

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

**KU70, SIRT1 VE SIRT6 PROTEİNLERİNİN DİYABETİK
TESTİS DOKUSUNDAKİ ROLÜ**

(Doktora Tezi)

Selim DEMİRTAŞ

Referans no: 10120967

EDİRNE – 2020

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

**KU70, SIRT1 VE SIRT6 PROTEİNLERİNİN DİYABETİK
TESTİS DOKUSUNDAKİ ROLÜ**

(Doktora Tezi)

Selim DEMİRTAŞ

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi-2017/184

Tez No :

EDİRNE – 2020

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'ın danışmanlığında, doktora öğrencisi Selim DEMİRTAŞ tarafından tez başlığı "KU70, SIRT1 ve SIRT6 Proteinlerinin Diyabetik Testis Dokusundaki Rolü" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 15/05/2020 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Doktora Tezi" olarak kabul edilmiştir.

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI
Prof.Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Prof. Dr. Feriha ERCAN
ÜYE

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK
ÜYE

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Prof. Dr. Enis ULUÇAM
ÜYE

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

YetiŖmemde çok büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen değerli aileme minnettarım. Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaŖarak, bana yardımcı olan baŖta danıŖmanım Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAALIŖIR, Doç. Dr. YeŖim Hlyla UZ, Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e ve Trakya Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Bölümünün tüm alıŖanlarına katkılarından dolayı sonsuz teŖekkrlerimi sunarım. Ayrıca bu alıŖmama mali destek sağlayan TÜBAP'a teŖekkr bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	4
DİABETES MELLİTUS.....	4
STREPTOZOTOSİN VE DENEYSEL DİYABET MODELLERİ.....	6
TESTİS ANATOMİSİ	8
TESTİS GELİŞİMİ	10
TESTİS HİSTOLOJİSİ	11
DİYABET VE ERKEK İNFERTİLİTESİ	13
APOPTOZİS	14
KU70	17
SIRTUİNLER.....	20
SIRTUİN 1	21
SIRTUİN 6	24
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
BULGULAR	32
TARTIŞMA.....	51
SONUÇLAR.....	61
ÖZET	63
SUMMARY	65
KAYNAKLAR.....	67
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	83
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ATP	: Adenozin 3'-Trifosfat
Bax	: Bcl-2 İlişkili X
Bcl-2	: B-Hücre Lenfoma 2
CAD	: Kaspaz Aktive Edici Dnaz
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNA-PKcs	: DNA İlişkili Protein Kinaz Katalitik Alt Ünitesi
H-E	: Hematoksilen-Eosin
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NF-κB	: Nükleer Faktör κB
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SIRT	: Sirtuin
STZ	: Streptozotosin
TUNEL	: Terminal Transferaz-Aracılı dUTP Nick Uç-Etiketleme

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM, Diyabet), insülin sekresyonundaki kusurlara bağılı olarak ortaya çıkan, kronik metabolik bir hastalıktır (1, 2). DM, dünya nüfusunun ortalama % 8.4'nü etkilemektedir. 2019 yılında, dünyada 461 milyon olan diyabetli birey sayısının, 2045 yılında 700 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin verilerine göre diyabet ve buna bağılı komplikasyonların tedavisine, 2019 yılı itibariyle 763 milyar dolar harcandığı belirtilmiştir (3, 4).

Nöropati, retinopati, nefropati, mikro ve makrovasküler patolojiler, diyabete bağılı olarak ortaya çıkan başlıca komplikasyonlardır (5-7). Bunların yanı sıra, diyabetik erkeklerde anormal sperm üretimi ve seksüel disfonksiyonlar da, diyabetin uzun dönem komplikasyonları arasında kabul edilmektedir. Diyabetik sıçanlarda yapılan çalışmalarda; testis ağırlığında, testosteron seviyelerinde, sperm sayı ve motilitelerindeki azalma ile birlikte, anormal spermatogeneziste artış olduğu görülmüştür (8-13). Diyabetik bireylerde karşılaşılan testiküler disfonksiyonun altında yatan moleküler mekanizmalar, tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak apoptotik yollaklarda yer alan birçok proteinin, bu süreçte rol oynadığı düşünülmektedir.

Programlı hücre ölümü olan apoptozis, canlının normal gelişme sürecinde, dokulardaki hücre popülasyonunu korumak için meydana gelen homeostatik bir mekanizma olduğu gibi, hastalıkların patolojisine bağılı olarak da ortaya çıkmaktadır (14-16). Apoptozisin nedenleri arasında DNA (Deoksiribonükleik Asit) hasarları oldukça önemli bir yer kapsamaktadır. DNA çapraz bağlanmaları, tek ve çift zincir kırıkları gibi hasarlanmalar, apoptozise yol açmaktadır. Aynı zamanda hasarlı DNA'ların hücre içinde birikmesi ya da DNA tamir mekanizmalarında meydana gelen başarısızlıklar, dokularda histopatolojilere neden olabilmektedir (17, 18).

Homolog olmayan uç birleştirme (Non homologous end joining-NHEJ), DNA çift zincir kırıklarının tamirinde yer alan iki ana mekanizmadan biridir (19). KU70 ise DNA çift zincir kırıklarında, NHEJ yolağında görevli bir proteindir (20-22). NHEJ’de çift zincir kırık uçları, KU70 ve KU80 ile stabilize edilir. KU70, KU80 ile beraber KU heterodimerini oluşturur ve DNA ilişkili protein kinaz katalitik alt ünitesi (DNA-PKcs) ile beraber tamir mekanizmasında rol oynarlar. KU proteinlerinin DNA tamiri dışında; hücre sinyali, proliferasyon, replikasyon, transkripsiyon aktivasyonu ve apoptoziste görevli olduğu bilinmektedir (19, 23, 24). KU70, Bax aktivitesini baskılayarak, apoptozisin düzenlenmesinde görev almaktadır. Hücre içinde, hem sitoplazmada hem de nükleusta lokalizedir (24, 25). Araştırmalar KU70’in; NHEJ mekanizmasındaki rolüne ek olarak, proliferasyon, insülin homeostazi ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde de görevli olabileceğini göstermektedir. Hipergliseminin, KU70 asetilasyonunu yükselttiği ve buna bağlı olarak Bax aktivitesinin arttığı ifade edilmektedir (19, 26, 27).

Sirtuin (SIRT) ailesi; nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı, sınıf III deasetilaz enzimler’dir. Memelilerde 7 tipi bulunur (SIRT1-SIRT7). SIRT1; p53, p73, E2 Faktör-1 (E2F1) ve KU70 gibi proteinleri hedefleyerek, apoptoziste önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, insülin metabolizması üzerinde de etkili olduğu ve pankreas beta (β) hücrelerinde aşırı ifade edildiğinde, insülin sekresyonunu ve adenozin 3'-trifosfat (ATP) üretimini arttırdığı gösterilmiştir. SIRT1, NHEJ’de KU70’i deasetilize ederek, Bax’ı baskılamakta ve DNA onarımına katılmaktadır. Aynı zamanda sitoplazmada KU70’i deasetilize ederek, KU70/Bax bağlantısını sağlamakta ve apoptozisi inhibe etmektedir (28-30). Testis ve böbrekler üzerinde yapılan diyabet çalışmalarında, diyabete bağlı apoptozisi baskıladığı görülmektedir (31, 32). Araştırmalarda SIRT1 genlerinin baskılanmasının, sperm sayısında azalma, anormal sperm morfolojisi ve ovulasyon bozukluklarına sebep olduğu da ileri sürülmektedir (33-35).

SIRT6 ise DNA tek zincir kırıkları tamir mekanizmasında, baz eksizyon tamiri (BER) yolağında görev almaktadır. NHEJ’de DNA ilişkili protein kinaz (DNA-PK)’yı stabilize ederek, çift zincir kırıkları tamirinde de rol üstlenir. SIRT6 geni baskılanmış farelerde; omurga eğriliği metabolik bozukluklar, olgunlaşmadan yaşlanma gibi çeşitli hastalıklar oluşmakta ve bu durumun, SIRT6’nın DNA tamir mekanizmasındaki rolüne bağlı olduğu düşünülmektedir (30, 33, 36). SIRT6, aynen SIRT1 gibi davranarak KU70 deasetilasyonu ile KU70/Bax bağlantısını sağlamakta ve apoptozisi baskılamaktadır (37). Araştırmalar, SIRT6’nın, diyabetin dokularda meydana getirdiği retinopati, nefropati gibi komplikasyonlarda önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir (38, 39).

Diyabete bağlı gelişen infertilite/subfertilite, günümüzde moleküler düzeyde çalışmaların devam ettiği bir konudur. Diyabetli erkek bireylerde karşılaşılan testiküler disfonksiyonda,

Özellikle apoptozis mekanizmalarındaki proteinlerin, faktörlerin ve sinyal yolaklarının anahtar rolü olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bu faktörler üzerindeki çalışmalar, diyabetik testis dokularında meydana gelen hasarların önlenebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

KU70, SIRT1 ve SIRT6 proteinlerinin; gerek DNA tamir mekanizmalarındaki gerekse apoptotik yolaklardaki fonksiyonları göz önüne alındığında, bu proteinlerin farklı doku histopatolojilerinin ortaya çıkması ya da ortadan kaldırılmasında rol alabileceklerinin düşünülmesi kaçınılmazdır.

Buradan hareketle planladığımız bu çalışmada, diyabetik testis dokularında KU70, SIRT1 ve SIRT6 proteinlerinin, apoptozis mekanizmalarında ve neden olduğu infertilitedeki olası rollerinin belirlenmesi, böylece yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

DIABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus, insülin hormonunun yetersizliği ya da insülin direnci ile oluşan, hiperglisemi ile kendini belli eden, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları ile karakterize kronik bir metabolizma hastalığıdır (2, 40-43).

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun verilerine göre, günümüzde, 20-79 yaş aralığında diyabetli birey sayısının 463 milyon olduğu, bu sayının 2030 yılında 578 milyona ve 2045 yılında 700 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Ülkemizde, 2045 yılında 20-79 yaş aralığında diyabetli birey sayısının 10.4 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (3).

Diyabet, uzun dönemde çeşitli organlara ve sistemlere zarar vermektedir. Bu organ ve sistemler arasında; dolaşım sistemi, böbrekler, sinirler ve testisler yer almaktadır (5, 6, 11, 12).

