ana nedenleri inflamasyon ve oksidatif stresir [94, 95]. HT, testiküler doku mimarisini restore eder ve oksidatif DNA hasarı ve apoptozun bir göstergesini önemli ölçüde azaltır. HT ile tedavi edilen diyabetik hayvanlarda oksidatif enzimatik aktivite, lipid oksidasyon seviyeleri ve sperm sayısı ve morfolojisi eski haline döner [14]. Hidroksitirozol testiküler hasardaki biyokimyasal ve histolojik değişiklikleri rahatlatır [96]. Hidroksitirozol ve zeytinyağı, hiperlipideminin neden olduğu seks hormonlarının seviyesinde azalma ve testislerde birçok histolojik bozuklukla ilişkili olan oksidatif stresin ortaya çıkmasını baskılar [97]. Literatürde hidroksitirozolün, testis üzerine antioksidatif ve antiapoptotik etkileri, testis üzerine olumsuz durumlarda seks hormonu seviyelerini, sperm sayısı ve morfolojisini korumada önemli olduğu açıkça gözlenmektedir. Bu çalışmada da sadece streptozotosin verilmesiyle STZ grubunda önemli ölçüde artan Prdx6, streptozotosine ek olarak hidroksitirozol verilmesiyle STZ+HT grubunda ciddi derecede azalmıştır. Bunun sebebi hidroksitirozolün, testis üzerinde gözlenen antioksidatif, antiapoptotik ve sitoprotektatif etkilerini Prdx6 yolağı üzerinden yapmamasından kaynaklanıyor olabilir. Dolayısıyla Prdx6 yolağı ile etkileşime girmeyen hidroksitirozol testis üzerindeki koruyucu rolünü başka yollar üzerinden gerçekleştiriyor olabilir. Hidroksitirozolün aktive ettiği diğer yollar testisteki oksidatif hasarı düzenlediğinden, antioksidatif enzim olarak Prdx6 proteinine ihtiyaç kalmamasından dolayı Prdx6'nın hücre içinde transkripsiyonu baskılanmış olabilir. Bu durum bize Prdx6 proteinin seviyesinin düşmesini açıklamaktadır.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışma ile streptozotosin indüklü diyabetin neden olduğu oksidatif stresin, spermatozoanın canlılığı, hareketliliği ve fertilizasyon yeteneğinde önemli rol oynayan Prdx6 proteininin ekspresyonunu rat testislerinde artırdığını gösterdik. Ayrıca zeytinyağında bolca bulunan ve Akdeniz diyetinde yaygın olarak kullanılan, testislerde diyabete bağlı meydana gelen spermatogenik fonksiyon hasarını azaltan ve bu hasara karşı koruyucu fonksiyon gören hidroksitirozolün testisteki rahatlatıcı etkisini Prdx6 yolağından bağımsız yaptığını belirledik. Hidroksitirozolün testis üzerinde koruyucu etkilerini tam anlamıyla tanımlayabilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Cole, J.B. and J.C. Florez, "Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications". *Nat Rev Nephrol.* **16**(7): p. 377-390 , 2020.
- [2] Song, K., et al., "Targeting APLN/APJ restores blood-testis barrier and improves spermatogenesis in murine and human diabetic models". *Nat Commun*, **13**(1): p. 7335, 2022.
- [3] He, Z., et al., "Diabetes Mellitus Causes Male Reproductive Dysfunction: A Review of the Evidence and Mechanisms". *In Vivo*, **35**(5): p. 2503-2511, 2021.
- [4] Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications". *Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med*, **15**(7): p. 539-53, 1998.
- [5] Harreiter, J. and M. Roden, "Diabetes mellitus-Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019)". *Wien Klin Wochenschr*, **131**(Suppl 1): p. 6-15, 2019.
- [6] American Diabetes, A., "2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018". *Diabetes Care*, **41**(Suppl 1): p. S13-S27, 2018.
- [7] Kumar, G.G., et al., "Oral administration of *Turnera diffusa* willd. ex Schult. extract ameliorates steroidogenesis and spermatogenesis impairment in the testes of rats with type-2 diabetes mellitus". *J Ethnopharmacol*, **314**: p. 116638, 2023.
- [8] Gaunay, G., H.M. Nagler, and D.S. Stember, "Reproductive sequelae of diabetes in male patients". *Endocrinol Metab Clin North Am*, **42**(4): p. 899-914, 2013.
- [9] Facondo, P., et al., "The impact of diabetes mellitus type 1 on male fertility: Systematic review and meta-analysis". *Andrology*, **10**(3): p. 426-440, 2022.
- [10] Barkabi-Zanjani, S., et al., "Diabetes mellitus and the impairment of male reproductive function: Possible signaling pathways". *Diabetes Metab Syndr*, **14**(5): p. 1307-1314, 2020.
- [11] Xu, R., et al., "Diabetes-Induced Autophagy Dysregulation Engenders Testicular Impairment via Oxidative Stress". *Oxid Med Cell Longev.*, **2023**: p. 4365895, 2023.
- [12] Kianifard, D., R.A. Sadrkhanlou, and S. Hasanzadeh, "The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes". *Iran J Basic Med Sci*, **15**(1): p. 623-35, 2012.