Amerikan Diyabet Birliği (ADA)'nin 2019 yılı itibarıyla gösterdiği tanı kriterlerine göre; glukozüri, polidipsi, poliüri, ketonüri ve açıklanamayan ağırlık kaybı gibi semptomlar ile birlikte, rastgele ölçülen plazma glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl olması, 8 saatlik açlıktan sonra ölçülen açlık kan şekeri (AKŞ)'nin ≥ 126 mg/dl bulunması ya da 75 gr glukoz veya eşdeğerini içeren glukoz yükü alımından sonra 2. saatte ölçülen plazma glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl olması ile DM tanısı konmaktadır (4).

Diabetes mellitus Sınıflandırması

1970'lerin sonunda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Ulusal Diyabet Veri Grubu (NDDG), DM için yeni tanı kriterleri ve yeni bir sınıflandırma sistemi ileri sürdü. Genel kabul gören ilk sınıflandırma ise 1980 yılında WHO tarafından yayınlanmıştır (44, 45). 2019 yılında yayınlanan ADA raporundaki güncel sınıflandırma (4) ise şöyledir;

Tip 1 diyabet: Tüm diyabet olgularının yaklaşık %5-10'unu oluşturan bu diyabet tipi, insüline bağımlı diyabet ya da juvenil diyabet olarak da adlandırılmaktadır. İmmün sistemin, pankreastaki β hücrelerine saldırdığı bir otoimmün reaksiyon olarak ortaya çıkar. Sonuç olarak, vücut ihtiyacı olan insülini uzun süre alamazsa ağır sorunlara yol açmaktadır (46, 47). Risk faktörleri içerisinde; yaş, cinsiyet, ırk, genotip, coğrafi konum ve mevsimsellik gibi faktörler bulunur ve semptomları aniden gelişmeye başlar. Ağız kuruluğu, ani kilo kaybı, halsizlik, idrarda sıklık ve görmede bulanıklık gibi semptomlar bulunur (2, 46). Yapılan araştırmalar, Tip 1 diyabetin özellikle çocuklarda her yıl %3 oranında arttığını göstermektedir. IDF'nin 'Bir çocuk için yaşam programı' çerçevesinde; 46 ülkedeki 17000 diyabetli çocuğa insülin tedarik edilmektedir. Glutamik asit dekarboksilaz 65 (GAD65), çinko taşıyıcı 8 (ZnT8) otoantikorları, tirozin fosfataz bağlı adacık antijen 2 (IA-2 ve IA-2 β), Tip 1 diyabet tanısında önemli belirteçlerdir (4, 48).

Tip 2 diyabet: İnsüline bağımlı olmayan diyabet olarak da bilinir. İnsülin eksikliği etkisindeki sorunlar nedeniyle organizma, karbonhidrat, yağ ve proteinden yeterince yararlanamaz (42, 49).

Hücre reseptör defektine bağlı olarak insülin, hücre içerisine alınamaz ve bu sebeple, periferik dokularda insülin etkisi yetersiz olur. Pankreas, kan-glukoz düzeylerine yanıt olarak yeteri kadar insülin salgılayamaz ve karaciğerde glukoz üretiminde artış meydana gelir. Bu artıştan, insülin sekresyonundaki sorunların yanı sıra, sabaha karşı daha aktif olan kontrinsüliner sistem hormonları sorumludur. Genetik, çevresel ve davranışsal risk faktörleri arasındaki etkileşim, bu sonucu doğurmaktadır. Bu hastalığa sahip kişilerde, kısa ve uzun vadeli komplikasyonlar görülmesi kaçınılmazdır ve çoğu zaman erken ölümlere neden olur (2, 4, 42, 49).

Tip 2 diyabet tedavisinde insülin ihtiyacına ilişkin görüş birliği mevcuttur. Yaşam tarzında değişiklik, daha hareketli bir yaşam, obezite tedavisi ve oral hipoglisemik ajanlar önerilen tedavide etkili olmaktadır (49, 50). Ketoasidoz nadiren oluşur ve görüldüğünde enfeksiyon gibi nedenlerin oluşturduğu stresle ortaya çıkar. Tip 2 diyabetli hastaların çoğunda obezite görülmektedir. Tip 2 diyabette tanı konulması zordur, çünkü yavaş yavaş gelişir ve erken evrede klasik semptomların farkedilebilmesi için yeterince şiddetli değildir. Hastalık, erişkin yaşlarda daha sık ortaya çıkmaktadır (2, 51).

Gestasyonel diyabet: Gebeliğin 2. veya 3. trimesterinde tanısı konan ve gebelikten önce glukoz intoleransı görülmeyen bir diyabet tipidir. Risk faktörleri olarak; gebelik boyunca

görülmesi, hem anne hem de çocuk için ciddi sağlık sorunlarına sebep olması ve daha sonraki yaşamlarında Tip 2 diyabet oluşması olasılığının yüksek olması önemlidir (2, 4).

Tüm gebeliklerde tarama testleri gebeliğin 24-28. haftaları arasında yapılmaktadır. İncelenen popülasyona bağlı olarak, gebeliklerin %1-14 'ünü etkilemektedir (4, 52, 53).

Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri: Ekzokrin pankreas hastalıkları, ilaç veya kimyasal ajanlara maruziyet, çeşitli patolojiler, β hücresi genetik defektleri gibi durumlar sonucu görülebilmektedir (4, 40).

STREPTOZOTOSİN VE DENEYSEL DİYABET MODELLERİ

Deneysel diyabet modelleri oluşturmak için, günümüzde belli başlı mekanizmalar geliştirilmiştir. Hayvanlarda yapılan modellemeler, hiçbir zaman insan diyabetine eşdeğer tutulmasa da, diyabet çalışmaları açısından bu yöntemler büyük önem taşımaktadır (54).

Hiperглиsemi oluşum mekanizmasının aydınlatılması, ilk olarak 1880'lerde von Mering'in, yağların bağırsaktan absorpsiyonunu araştırmasıyla başlamıştır. Sonraki süreçte Minkowski'nin bir köpekte pankreasın çıkarılmasıyla hiperглиsemi oluştuğunu göstermesiyle, hiperглиsemi çalışmalarında pankreas üzerine yoğunlaşmıştır. Hiperглиsemi oluşturmak için deneysel pankreatektomi yöntemi; öncelikle köpek, tavşan, domuz vb. hayvanlara uygulanmış, sonrasında Hence tarafından sıçan ve fare gibi kemirgenlerde de uygulanmaya başlanmıştır. İnsülinin izole edilmesi, köpek pankreas dokusunda, Marjorie tarafından 1920'de gerçekleştirilmiştir. İnsülinin, pankreasın Langerhans adacıklarından salgılandığı, Banting ve Best'in çalışmalarıyla 1921'de bulunmuştur (54, 55).

Pankreas-insülin ilişkisi hakkındaki bilgilerin artması, diyabetik çalışmalarda, cerrahi dışı çeşitli yöntemlerle pankreasın tahrip edilmesi ya da β hücrelerine spesifik toksinlerin kullanılmasını sağlamıştır (54).

Günümüzde kullanılan deneysel diyabet modelleri (56-58) şu şekilde sıralanabilir:

- Kimyasal diyabet modelleri
 - ✓ Streptozotosin (STZ)
 - ✓ Alloksan
 - ✓ Goldthioglucose
- Cerrahi diyabet modelleri
 - ✓ Pankreatektomi
- Genetik diyabet modelleri
- Spontan diyabet modelleri

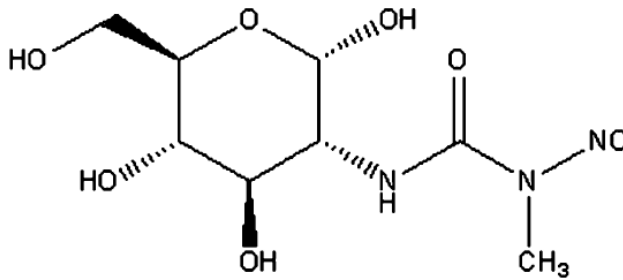
- ✓ Obez modeller
- ✓ Non-obez modeller
- Virüs aracılı diyabet modelleri
- Diyet ve besin aracılı diyabet modelleri

Kimyasal ajanların kullanılması ile oluşturulan deneysel diyabet modellerinde, alloksan, STZ, çinko şelatörleri (8-hidroksikinolin, dithizone), rodentisid-Vacor, diyet nitrozaminleri gibi toksinler denenmiştir. Bunlardan günümüzde en çok tercih edilenleri, STZ (%69) ve alloksandır (%31). İlk kez Dunn ve ark. (59) tarafından 1943'te, alloksanın tavşanlarda, pankreasın beta hücrelerini tahrip etmesiyle kalıcı diyabet oluşturduğu keşfedilmiştir. 1963'te Rakieten ve ark. (60) tarafından, sıçan ve köpeklerde kalıcı diyabet oluşturmasıyla, STZ'nin de benzer etkileri olduğu gösterilmiştir (54, 61).

İkisi karşılaştırıldığında ;

- STZ diyabetinde nöropati daha şiddetlidir,
- Uygulamadan birkaç ay sonra beta hücre rejenerasyonu ve takiben kan şekerinin düşmesi gibi etkiler, STZ'de daha fazladır,
- Alloksan, beta hücreleri dışındaki yapılara STZ'den daha fazla zarar vermektedir,
- Alloksan uygulamasıyla ketozis daha sık görülür,
- Alloksan ile daha yüksek kan şekeri değerlerine ulaşılır (54-56, 61).

Streptomyces achromogenes tarafından sentezlenen STZ'nin kimyasal adı, (2-deoxy-2-([(methylnitrosoamino)carbonyl]amino)-D-glucopyranose) olarak yazılmaktadır (Şekil 1). Molekül ağırlığı 265 g/mol'dür. Geniş spektrumlu bir antibiyotik olan ilacın; neoplastik, antineoplastik ve diyabetojenik özellikleri bulunmaktadır. STZ; nitrozüre analogu olup, daha az lipofiliktir. Stabil olduğu pH, 4-4.5'dur, nötral pH'da hızla dekompanse olur. STZ, -20°C'de ışıktan korunarak saklanmalıdır. Çözeltisi, uygulamadan hemen önce, pH'sı 4 olan sitrat tamponu içinde hazırlanmalı, ışıktan korunarak, hemen kullanılmalıdır (54, 55, 62).



Şekil 1. Streptozotosinin kimyasal yapısı (63).