- [13] Perez de la Lastra, J.M., et al., "Hydroxytyrosol and Arginine as Antioxidant, Anti-Inflammatory and Immunostimulant Dietary Supplements for COVID-19 and Long COVID". *Foods*, **12**(10), 2023.
- [14] Alsemeh, A.E., M.A. Samak, and S.S.A. El-Fatah, "Therapeutic prospects of hydroxytyrosol on experimentally induced diabetic testicular damage: potential interplay with AMPK expression". *Cell Tissue Res*, **380**(1): p. 173-189, 2020.
- [15] Soyulu, H. and K. Karacor, "The effects of hydroxytyrosol on Prdx6 and insulin expression in diabetic rat pancreases". *Histochem Cell Biol*, 2023.
- [16] O'Flaherty, C., et al., "Protective Role of Peroxiredoxins against Reactive Oxygen Species in Neonatal Rat Testicular Gonocytes". *Antioxidants (Basel)*, **9**(1), 2019.
- [17] Furman, B.L., "Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats". *Curr Protoc.*, **1**(4): p. e78, 2021
- [18] MESCHER, A.L., *Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas*. 13th ed, ed. P.D.S. Solakoğlu. 2015, Nobel Tıp Kitabevleri.
- [19] P, A.A., T.C. Arbor, and K. Krishan, *Embryology, Sexual Development*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
- [20] Sadler, D.T.W., *Langman's Medical Embryology*. 14th ed. 2019, Philadelphia: Wolters Kluwer.
- [21] Tiwana, M.S. and S.W. Leslie, *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Testicle*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
- [22] Eşrefoğlu, P.D.M., *Genel ve Özel Histoloji*, ed. M. Eşrefoğlu. 2004, Malatya: Pelikan Yayıncılık.
- [23] Gartner, L.P., and James L. Hiatt. , *Concise Histology E-Book*. 4th ed. 2010: Elsevier Health Sciences,.
- [24] Kierszenbaum, A.L., and Laura Tres. . Elsevier Health Sciences, 2015., *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology*. 6th ed. 2012, Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- [25] James L. Hiatt, L.P.G., *BRS Hücre Biyolojisi ve Histoloji*. 1st ed. 2016, İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi.
- [26] Nakata, H., S. Iseki, and A. Mizokami, "Three-dimensional reconstruction of testis cords/seminiferous tubules". *Reprod Med Biol*, **20**(4): p. 402-409, 2021.
- [27] Hassa, H., *İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları*. 2003, Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Basımevi.
- [28] Suede, S.H., A. Malik, and A. Sapra, *Histology, Spermatogenesis*, in *StatPearls*.

2023: Treasure Island (FL).

- [29] Michael H. Ross, G.I.K., Wojciech Pawlina, *Histology a Text and Atlas with Cell and Molecular Biology*. 4th ed. 2003, Lippincott Williams&Wilkins.
- [30] Shah, W., et al., "The Molecular Mechanism of Sex Hormones on Sertoli Cell Development and Proliferation". *Front Endocrinol (Lausanne)*, **12**: p. 648141, 2021.
- [31] Sapra, A. and P. Bhandari, *Diabetes Mellitus*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
- [32] John E. Hall, M.E.H., *Tıbbi Fizyoloji*. 12th ed. 2013, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- [33] *Diabetes Tipo 1 y Tipo 2*, in *Mother To Baby | Fact Sheets*. 1994: Brentwood (TN).
- [34] Goyal, R., I. Jialal, and M. Castano, *Diabetes Mellitus Type 2 (Nursing)*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
- [35] Solis-Herrera, C., et al., *Classification of Diabetes Mellitus*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
- [36] Goyal, R. and I. Jialal, *Diabetes Mellitus Type 2*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
- [37] Davis, H.A., et al., *Hypoglycemia During Therapy of Diabetes*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
- [38] Lucier, J. and R.S. Weinstock, *Diabetes Mellitus Type 1*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
- [39] Milanesi, A. and J.E. Weinreb, *Diabetes in the Elderly*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
- [40] Mallidis, C., et al., "Advanced glycation end products accumulate in the reproductive tract of men with diabetes". *Int J Androl*, **32**(4): p. 295-305, 2009.
- [41] Maneesh, M., et al., "Impaired hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in men with diabetes mellitus". *Indian J Clin Biochem*, **21**(1): p. 165-8, 2006.
- [42] Sairam, M.R. and H. Krishnamurthy, "The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models". *Arch Med Res*, **32**(6): p. 601-8, 2001.
- [43] Mari, M., et al., "CYP2E1-dependent toxicity and up-regulation of antioxidant genes". *J Biomed Sci*, **8**(1): p. 52-8, 2001.
- [44] Lei, Z.M., et al., "Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy". *Biol Reprod*, **71**(5):

p. 1605-13, 2004.

- [45] Schoeller, E.L., S. Schon, and K.H. Moley, "The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis". *Cell Tissue Res*, **349**(3): p. 839-47, 2012.
- [46] Fujikawa, T., et al., "Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(40): p. 17391-6, 2010.
- [47] Bruning, J.C., et al., "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction". *Science*, **289**(5487): p. 2122-., 2000.
- [48] Barash, I.A., et al., "Leptin is a metabolic signal to the reproductive system". *Endocrinology*, **137**(7): p. 3144-7, 1996.
- [49] Omolaoye, T. and S.S. Du Plessis, *Diabetes mellitus and male infertility*. 2018.
- [50] Zini, A. and A. Agarwal, *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*. 2011: Springer.
- [51] Ali, S.T., et al., "Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy". *Arch Androl*, **30**(1): p. 47-54, 1993.
- [52] Seethalakshmi, L., M. Menon, and D. Diamond, "The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat". *J Urol*, **138**(1): p. 190-4, 1987.
- [53] Basmatzou, T. and K. Hatziveis, "Diabetes mellitus and influences on human fertility". *Int J Caring Sci*, **9**(1): p. 371-9, 2016.
- [54] Condorelli, R.A., et al., "Diabetes Mellitus and Infertility: Different Pathophysiological Effects in Type 1 and Type 2 on Sperm Function". *Front Endocrinol (Lausanne)*, **9**: p. 268, 2018.
- [55] Silvestroni, L., A. Modesti, and C. Sartori, "Insulin-sperm interaction: effects on plasma membrane and binding to acrosome". *Arch Androl*, **28**(3): p. 201-11, 1992.
- [56] Mallidis, C., et al., "Advanced glycation end products accumulate in the reproductive tract of men with diabetes". *International journal of andrology*, **32**(4): p. 295-305, 2009.
- [57] Lopez-Miranda, J., et al., "Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008". *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **20**(4): p. 284-94, 2010.
- [58] Estruch, R., et al., "Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts". *N Engl J Med*, **378**(25): p. e34, 2018.
- [59] Piroddi, M., et al., "Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review". *Biofactors*,

43(1): p. 17-41, 2017.