Streptozotosin, memeli ve bakteri hücrelerinde DNA sentezini önlemektedir. Bakteri hücrelerinde, sitokin grupları ile özel reaksiyon oluşturarak, DNA'da dejenerasyon meydana getirmektedir. Pankreas β hücreleri üzerinde bulunan glukoz taşıyıcı vasıtasıyla (GLUT-2), hücre içine alınır ve DNA'da alkilasyona neden olur. Sonrasında DNA tamiri başlar ve tamir sırasında görev alan poli ADP-riboz polimeraz (PARP), hücre içindeki NAD'ı kullanarak NAD depolarını boşaltır ve ATP içeriğini azaltır. Bu durum β hücrelerinin nekroza uğramasına sebep olur. β hücrelerine alınan STZ, NO'nun hücre içinde serbest kalmasına ve DNA ayrılmasına neden olmaktadır (54, 61, 63).

Streptozotosin oksidan özelliğe sahiptir. STZ uygulaması sonrası ksantin oksidaz sisteminin aktive olduğu ve buna bağlı hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin üretildiği bildirilmektedir. STZ'nin diyabetojenik etkilerinin, GLUT-2 üretiminin azaldığı durumlarda ortadan kalktığı gözlenirken, çoklu dozlarda uygulanan STZ'nin de, GLUT-2 üretimini azalttığı gösterilmiştir (54, 61, 64).

Streptozotosin uygulaması sonrası, kan glukozu değerlerinde, akut trifazik cevap gözlenir (56, 65).

a. Geçici hiperglisemi fazı: İlk 2 saatte oluşup 2-4 arası saat sürmesi beklenir. Karaciğerde glikojenin ani yıkımı sonucu kan şekeri yükselir.

b. Şiddetli hipoglisemi fazı: Uygulamadan 6-10 saat sonra β hücrelerinin ölümüyle kana aşırı miktarda insülin salınır ve plazma seviyeleri yükselir. Uygulama sonrası ilk 24 saatteki ölümlerden bu faz sorumludur. Aç bırakılan hayvanlarda etkileri daha fazla olduğundan, enjeksiyonun tok karnına uygulanması önemlidir.

c. Kalıcı hiperglisemi fazı: Uygulamadan 24 saat sonra, β hücre ölümünü takiben artan insülinin, kandaki düzeylerinin düşmesi ile oluşan hiperglisemidir. Bu fazda; insülin düzeyleri, aylarca düşük seyredir. Poliüri, glukozüri ve hiperglisemi ile karakterizedir. Diyabetojenik ajan uygulanmasında amaç, bu fazın devamlılığını sağlayarak, hayvanın diyabet semptomlarını göstermesidir.

TESTİS ANATOMİSİ

Testisler, sperm üretimi ve endokrin fonksiyonlar için özelleşmiş organlardır. Funiculus spermaticus'a bağlı olarak kıvrımlı bir deri kesesi olan scrotum içerisinde çift halde yer alır. Septum scroti, Scrotum'un iç yüzünü iki ayrı bölmeye ayırır ve testisler bu bölmelerde yer alır (66, 67).

Yetişkinlerde testislerden her biri yaklaşık olarak 10-14 gram ağırlığında, 4-5 cm uzunluğunda ve 2,5 cm enindedir. Elips biçiminde olup, scrotum içerisinde oblik pozisyonda dururlar. Üst ucu anterolaterale, alt ucu ise posteromediale doğru bakar. Testislerin; facies medialis

ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, margo anterior ve margo posterior adı verilen iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior adı verilen iki ucu bulunur (66, 67).

Testisler fütal hayatta karın boşluğu içerisinde, fascia transversalis ile periton arasında gelişir, ancak doğumdan önce canalis inguinalis'ten geçerek scrotum içerisine iner. Karın boşluğundan scrotum içine geçiş yolu olan canalis inguinalis, fütal hayatta testisten scrotum'un iç yüzüne uzanan ve gubernaculum testis adı verilen fibröz yapı ile belirlenir. Fütal gelişimin daha sonraki dönemlerinde, peritonun parmak şeklinde bir çıkıntısı olan processus vaginalis, gubernaculum testis'i izleyerek karın ön duvarından geçer ve scrotum'a ulaşır. Processus vaginalis, geçiş sırasında karın ön duvarı tabakalarını da birlikte sürükler. Normal durumda testisler, doğumdan hemen önce bu yolu takip ederek canalis inguinalis'ten geçer ve scrotum'a iner. Processus vaginalis ise doğumdan kısa bir süre sonra kapanır ve testisin etrafında processus vaginalis'in kalıntısı olan bir tabaka kalır. Bu tabaka tunica vaginalis adını alır (66, 67).

Tunica vaginalis'in iç tarafında, testisi saran tunica albuginea ve tunica vasculosa adı verilen iki tabaka daha bulunur. Tunica albuginea, testisleri dıştan örten kalın fibröz bir tabakadır. Bu tabaka, margo posterior'dan testis içine sokulur ve vertikal bir bölme oluşturur. Bu bölme mediastinum testis adı verilir. Mediastinum testis'in ön ve yan kısmından çıkan septum testis adı verilen uzantılar, testis parankiminden geçerek tunica albuginea'nın iç yüzeyine ulaşır ve testisi lobuli testis adı verilen sayıları 200-300 arasında değişen lobuluslara böler. Lobuli testis'te, tubuli seminiferi contorti ve tubuli seminiferi recti adı verilen, tüp yapısında oluşumlar bulunmaktadır. Tubuli seminiferi contorti'nin duvarı, Sertoli (sustentakuler) ve spermatogenik seri hücreleri ile döşenmiştir. Tubuli seminiferi recti, düzleşen ve sayıları azalan tubuli seminiferi contorti'lerden oluşur. Bu yapılar, birbirleriyle anastomoz yaparak uzanırlar ve rete testis denilen ağı oluştururlar. Lobuli seminiferi contortiler'de üretilen spermatozoonlar rete testis ve ductuli efferentes testis'ten geçerek ductus epididymis'e ulaşır (66, 67).

Pars abdominalis aorta'nın dalı olan sağ ve sol arteria testicularis'ler ile testisin kanlanması sağlanır. Her bir testisin arka tarafından çıkan küçük venler birleşerek plexus pampiniformis adı verilen venöz ağı oluştururlar. Plexus pampiniformis, funiculus spermaticus içinde yükselir ve canalis inguinalis'ten geçerek karın boşluğuna ulaşır. Plexus pampiniformis'i oluşturan venler birleşerek vena testicularis'i oluşturur. V. testicularis dextra, v. cava inferior'a; v. testicularis sinistra ise v. renalis sinistraya dökülür (66).

Yüzeysel lenf damarları tunica vaginalis'in altında, derin lenf damarları ise testis ve epididymis'in içinde yer alır. Bu damarlar funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna geçer ve nodi lymphatici aortici lateralis ve nodi lymphatici pre-aortaci'ye açılır (66).

Testisleri innerve eden sinirler, medulla spinalis'in 10-11. torakal segmentlerinden gelir. Bu sinirler, plexus aorticus ve plexus renalis içinden geçer ve testisleri besleyen damarların çevresinde organa ulaşır (66).

TESTİS GELİŞİMİ

Gonadal gelişim, 5. haftadan itibaren, mezonefrozun medial tarafında kalınlaşmış bir mezotel alanının oluşmasıyla başlar. Bu epitelin ve altında uzanan mezenşim dokusunun proliferasyonu ile mezonefrozun medial tarafında gonadal kabartı adı verilen bir çıkıntı oluşur. Buradaki parmak benzeri epitel kordonları (gonadal kordonlar), kısa süre sonra altta uzanan mezenşim içine doğru büyür. Bununla birlikte farklanmamış gonadlarda bir dış korteks ve bir iç medulla meydana gelir. XX seks kromozomuna sahip embriyolarda, gonadın korteksi overe farklanır ve medulla geriler. XY seks kromozomuna sahip embriyolarda, medulla testise farklanır ve artık kalıntılar dışında korteks geriler (68, 69).

Epiblasttan köken alan primordial germ hücreleri, primitif çizgi boyunca göç ederler ve 3. haftada vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasına yerleşirler. 4. haftada son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek, gonadal kabartılara göç ederler ve 6. haftada gonadal kordonlara katılırlar. Gelişimin 7. haftasında, XY kromozomuna sahip embriyoda primordial germ hücreleri, Y kromozomu üzerindeki testis belirleyici faktörü (TDF) kodlayan seks belirleyici bölge Y (SRY) geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları, testis veya medullar kordonları oluşturmak üzere çoğalmaya devam ederler. Testiküler tayin için gerekli olan bir başka etmen ise transkripsiyon faktörü SOX9'un ekspresyonudur (68, 69).

Testis kordonları, rete testisi meydana getirmek üzere gonadın medullasına doğru dallanır. Gelişimin ilerlemesiyle birlikte tunica albuginea, testis kordonlarını yüzey epitelinden ayırır. Testis, dejenere olan mezonefrozdan ayrılır ve kendi mezenteriyi (mezorkiyum) asılı kalır. Kordonlar seminifer tübüllere, düz tübüllere (tubuli rekti) ve rete testise dönüşür (69, 70).

Seminifer tübüller, interstisyel Leydig hücrelerini oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır. 8. haftada Leydig hücreleri tarafından, mezonefrik kanalların ve dış genital organların erkek yönünde farklılaşmasını uyaran androjenik hormonlar (testosteron ve androstenedion) salgılanır. Testosteron üretimi, gelişimin 8-12. haftaları arasındaki dönemde, human koryonik gonadotropin (hCG) tarafından uyarılır. Testosteron, ayrıca erkek genital sistemin, boşaltım kanallarına dönüşecek olan mezonefrik Wolff kanallarının büyümesinden ve farklılaşmasından da sorumludur (69, 70).

Seminifer tübül duvarında bulunan Sertoli hücreleri tarafından, puberteye kadar mevcut olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibe edici faktör (MIF) salgılanır.

Moleküler yapı olarak, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β)'ye benzeyen AMH ya da MIF, uterus ve tuba uterinaların meydana gelmesini sağlayan paramesonefrik (Müller) kanalların oluşumunu inhibe eder (68-70).