- [60] Rodriguez-Morato, J., et al., "Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases". *Molecules*, **20**(3): p. 4655-80, 2015.
- [61] Fabiani, R., "Anti-cancer properties of olive oil secoiridoid phenols: a systematic review of in vivo studies". *Food Funct*, **7**(10): p. 4145-4159, 2016.
- [62] Rigacci, S. and M. Stefani, "Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans". *Int J Mol Sci*, **17**(6), 2016.
- [63] Karkovic Markovic, A., et al., "Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health". *Molecules*, **24**(10), 2019.
- [64] Gallardo-Fernandez, M., et al., "Hydroxytyrosol in Foods: Analysis, Food Sources, EU Dietary Intake, and Potential Uses". *Foods*, **11**(15), 2022.
- [65] Rocha, J., N. Borges, and O. Pinho, "Table olives and health: a review". *J Nutr Sci*, **9**: p. e57, 2020.
- [66] Lopez-Villodres, J.A., et al., "Effects of hydroxytyrosol on cardiovascular biomarkers in experimental diabetes mellitus". *J Nutr Biochem*, **37**: p. 94-100, 2016.
- [67] Reyes, J.J., et al., "Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetes Mellitus". *J Agric Food Chem.*, **65**(22): p. 4378-4383, 2017
- [68] Crespo, M.C., et al., "Hydroxytyrosol restores proper insulin signaling in an astrocytic model of Alzheimer's disease". *Biofactors*, **43**(4): p. 540-548, 2017.
- [69] Arangia, A., et al., "Hydroxytyrosol and Its Potential Uses on Intestinal and Gastrointestinal Disease". *Int J Mol Sci*, **24**(4), 2023.
- [70] Lee, D., et al., "Peroxiredoxins prevent oxidative stress during human sperm capacitation". *Mol Hum Reprod*, **23**(2): p. 106-115, 2017.
- [71] Dubuisson, M., et al., "Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase". *FEBS Lett*, **571**(1-3): p. 161-5, 2004.
- [72] Chowhan, R.K., H. Rahaman, and L.R. Singh, "Structural basis of peroxidase catalytic cycle of human Prdx6". *Sci Rep.*, **10**(1): p. 17416, 2020.
- [73] Lee, Y.J., "Knockout Mouse Models for Peroxiredoxins". *Antioxidants (Basel)*, **9**(2), 2020.
- [74] Patel, P. and S. Chatterjee, "Peroxiredoxin6 in Endothelial Signaling". *Antioxidants (Basel)*, **8**(3), 2019.

- [75] Wahlig, S., M. Lovatt, and J.S. Mehta, "Functional role of peroxiredoxin 6 in the eye". *Free Radic Biol Med*, **126**: p. 210-220, 2018.
- [76] O'Flaherty, C., "Peroxiredoxin 6: The Protector of Male Fertility". *Antioxidants (Basel)*, **7**(12), 2018
- [77] Bushnik, T., et al., "Estimating the prevalence of infertility in Canada". *Hum Reprod*, **27**(3): p. 738-46, 2012.
- [78] Gong, S., et al., "Low amounts and high thiol oxidation of peroxiredoxins in spermatozoa from infertile men". *J Androl*, **33**(6): p. 1342-51, 2012.
- [79] Fernandez, M.C. and C. O'Flaherty, "Peroxiredoxin 6 is the primary antioxidant enzyme for the maintenance of viability and DNA integrity in human spermatozoa". *Hum Reprod*, **33**(8): p. 1394-1407, 2018.
- [80] Ozkosem, B., et al., "Absence of Peroxiredoxin 6 Amplifies the Effect of Oxidant Stress on Mobility and SCSA/CMA3 Defined Chromatin Quality and Impairs Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa". *Biol Reprod*, **94**(3): p. 68, 2016.
- [81] O'Flaherty, C. and A.R. de Souza, "Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner". *Biol Reprod*, **84**(2): p. 238-47, 2011.
- [82] Shi, H., et al., "Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H₂O₂-induced damage to spermatozoa". *Folia Histochem Cytobiol*, **56**(3): p. 141-150, 2018.
- [83] Udler, M.S., "Type 2 Diabetes: Multiple Genes, Multiple Diseases". *Curr Diab Rep*, **19**(8): p. 55, 2019.
- [84] Mauri-Obradors, E., et al., "Oral manifestations of Diabetes Mellitus. A systematic review". *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, **22**(5): p. e586-e594, 2017.
- [85] Tandon, N., M.K. Ali, and K.M. Narayan, "Pharmacologic prevention of microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: implications of the results of recent clinical trials in type 2 diabetes". *Am J Cardiovasc Drugs*, **12**(1): p. 7-22, 2012.
- [86] Roden, M., "Diabetes mellitus: definition, classification and diagnosis". *Wien Klin Wochenschr*, **128 Suppl 2**: p. S37-40, 2016.
- [87] Maresch, C.C., et al., "Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review". *Hum Reprod Update*, **24**(1): p. 86-105, 2018.
- [88] Bertelli, M., et al., "Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities". *J Biotechnol*, **309**: p. 29-33, 2020.
- [89] Barnham, K.J., C.L. Masters, and A.I. Bush, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress". *Nat Rev Drug Discov*, **3**(3): p. 205-14, 2004.

- [90] Valko, M., et al., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *Int J Biochem Cell Biol*, **39**(1): p. 44-84, 2007.
- [91] Agarwal, A., S. Gupta, and S. Sikka, "The role of free radicals and antioxidants in reproduction". *Curr Opin Obstet Gynecol*, **18**(3): p. 325-32, 2006.
- [92] Oladipo, G.O., et al., "Quail (*Coturnix japonica*) egg yolk bioactive components attenuate streptozotocin-induced testicular damage and oxidative stress in diabetic rats". *Eur J Nutr*, **57**(8): p. 2857-2867, 2018.
- [93] Turner, T.T. and J.J. Lysiak, "Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction". *J Androl*, **29**(5): p. 488-98, 2008.
- [94] Khosravi, Z., et al., "Diosgenin ameliorates testicular damage in streptozotocin-diabetic rats through attenuation of apoptosis, oxidative stress, and inflammation". *Int Immunopharmacol*, **70**: p. 37-46, 2019.
- [95] Yaribeygi, H., et al., "Antioxidative potential of antidiabetic agents: A possible protective mechanism against vascular complications in diabetic patients". *J Cell Physiol*, **234**(3): p. 2436-2446, 2019.
- [96] Mahmoudi, A., et al., "Comparative study of the effect of oleuropein and hydroxytyrosol rich extracts on the reproductive toxicity induced by bisphenol A in male rats: biochemical, histopathological, and molecular analyses". *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023.
- [97] QaysAssiAhmed, K.K.A., Huda Saber KhalafHassan, "The Effect OfOlive Oil(Oo) AndHydroxytyrosol (Hxt) In Improving TheLevel Of Sex Hormones And Suppressing Oxidative Stress And Histopathological Of The Testes Caused By Hyperlipidemia In Male Rats". *Nat. Volatiles & Essent. Oils*, **8**(4): p. 13072-13086, 2021.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayfer GÜNGÖR

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Düzce Üniversitesi	2023
Lisans	Biyoloji Bölümü	Uludağ Üniversitesi	2000
Lise		Düzce Lisesi	1993