TESTİS HİSTOLOJİSİ

Testisler, dıştan içe sırasıyla Tunica vajinalis, Tunica albuginea ve Tunica vasküloza ile sarılmışlardır. Tunica vajinalis, testislerin scrotum'a inerken sürüklediği abdominal peritonun bir uzantısıdır. Bu tabaka mezotel ile döşeli olup testisin anterolateral yüzeyini kaplar. Testisin en kalın tabakası olan Tunica albuginea, fibroelastik bir bağ doku yapısına sahiptir ve testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Bu yapı içinde testislere giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve spermin geçtiği kanallar bulunur. Kapsülün en iç tabakasını oluşturan Tunica vasküloza ise kan damarları açısından zengin, gevşek bağ dokusu yapısındadır. Kapsülden testis içerisine uzanan ince bağ dokusu uzantıları, testisi, sayıları 200-300 arasında değişen lobüllere ayırır. Lobüllerin her biri, içerisinde sperm üretiminin yapıldığı yüksek düzeyde kıvrımlı, 1-4 adet seminifer tübülden ve tübüllerin etrafını döşeyen; kan damarlarını, sinirleri ve Leydig hücrelerini içeren gevşek bağ dokusundan oluşur. Lobülün içerisindeki her bir tübül bir halka yapar ve uzun olması sebebiyle oldukça kıvrımlıdır. Bu halkanın uçları, testisin mediastinum bölgesinde kısa ve düz bir durumda seyrederek. Seminifer tübülün düz olarak seyrettiği bu bölge tubuli rekti'dir ve mediastinumun içinde anastomozlaşan kanallar olan rete testis ile devam eder (68, 71, 72).

Seminifer tübüller, fibroblast içermeyen tipik çok tabakalı bağ doku yapısındaki lamina propriya tarafından çevrelenmişlerdir. Bu alan, peritübüler doku olarak da adlandırılmaktadır. Lamina propriya, insanda, seminifer tübülün bazal membranı dışında kollajen lifleri ve 3-5 sıra miyoid hücre tabakalarını içerir. Kemirgenlerde ise bu tabaka, tek sıra yassı miyoid hücrelerden oluşur. Miyoid hücreler, bazal lamina ve bol miktarda aktin filamentleri içermeleri sebebiyle düz kas hücrelerine benzer özellikler göstermektedirler. Fibroblastların yokluğunda, kollajen liflerin sentezlenmesinden de sorumludurlar. Bu hücrelerin ritmik kasılmaları sonucu oluşan peristaltik dalgalanmalar ile seminifer tübül lümenindeki olgun sperm ve testiküler sıvı, boşaltım kanallarına aktarılmış olur (68, 71).

Her bir seminifer tübül, 30-70 cm uzunluğunda ve 150-250 μ m çapında olup, bazal membran üzerine yerleşmiş çok katlı epitel olan seminifer (germinal) epitelden oluşmaktadır. Seminifer epitel, temel olarak Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerinden meydana gelmektedir. Sertoli hücreleri, gelişmekte olan sperm hücrelerini koruyan, besleyen ve destekleyen hücrelerdir. Puberte sonrası bölünme yetenekleri bulunmayan bu hücreler; belirgin nükleolus

içeren üçgen veya yuvarlak şekilli ökromatik bir nükleusa sahiptirler. İyi gelişmiş granüllü ve düz endoplazmik retikulum, belirgin Golgi kompleksi, bol mitokondri, lizozom, glikojen granülleri ve lipid damlacıkları bulundurlar (71, 72).

Destek hücreleri olarak da bilinen Sertoli hücreleri puberteden sonra çoğalmazlar. Bazal membrandan tübül lümenine kadar uzanan Sertoli hücreleri, komşu spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen ve bu hücrelerin arasındaki boşlukları dolduran apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir. Nükleusları genellikle oval yada üçgen biçimli olup aktif hücrelerin karakteristik bir özelliği olan ökromatik yapıdadır. İnsanda bazal sitoplazmada karakteristik inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcher) bulunmaktadır. Sertoli hücreleri birbirlerine Sertoli hücresi-Sertoli hücresi bağlantı kompleksleri ile bağlanırlar. Bir bölümünde, komşu membran ile 50'den fazla bağlantı noktası içeren, zonula okludens tipi bağlantılar ile karakterizedir. Sertoli hücreleri, spermiyogenezin son aşamasında oluşan rezidüel cisimcikleri ve farklılaşmayı tamamlayamayan spermatogenik hücreleri fagosite ederler. İçerdikleri özelleşmiş bağlantı kompleksleri sayesinde, spermatogenik seri hücreleri ile organizmanın immün sistemi arasında bir bariyer oluştururlar. Kan-testis bariyeri olarak isimlendirilen bu bariyer ile kan yoluyla gelen zararlı maddelere karşı, germ hücrelerinin korunmasını sağlarlar. Ayrıca androjen bağlayıcı protein (ABP), MIF, inhibin, transferrin ve plazminojen aktivatör gibi maddelerinde salgılanmasından sorumlu hücrelerdir (68, 71, 72).

Seminifer epiteli oluşturan bir diğer hücre popülasyonu, spermatogenik seri hücreleridir. Sertoli hücreleri arasında bulunan bu hücreler, ilerleyici gelişim göstererek sırasıyla; bazal membran üzerine oturan spermatogonyumlar, spermatositler (spermatosit-I, spermatosit-II) ve spermatidlerden oluşan tabakalar halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücrelerin işlevi spermatozoonları meydana getirmektir (71, 72).

Seminifer tübüllerin arasını döşeyen gevşek bağ dokusunda; kan damarları, lenf damarları ve sinirlerin dışında özelleşmiş Leydig hücreleri adı verilen yuvarlak veya poligonal şekilli, yuvarlak nükleuslu ve asidofilik sitoplazmalı hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler sitoplazmalarında tipik olarak lipid damlacıkları, lipofuksin pigmenti ve çubuk şekilli, ayırt edici sitoplazmik kristaller olan Reinke kristallerini bulundurlar. Leydig hücreleri erken fütal dönemde farklılaşarak testosteron hormonu salgırlar. Bu hormon ayrıca, embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma, sperm üretiminin başlatılması ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden de sorumludur (68, 69, 71, 72).

Spermatogenez

Spermatogenez, seminifer tübüllerde olgun sperm üretimi sürecidir. Üç aşamada meydana gelir; spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı (68).

İlk faz olan spermatogonyal fazda; sperm ana hücreleri olan spermatogonyumlar, mitoz bölünme geçirerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve primer spermatositleri meydana getirirler. Tip A koyu spermatogonyumlar, kök hücre görevi görürler. Mitoz bölünmeleri sonucunda, ya Tip A açık spermatogonyumları oluşturular veya kök hücre olarak kalırlar. Tip A açık spermatogonyumlardan, mitoz bölünmeyle Tip B spermatogonyumlar meydana gelir. Tip B spermatogonyumlardan da, mitoz bölünme ile spermatosit-I'ler oluşur (68, 71, 72).

İkinci faz olan spermatosit fazında; spermatosit-I'ler, mayoz bölünme geçirmeden hemen önce DNA'larını replike ederler. Böylece, her spermatosit-I, '2n' kromozom ve '4d' DNA içerir. Kromozom sayıları ve DNA miktarları mayoz I aşamasında yarıya iner. Sonuçta 'n' kromozomlu ve '2d' DNA içeren spermatosit-II'ler meydana gelir. Bu hücreler yeniden DNA sentezlemeden mayoz II'ye geçerler. Bu bölünme tamamlandığında 'n' kromozomlu ve 'd' DNA içeren spermatidler oluşur (68, 72).

Üçüncü faz olan spermatid fazında; haploid spermatidler, olgun spermi meydana getirmek için 'spermiyogenez' adı verilen sürece girerler. Bu farklılaşma süreci; akrozom oluşması, nükleer yoğunlaşma, kuyruk gelişimi, Sertoli hücrelerinin sitoplazmanın artan parçalarını fagosite etmesi ve olgun spermin meydana gelmesiyle sonuçlanır (68, 71, 72).

DİYABET VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Diyabetin bilinen komplikasyonlarının yanında, son yıllarda yapılan çalışmalar, subfertilite/infertilite olgularının, özellikle diyabetik erkek hastalarda, oldukça sık görüldüğü yönündedir (11, 73, 74). 2018 yılında yapılan bir çalışma, diyabetik erkeklerde retrograd ejakülasyona bağlı infertilite oranının %6-40 arasında değiştiğini göstermektedir (75).

Diyabetik erkek hastalarda spermatogenezin sürekliliği, tübül içi kan akımındaki glukoz seviyesinde oluşan dalgalanmalardan etkilenir. Testis dokusundaki hücreler arasında meydana gelen metabolik işbirliği, hormonal kontrol altındadır. DM, luteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH)'ların salınımındaki kontrol mekanizmalarını, hipotalamus-hipofiz-gonadal aksı üzerine etki ederek değiştirmektedir. Bunun yanında spermatogenik seri hücreleri, özellikle spermler, Sertoli hücrelerinin parakrin ve endokrin kontrolü altındadır. Sertoli hücrelerinde meydana gelen hormonal dalgalanmalar spermleri olumsuz etkilemektedir. DM'nin spermlerde, nükleer ve mitokondriyal DNA hasarına neden olarak, sperm kalitesini bozduğu, libido azalması ve iktidarsızlık gibi önemli cinsel sorunlara yol açtığı bilinmektedir. Retrograd ejakülasyon gibi

ejakülasyon bozuklukları ve erektil disfonksiyon, diyabetik bireylerde rastlanan diğer problemlerdir (11, 73, 76).

Diyabette, erektil disfonksiyonun patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Diyabetik bireylerin %50-75'inde var olduğu bilinen erektil disfonksiyonun, vasküler ve endotelial fonksiyon bozukluklarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Normal cinsel aktivite esnasında, nörotransmitterler (özellikle Nitrik oksit) ya penis sinir uçlarından ya da endotelden salınır ve kaverno arterlerle düz kasların gevşemesini sağlar, böylece penil kan akışında artışa yol açarak ereksiyonu tetikler. Diyabetik erkeklerde ise bu mekanizmanın bozulduğu, endotel düzeyinde NO biosentezinin kaybına bağlı olarak, erektil disfonksiyona yol açtığı düşünülmektedir (10).

Hiperglisemi ile aktive olan reaktif oksijen türevleri (ROS)'nin aşırı üretimi sonucunda meydana gelen oksidatif stres, diyabet ile ilgili komplikasyonların oluşumundan sorumludur. Hücre içerisinde aşırı biriken ROS'lar, apoptozisi hızlandırır, sperm kalite ve fonksiyonu üzerinde toksik etki oluşturur. Hiperglisemi, hem enerji üretimine hem de serbest radikal metabolizmasına etki ederek, sperm konsantrasyonu ve hareketliliğinde değişime sebebiyet verir (10, 74, 76).

Yapılan çalışmalarda diyabetin, testis dokusunda hem biyokimyasal, hem de histolojik değişikliklere neden olduğu ifade edilmiştir. Testosteron düzeylerinde azalma izlenmekle birlikte, seminifer tübüllerde atrofi, seminifer tübüllerde dev hücre varlığı, tübül lümeninde olgunlaşmadan dökülmüş spermatogenik seri hücrelerinin bulunması, düzensiz germinal epitel, tübül içi sperm sayısında azalma, tüm hücrelerde izlenen vakuolizasyon, konjesyon, tübüllerde bazal membran kalınlığında ve interstisyel doku hacminde artış, apoptozis, sıkça görülen histopatolojilerdir (11, 12, 74, 76, 77).

APOPTOZİS

Apoptozis, genel olarak programlı hücre ölümü anlamına gelir. Apo: ayrı, Ptozis: düşme kelimelerinin birleşimi olan, apoptozis terimi, literatürde ilk kez 1972'de, Avusturyalı bir patolog olan Kerr ve ark. (78) tarafından tanımlanmıştır. Genlerle düzenlenen apoptozis, organizmanın homeostazını koruyan bir olaydır (14, 79).

Apoptozis; embriyonik dönemde ve postnatal gelişimde normal fizyolojik süreçte görülebildiği gibi bağışıklık sistemi hastalıkları, viral enfeksiyonlar, diyabet, Alzheimer, Parkinson, foliküler atrezi, aterosklerozis, tümör oluşumu, organ transplantasyonları, radyasyon ve oksidatif stres gibi patolojik durumlara bağlı olarak da görülebilmektedir (14, 15, 79).

Apoptozisin düzenlenmesinde; Bcl-2 ailesi genleri, kalsiyum, seramid gibi moleküller, sitokrom C, kaspazlar, p53 gibi proteinler ve mitokondri rol oynamaktadır. Hücrenin apoptozise gidip gitmemesi, Bcl-2 ailesi genlerine bağlıdır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmış ve 2 gruba ayrılmaktadır; Proapoptotik üyeler ve antiapoptotik üyeler. Hücrede hangi üyelerin proteinleri

daha fazla ise hücre o tarafa eğilimlidir. Proapoptotik üyeler sitozolde yer alırlar, sitokrom C ve Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF) ifadelerini arttırarak, apoptozisi indüklerler. Bu üyeler; Bax, Bad, BclXs, Bid, Bim, Bak, Noxa ve Puma'dır. Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bcl-2; 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve ürettiği proteinler nükleus zarında, mitokondri dış membranında ve endoplazmik retikulumda yer alır. Por oluşumunu ve iyon transportunu sağlar ve Ca⁺⁺ oranını kontrol ederler. Zarın parçalanmasını engellerler. Kaspazlarla beraber, sitokrom C ve AIF ifadelerini bloke edip, apoptozu inhibe ederler (15, 76, 79, 80).

Kaspazlar, sistein proteaz ailesinden enzimlerdir. Hücrede inaktif olarak bulunurlar, proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirip sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol alırlar. DNA tamiri ve replikasyonunda görevli enzimleri inaktifleştirirler. Üç tiptirler: Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2,8,9,10), efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7) ve inflamatuvar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14). Kaspazlar, hücre iskeletini oluşturan proteinleri keserler ve zarda tomurcuklanmaya neden olurlar. Apoptozis başladıktan sonra, DNA'da tek zincirde bir çentikle başlayan, karakteristik ve geri dönüşsüz bir parçalanma görülür (15, 79).

Apoptozisin düzenlenmesinde intrinsek (mitokondriyal) ve ekstrinsek olmak üzere iki farklı yolak vardır (14).

Ekstresek yol: Apoptozis, transmembran reseptör aracılı etkileşimlerle başlatılır. Bu reseptörler, Tümör Nekroz Faktör (TNF) reseptör geni süper ailesine dahil olan, ölüm reseptörleridir. TNF reseptör ailesinin üyeleri, benzer sistein açısından zengin, hücre dışı domainleri paylaşır ve "ölüm domaini" olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik alana sahiptir. Bu domainler; hücre yüzeyinden, hücre içine, ölüm sinyalinin aktarılmasında önemli rol oynarlar. Sinyal oluştuğunda, kaspaz aktivasyonları gerçekleşerek, hücre ölümü meydana gelir. Bazı ölüm reseptör ve ligandları; Fas ligandı (FasL)/Fas reseptörü (FasR), TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'tir (14, 76, 81).

Plazma membranındaki ölüm reseptörlerine, ölüm ligandları bağlandığında, reseptörler trimerik yapıya dönüşür. Bu reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek Ölüm-Tetikleyici Sinyal Kompleksi (Death inducing signaling complex-DISC)'ni oluşturur. Sonrasında inaktif prokaspaz-8 aktifleşir ve kaspaz-8'i oluşturur. Aktif kaspaz-8, iki şekilde kaspaz-3'ü aktive eder. Ya doğrudan kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek, dolaylı olarak kaspaz-9'u stimüle ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki şekilde de aktive olan kaspaz-3, Kaspaz Aktive Edici Dnaz (CAD) aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur (14, 79).

Başka bir apoptotik yol ise patojenle enfekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkili olan, Granzim-Perforin yoludur. Perforinler ve Granzim B, sitotoksik T lenfositler ve doğal öldürücü hücrelerin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunan proteinlerdir.

Sitotoksik T lenfositler, hedef hücreye bağlandığında perforinler salınır. Perforinler, hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluştururlar. Bu perforin poru, hücre içi kalsiyum düzeylerinde artışa sebep olur. Granzim B ise bir vezikül içinde hedef hücreye girer. Perforin proteini, Granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Sonuç olarak Granzim B, kaspaz aktivasyonunu başlatarak, DNA fragmentasyonuna, ardından apoptozise neden olur (14, 15).

İntrensek yol: Apoptotik uyarının hücre içi sinyallerle alınmasından sonra Bid; Bcl-2'yi inaktive ederken, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Bax ve Bak, mitokondri membranında por oluşumunu uyarıp, zar potansiyelini değiştirir. Böylece mitokondri membranındaki porlardan sitokrom C, AIF, Endonükleaz-G (Endo-G), İkincil Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü (SMAC) ve Ca⁺⁺ salınımını uyarır. Sitokrom C, oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyıcı; SMAC, kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivasyonunu engelleyen İnhibitör Apoptotik Faktör (IAF)'i inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. Endo-G, DNA'nın parçalanmasında görevlidir. Sitokrom C, ATP ve Apoptotik proteaz aktive eden faktör (Apaf-1)'in katılmasıyla, sitoplazmada 'apoptozom' denen bir yapı oluşturur. Apoptozom, kaspaz 9'u aktive eder ve kaspaz 9 prokaspaz 3'ü, aktif kaspaz 3'e dönüştürür. Aktif kaspaz-3 de İnaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'i inaktifleştirir, CAD'ı aktifleştirir. CAD da, nükleusta kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın fragmente olmasına neden olur (14, 79).

Apoptozis için sinyal alındıktan sonra, hücrede biyokimyasal ve morfolojik olarak bazı değişimler gözlenir. Hücre küçülür ve yoğunlaşır, DNA parçalanır, hücre iskeleti yıkılır, nükleer zarda erimeler başlar. Apoptotik hücreleri belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama, giemsa boyama, Terminal Transferaz-Aracılı dUTP Nick Uç-Etiketleme (TUNEL), kaspaz-3, elektron mikroskopi gibi birçok boyama ve görüntüleme yöntemiyle apoptotik hücreler belirlenebilir (16, 82).

Elektron mikroskopi; morfolojik değişikliklerin en doğru gözleendiği yöntem olarak öne çıkmaktadır. Apoptozis sürecinde hücrelerde ultrastrüktürel olarak; hücre hacminde azalma ve mikrovillus kaybı, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu ve nükleolus kaybı meydana gelir. Mitokondri dış membranının geçirgenliği artar ve organelde hacim artışı, şişme gözlenir. Hücre iskeleti proteinlerinin yapısı bozulur (82).

Birçok organ gibi testisler üzerinde de çok sayıda ultrastrüktürel çalışma yapılmış, diyabete bağlı apoptozisin testislerde meydana getirdiği histopatolojik değişiklikler, elektron mikroskopik görüntülemelerle, hücre ve organel düzeyinde detaylı olarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda genel olarak; seminifer tübül bazal membranlarında düzensizlik, Sertoli hücrelerinde vakuol oluşumu, düz endoplazmik retikulum (SER) azalması, spermatogenik hücrelerin nükleuslarında yoğunlaşma, mitokondri ve endoplazmik retikulum yapılarında bozulmalar kaydedilmiştir.

Mitokondri sayısında azalmayla birlikte, organelin şeklinde değişim, krista yapısında düzensizlikler ve krista kaybı görülmüştür (12, 83-88).

Trindade ve ark. (12) 2013 yılında, diyabet oluşturulmuş sıçanların testis dokularında yaptıkları ultrastrüktürel çalışmada seminifer tübüllerde düzensiz bazal membran görünümü, Sertoli hücre sitoplazmalarında vakuol oluşumu, spermatogonyum ve spermatositlerde kromatin yoğunlaşması ve apoptotik nükleus görünümü saptamışlardır. Spermatogenik seri hücrelerinde dejenerasyonlar, lipid ve elektron yoğun madde birikimi ile bu hücrelerde çok sayıda dejenere olmuş mitokondri bulunduğu kaydedilmiştir.

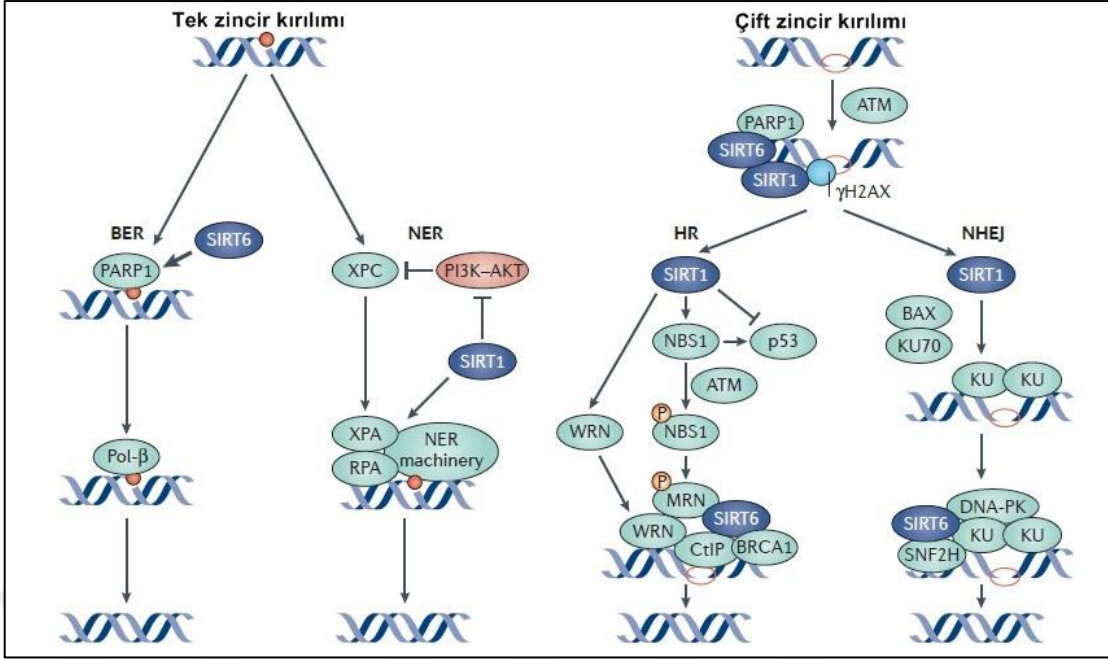
Köroglu ve ark. (84) 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında, STZ ile diyabet oluşturdukları sıçanların testis dokularında ultrastrüktürel incelemelerde bulunmuşlar ve spermatogenik hücrelerde dejenerasyona, akrozomal yapılarda ve spermlerin kuyruklarında deformasyon gördüklerini belirtmişlerdir.

Öztaş ve ark. (86) tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada, sıçanlarda Tip 2 diyabet modeli oluşturulmuş ve testis dokuları elektron mikroskopıyla incelenmiştir. Diyabet grubu sıçanların testis dokularında, düzensiz ve ayrılmış bazal membran, Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacığı, dejenere olmuş ve krista kaybı görülen mitokondriler saptamışlardır. Bazı spermatogenik hücrelerde piknotik nükleus görünümü, spermatidlerde çok sayıda lipid damlacığı ve vakuolizasyon görüldüğünü saptamışlardır.

KU70

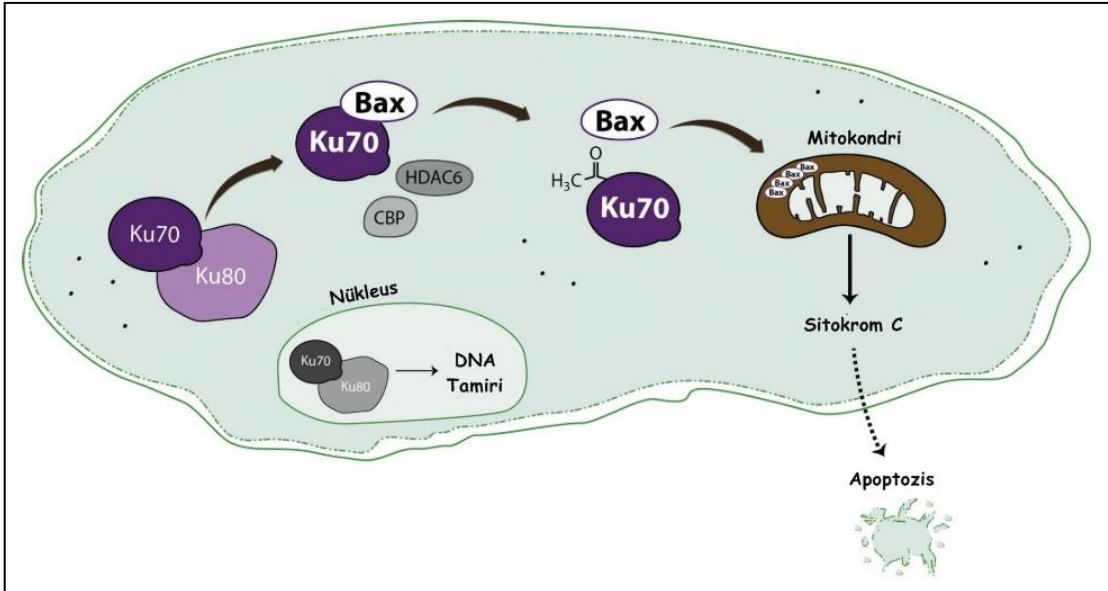
Homolog olmayan uç birleştirme; DNA çift zincir kırıkları tamirinde iki temel mekanizmadan biridir. NHEJ iki adımdan oluşur. İlk olarak KU70/80 heterodimerik kompleksi, DNA kırık uçlarını stabilize eder ve hizalar. Sonra KU70/80, DNA-PKcs'yi aktive ederek DNA'daki çift zincir kırıklarının onarım sürecini başlatır. DNA-PKcs tamir faktörü olan Artemisi aktive eder. Artemis, kırık 3' ve 5' çıkıntılarını düzeltir. İkinci adım olarak, XRCC4/ligaz 4 kompleksi tarafından ligasyon yapılır ve NHEJ onarımı sonlanır (19, 27).

KU70, KU protein kompleksinin 70 kDa molekül ağırlığına sahip 609 aminoasitlik alt ünitesidir KU70 ve KU80 proteinleri, DNA-PK'nin düzenleyici bileşenleri olarak işlev görür ve DNA çift zincir uçlarına bağlandıktan sonra DNA-PKcs'yi aktive ederek DNA'daki çift zincir kırıklarının onarım sürecini başlatır (Şekil 2). NHEJ'de, DNA-PK'nin rolü iyi bilinmesine rağmen, DNA-PK'nin ve KU70'in, DNA onarımından bağımsız bir rolü olduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Hem nükleusta, hem de sitoplazma da lokalize olan protein, aynı zamanda Bax aktivitesini baskılayarak, apoptozisin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Şekil 3) (20-25, 28, 89, 90).



Şekil 2. Tek ve çift zincir kırıklarında görevli Sirtuinler ve KU proteinleri (30).

KU70'in Bax bağlayıcı bölgesinden, peptid diziliminde 578-609 arasındaki birimlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. KU70 asetillendiğinde Bax'tan ayrılmakta, serbest kalan Bax, mitokondriye göç etmekte ve sitokrom C salınımını tetikleyerek, kaspaz bağımlı apoptozise neden olmaktadır (Şekil 3) (25, 28, 91, 92).



Şekil 3. KU70/Bax kompleksi (25).

KU70'in nükleer formu DNA tamirinde görev alırken, sitoplazmik formu Bax aktivitesini baskılayarak, apoptozisi düzenlemektedir. Ancak bir çalışmada, nöroblastoma hücrelerine radyasyon verildiğinde, nükleer KU70'in DNA tamirinde aktifleşirken, sitoplazmik KU70'in

Bax'ı serbest bırakarak, bir apoptotik protein gibi apoptozisi indüklediği ifade edilmiştir. Radyasyon uygulamasından sonra asetillenen KU70, sitoplazmadan nükleusa taşınmış ve DNA tamir aktivitesini düşürerek, apoptozisi daha fazla indüklemiştir. Sitoplazmik KU70'in nükleusta nasıl etkinleştiği bilinmemektedir. Çalışmada bu durumun bu hücelere özgü olabileceği görüşü öne sürülmektedir (25).

Xu ve ark. (26) tarafından yapılan bir çalışmada, kardiyomiyositler hiperglisemik ortamda kültüre edilmişlerdir. Casitas B-soy lenfoma proto-onkogen-b (Cbl-b); hücre aktivitesini düzenleyen multifonksiyonel bir proteindir. Kardiyomiyositlerde Cbl-b ifadesinin inhibisyonu için, Cbl-b siRNA uygulanmıştır. Araştırmacılar, hipergliseminin ve Cbl-b inhibisyonunun, KU70 asetilasyonunu yükselttiğini ve buna bağlı olarak Bax aktivitesini arttırdığını ifade etmişlerdir. Tedavi uygulanan gruplarda ise KU70 asetilasyonunun azalarak KU70/Bax bağlantısının arttığını ve böylece apoptozisin inhibe edildiğini ortaya koymuşlardır.

Transkripsiyon faktörü 'Pankreatik Duedonal Homebox-1 (PDX-1)', pankreas gelişiminde ve pankreas β hücrelerinin işlevinde önemli bir rol oynar. Araştırmalar DNA-PKcs'nin, KU70 ve KU80, üzerinden pankreas gelişimi ve pankreas β hücrelerinin işlevinde düzenleyici bir rolü olduğunu vurgulamaktadır (27, 90). KU70'in pankreas üzerindeki etkilerinin PDX-1 üzerinden düzenlediğine dair kanıtlar bulunmaktadır (90).

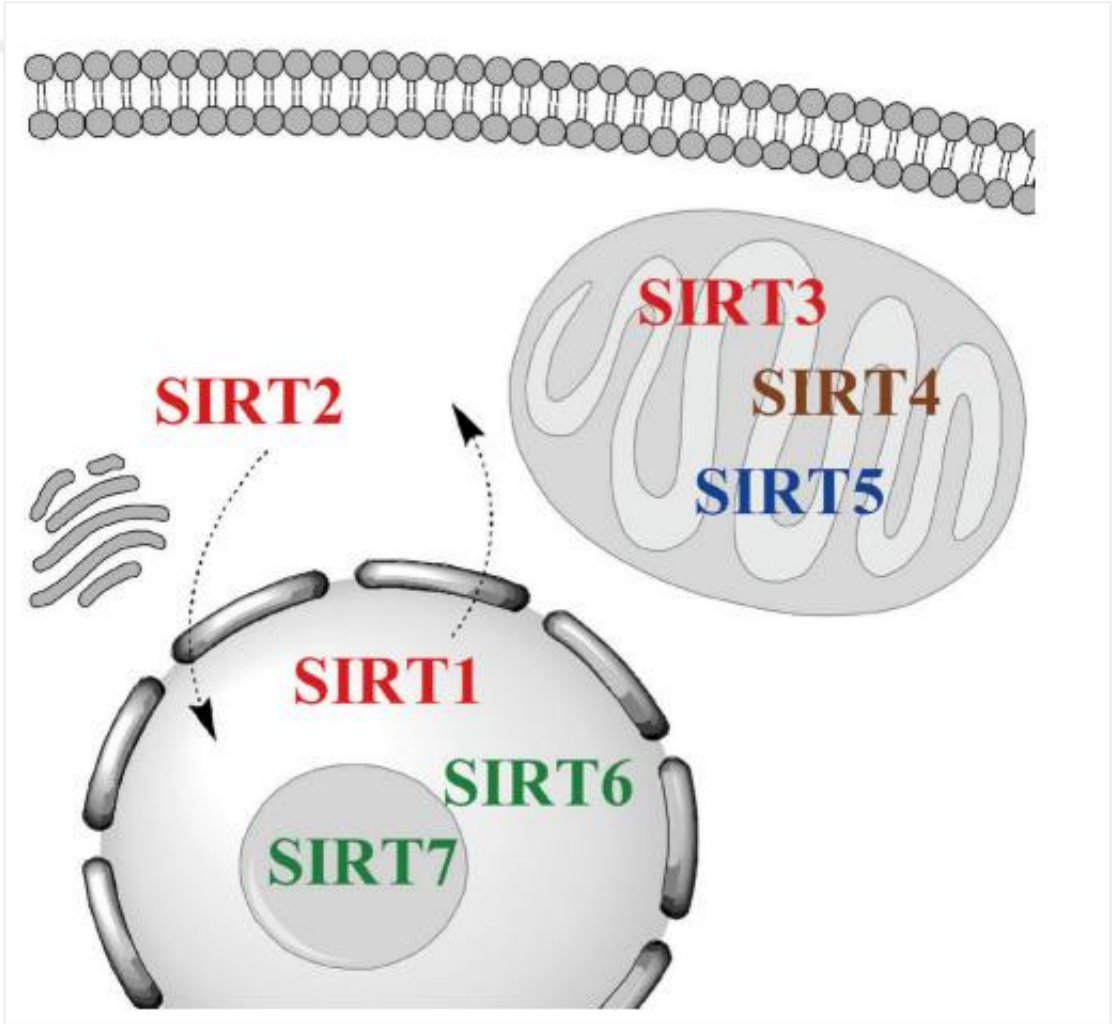
Tavana ve ark. (27) tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışma, KU70'in NHEJ mekanizmasındaki rolüne ek olarak; pankreas β hücrelerinin proliferasyonunda, insülin homeostazında ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde de görevli olabileceğini göstermiştir. Çalışmada, fare pankreas β hücrelerinde KU70 ifadesi inhibe edildiğinde, β hücrelerinde hiperproliferasyon, insülin seviyesinde artış ve glukoz seviyesinde azalma olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma; KU70'in DNA tamir mekanizması dışında farklı roller üstlendiğini göstermektedir.

Diyabetik nefropati üzerine yapılan bir çalışmada, KU70 ifadesinin diyabetik gruplarda yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir. KU70/Bax etkileşimine ek olarak nükleer clusterin (nCLU)/KU70 ifadesinin, apoptoziste etkili olabileceği öne sürülmüştür (93).

Diyabette, anesteziklerin nörotoksitesisi üzerine yapılan bir çalışmada; hiperglisemik ortamda kültüre edilen fare dorsal kök gangliyonu nöronlarına, 'bupivakain' isimli anestezik madde ve DNA-PK inhibitörü olan NU7441 verilmiştir. Araştırmada hiperglisemik ortamında Bupivakain'nin ve NU7441'in, KU70 ifadesini inhibe ederek, DNA hasarını ve apoptozisi arttırdığını ileri sürmüşlerdir (92).

SIRTUINLER

Sirtuin ailesi, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı sınıf III deasetilaz enzimler olarak bilinmektedir. Protein deasetilaz ve adenozin difosfat (ADP)-ribozil transferaz enzimlerdir. Memelilerde, sirtuin ailesinin 7 farklı tipi bulunmaktadır. SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 ağırlıklı olarak nükleusta; SIRT2 sitoplazmada, SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondride bulunmaktadır (Şekil 4). SIRT ailesi; DNA onarımı, inflamasyon, apoptozis, enerji metabolizması, gelişim, üreme, yaşlanma ve kanser mekanizmalarında önemli görevlere sahiptir (33, 94-97). İlk kez 1979 yılında Klar ve ark. (98) tarafından *Saccharomyces cerevisiae* mayasında bulunmuştur. Sirtuin ailesi genleri; bakteriler, solucanlar, sinekler, bitkiler ve memelilerde gözlemlenmiştir (29, 33, 99, 100).



Şekil 4. Sirtuinlerin hücre içinde lokalizasyonları (101).

SIRTUIN 1

Ağırlıklı olarak nükleusta lokalize olan ancak sitoplazmada da bulunan SIRT1, birçok dokuda ifade edilmektedir. Histonlar, transkripsiyon faktörleri, DNA onarım faktörleri ve sinyal proteinleri olmak üzere, çeşitli substratların deasetillenmesi yoluyla aktiviteleri düzenlemektedir (Şekil 2). Histonların deasetilasyonu ve kromatin yoğunlaşmasıyla gen ifadesinin baskılanması sağlanır. Bu işlem, histonların amino kuyruklarında bulunan lizin amino asitlerinin ve histon olmayan proteinlerin asetil gruplarının, histon deasetilaz (HDAC) enzimi tarafından çıkartılması ile gerçekleşir (29, 102-104).

Sirtuin 1, sınırlayıcı transkripsiyon faktörü olan p300'ü deasetilize ederek, hücre farklılaşmasının ve metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynar (105). Tümör baskılayıcı gen olarak bilinen p53 ifadesindeki bozukluklar, hücre bölünmesinde anormalliklere ve kanserleşmeye neden olur. SIRT1; p53'ü deasetilize ederek, p53 ilişkili apoptozisi azaltır. p73 ise p53 gibi tümör baskılayıcı bir gen dir. SIRT1 aynı zamanda p73'ün de transkripsiyonel etkinliğini azaltarak, p73 aracılı apoptozisi engellemektedir (29, 106).

FOXO, hücre döngüsünün ilerlemesini bloke eden proteinlerin (p27, Rb2, GADD45) ve hücre ölümünü indükleyen proteinlerin (Bim, Fas, TRAIL, TRADD) gen ifadelerini stimüle eder. SIRT1; FOXO alt gruplarını deasetilize ederek apoptozisi baskılar. DNA hasarlarında DNA tamirinin sağlanması için, KU70 üzerinde düzenleyici etkisiyle, KU70/Bax bağlantısını belli bir süre sabitler (22, 29, 30, 107, 108).

Metabolizma üzerindeki işlevlerine bakıldığında, SIRT1'in karaciğerde özellikle hepatositlerde FOXO1 ifadesini artırarak, glikoneogenezisi düzenlediği görülmektedir. Ayrıca; hücre enerji metabolizmasında, lipid homeostazisinde, ATP sentezinde ve mitokondriyal biyosentezde önemli bir transkripsiyon faktörü olan 'ppar gama koaktivatör 1-alfa (PGC1- α)' ile etkileşerek, glikolizisi baskılamakta ve glukoneogenik gen ifadesini arttırmaktadır (109-111).

Farelerde yapılan çalışmalarda, SIRT1'in insülin benzeri gelişim faktörü (IGF)'yi düzenlediği ileri sürmüştür. IGF sinyal yolağı, memelilerde yaşlanma sürecinde etkili bir yoldur. SIRT1 memelilerdeki yaşlanma mekanizmaları üzerine direkt bir şekilde katılmaktadır (29, 112).

Sirtuin gen ve proteinlerinin, yaşlanma mekanizması üzerindeki rolleri araştırıldığında, yaşam süresini uzatıcı etkinlikleri olduğu ifade edilmektedir. Mayalarda yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara ek olarak, transgenik farelerin kalp dokularında, SIRT1 protein ifadesinin artmasıyla, kalbin yaşlanmasının geciktiği, oksidatif stres ve apoptozisin engellendiği görülmüştür (29, 113, 114).

Diyabetik kardiyomyopati de SIRT1'in anahtar rol üstlendiği görülmektedir. Yapılan çalışmalarda özellikle Poli (ADP-riboz) Polimeraz (PARP) ve PGC1- α ile SIRT1 etkileşiminin

diyabetik kardiyomiyopati gelişiminde önemli olduğu belirtilmektedir. SIRT1 ve PGC1- α ifadelerinin diyabette azalması, buna karşın tedavi gruplarında artması, kardiyomiyopatinin önlenmesinde SIRT1'in teröpatik bir rol üstlenebileceğini göstermektedir (115, 116).

Sirtuin 1'in nöroprotektif etkileri de olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda diyabetik sıçanlarda oluşturulan orta serebral arter oklüzyonunda, SIRT1 ifadesinin diyabetik gruplarda azalması buna karşın tedavi gruplarında artması, özellikle nükleer faktör κ B (NF- κ B)'in transkripsiyonel etkisini azaltarak, protektif bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (117).

SIRT1'in, PGC1- α ve Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör A (MtTFA) ile etkileşiminin diyabetik nöropatiyi baskılayıcı bir rol oynadığı da ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalarda SIRT1/PGC1- α /MtTFA yolağının diyabetik nöropatinin gelişiminin engellenmesinde anahtar bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (118, 119).

Diyabetik retinopati çalışmalarda ise High mobility group box 1 (Hmgb1) ve SIRT1 etkileşiminin diyabetik retinopatide, oksidatif stresi azalttığı ve anti-inflamatuar etki gösterdiği ifade edilmektedir (120). Diyabette retinal endotelial hücrelerde, SIRT1 ifadesinin azalmasına bağlı olarak Hmgb1 asetilasyonu artmakta bu da diyabetik nefropatinin gelişimine sebep olmaktadır. Metalloproteinazların (MMP), özellikle MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonlarının, diyabetik retinopati gelişiminde önemli olduğu vurgulanmaktadır. SIRT1'in söz konusu proteinazların aktivasyonlarını düzenlediği ve bu yolla diyabete bağlı retinopatinin patogenezinde rol oynadığı belirtilmektedir (121). Araştırmalarda TGF- β 1, NF- κ B, Endotelin-1 (ET-1), glial fibriler asidik protein (GFAP), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi bir çok proteinin ve transkripsiyon faktörünün, SIRT1 ile etkileşiminin diyabetik retinopati patogenezinde anahtar rolü olduğu gösterilmektedir (122). Sirtuin 1'in, diyabetik retinopatide 'NAD-PARP-SIRT' yolağı üzerinden etkileşim gösterdiği belirtilmektedir. Hiperglisemik ortamda kültüre edilmiş sıçan endotelial hücrelerinde, yüksek glukoz konsantrasyonu, PARP'ı aktive ederek, NAD+'ın tükenmesine, SIRT1 aktivitesinin (NAD-PARP-SIRT yolağı) inhibisyonuna yol açmaktadır (123).

Araştırmalarda SIRT1'in diyabetik böbreklerde, apoptozisi ve oksidatif stresi baskıladığı, apoptotik proteinlerin ve çeşitli transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonunu sağlayarak, renoprotektif bir rol oynadığı gösterilmektedir. Diyabette SIRT1 ifadesindeki azalma, p53, NF- κ B, FOXO gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna sebep olarak, diyabetik nefropatinin patogenezinde ve gelişiminde rolü olabileceğini göstermektedir (31, 124-126).

SIRT1'in embriyogenezi etkilediği gösterilmiştir. Sir2 geni susturulmuş transgenik fare modeli ile yapılan çalışmada, Burney ve ark. (127) SIRT1'in gametogenez ve embriyogenezde önemli işlev gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Embriyonik gelişimde çeşitli organlarda SIRT1 ifadesinin incelendiği bir diğer çalışmada ise farelerde fetal dönemde, nöroepitelyum, dorsal kök

gangliyonu, trigeminal gangliyon, göz, kalp, böbrek, testis, karaciğer ve akciğer dokularında farklı gelişim evrelerinde SIRT1 ifade edildiği belirtilmiştir. Özellikle testislerde fetal dönemde güçlü bir SIRT1 immünreaktivitesi tespit edilmiştir (128).

SIRT1 testislerde ise insülin duyarlılığını arttırmakta, glukotoksisiteyi azaltmaktadır. PARP'lar, DNA hasarında aktive olan bir nükleer enzim grubudur. Bu enzimler, kaspaz 3 ve AIF ifadelerini inhibe ederek, apoptozisin baskılanmasını sağlarlar. PARP/SIRT1 etkileşiminin testiküler apoptotik yolakta etkili olabileceği düşünülmektedir (129).

C1q/TNF ilişkili protein 3 (CTRP3); antiapoptotik etkileri bilinen, adiponektin paroloğu bir proteindir. Yüksek yağlı diyetle bağlı obezitenin, testis dokusu üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, fare testis dokularında SIRT1 ve CTRP3 protein ifadesi incelenmiş ve diyet gruplarında her iki protein ifadesinin de azaldığı belirtilmiştir. CTRP3'ün, SIRT1 aktivitesini indüklediği ve testislerde antiapoptotik bir rol aldığı öne sürülmüştür (130).

Fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21); glukoz homeostazi, insülin duyarlılığı ve ketogenezin metabolik bir düzenleyicisi olarak görev yapan bir proteindir. FGF21 geni susturulmuş diyabetik fare testis dokusunda, SIRT1 ve PGC1- α ifadesinin azalması, SIRT1'in FGF21 tarafından da düzenlendiğini göstermektedir (111).

MicroRNA34a (miR-34a); miR-34 ailesine aittir ve testiste yüksek oranda eksprese edilir. miR-34a; SIRT1 mRNA'sının 3'UTR'sini hedefler, bu da SIRT1'in inhibisyonuna ve p53 aracılı apoptozisin aktivasyonuna neden olmaktadır. Özellikle diyabetik çalışmalara bakıldığında miR-34a'nın apoptozisi indüklediği görülmektedir. Diyabetik testislerde miR-34a ifadesinin arttığı, SIRT1 ifadesinin azaldığı, dolayısıyla miR-34a'nın SIRT1'i baskılayarak, apoptozisi indüklediği ifade edilmektedir (32).

Spermatogenez aşamasında gelişmekte olan spermatozoidler incelendiğinde; yüksek miktarda SIRT1 ifade ettiği gözlenmiştir. Farelerde SIRT1 geni susturulduğunda, spermatogenezde yetersizliğe bağlı sperm anomalileri ve infertilite görüldüğü bildirilmiştir. Bu sebeple, üremede önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (29, 127, 131).

Dişi genital sistemde SIRT1'in rolleri incelendiğinde; folikülogenezis, ovaryum gelişimi, FSH düzenlenmesi, steroidogenezis, oosit maturasyonu ve kromatin konfigürasyonu gibi fonksiyonlar gördüğü belirtilmektedir. Ovaryumlarda granüloza hücrelerinde, yüksek düzeyde SIRT1 ifade edildiği ileri sürülmektedir (127, 131).

SIRTUIN 6

Nükleusta, heterokromatin ile bağlantılı olarak yer almaktadır. SIRT6, SIRT4 ile beraber mono-ADP ribozil transferaz aktivitesi gösterir. BER mekanizmasında görevlidir (Şekil 2). Ağırlıklı olarak nükleusta lokalize olup, sitoplazmada da bulunmaktadır. SIRT6 geni susturulan farelerde, BER mekanizmasında bozukluklar gözlenmiştir. Ayrıca metabolik yetersizlikler, omurga eğriliği, şiddetli lenfopeni, subkutan yağ dokusu kaybı, kemik mineral yoğunluğunda azalma ve bunun yanında şiddetli hipoglisemiye bağlı prematüre ölüm gözlemlendiği ifade edilmiştir. Deneysel hayvan çalışmalarında deneklerin yaşlarına bağlı olarak organ bütünlüğünü korumada, SIRT6'nın rolü olabileceği ifade edilmiştir (29, 30, 132-134).

Yapılan çalışmalarda, SIRT6'nın aşırı ifadesinin, SIRT1 de olduğu gibi, IGF'nin ifadesini düzenleyerek, yaşam süresinin uzamasına katkı sağladığı görülmüştür. Genomik stabilite ve hücre yaşlanması üzerine etkileri bulunmaktadır. Bunların dışında kardiyak hipertrofiyi azalttığı, karaciğerde yağ asitlerinin oksidasyonunu arttırdığı ve iskelet kasında glukoz alımını arttırdığı bildirilmiştir (30, 135).

SIRT6, kromatin ile ilişkilidir. CtIP, GCN5, SNF2H, G3BP, FOXO3, PARP1, H3K9 ve H3K56'nın deasetillenmesini sağlar, inflamasyon, glukoz metabolizması ve gen ifadelerini düzenler. NF- κ B sinyalini azaltır. FOXO1'i deasetilize ederek, glikoneogenezisi düzenler (30, 135, 136). İnsanlarda SIRT6 ifadesindeki azalmanın, kronik karaciğer hastalıkları ve hepatoselüler karsinoma ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir. Sonuç olarak tümör baskılayıcı rol oynadığı düşünülmektedir (30, 137).

Araştırmalar SIRT6'nın NHEJ tamir yolağında da görevli olduğunu göstermektedir. KU70/KU80 heterodimerini stabilize ederek, DNA'nın hasarlı bölgesindeki onarımda kilit rol üstlenmektedir (30, 138).

İnflamasyon mekanizmalarında da rol üstlenen SIRT6'nın; hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiş, makrofajlarda TNF salgılanmasını uyardığı ifade edilmiştir (30). Bauer ve ark. (139) tarafından pankreas kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, interlökin-8 (IL-8) ve TNF ifadesini arttırdığı, buna bağlı olarak hücre göçünü uyardığı yönünde görüş bildirilmiştir. Yara iyileşmesinde SIRT6 ifadesinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada; diyabetik farelerde SIRT6 geni susturularak yara modeli oluşturulmuş ve yara iyileşmesinin olumsuz etkilendiği görülmüştür. Çalışmada SIRT6 geni susturulan farelerde; oksidatif stresin, inflamatuvar yanıtın, NF- κ B ifadesinin arttığı, hücrelerde proliferasyonun ise azaldığı belirtilmiştir (140).

Sirtuin 6'nın; pregestasyonel maternal diyabette, embriyo nöral kök hücrelerinde anlamlı şekilde azaldığı ifade edilmektedir. Farelerde yapılan diyabetik embriyopati modelinde, süperoksit dismutaz 1 (SOD1)'in aşırı ekspresyonunda, SIRT6 ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Diyabete bağlı gelişen nöral tüp defektlerine; SIRT6 azalmasına bağlı, histon asetilasyonunun sebep olabileceği düşünülmektedir (141).

Tip 2 diyabetik hastaların aterosklerotik lezyonlarında, SIRT6 ifadesinde azalma olduğu, bu durumun da inflamasyon ve oksidatif stresi arttırdığı belirtilmektedir (135).

SIRT6 iskelet kasında mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynar. Kas hücrelerinde SIRT6 geni susturulmuş farelerde, kaslarda glukoz homeostazını negatif etkilediği, insülin duyarlılığını ve yağ asidi oksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (135).

Sirtuin 6 delesyonunda, bir çok dokuda NF- κ B ilişkili genlerin ifadelerinde artış olduğu görülmektedir. SIRT6 delesyonunun farelerde; adipoz dokuda inflamasyonu ve yüksek yağlı diyetle bağlı insülin direncini arttırdığı görülmüştür. SIRT6; pankreas β hücrelerinde insülin sekresyonunu ve ATP üretimini stimüle etmektedir. Diğer taraftan pankreas β hücrelerinde apoptozisi baskılamaktadır. Spesifik olarak pankreas β hücrelerinde SIRT6 geni susturulduğunda, insülin sekresyonunda azalma olduğu kanıtlanmıştır. Diyabetik farelerin pankreas dokularına bakıldığında ise, SIRT6 geni susturulduğunda, β hücrelerinin apoptozisinde artma olduğu ifade edilmiştir. Bu durum SIRT6'nın pankreasın fonksiyonlarında kritik rol üstlendiğini göstermektedir (142-144).

Sirtuin 6, hepatik lipid metabolizmasında düzenleyici olarak görev almaktadır. Fare hepatositlerinde, SIRT6 geni susturulduğunda, yağ hücrelerinde anormal artış görüldüğü belirtilmektedir. SIRT6 geni susturulduğunda, Asetil koenzim A karboksilaz 1 (ACC1), yağ asidi sentaz (FAS) gibi lipojenik genlerin ifadelerinde ki artışa bağlı olarak yağlanmanın gerçekleştiği öne sürülmektedir (142, 145).

Sirtuin 6'nın merkezi sinir sisteminde ifade edildiği bilinmektedir. SIRT6 eksikliğinin, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açtığı belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmaya göre; SIRT6'nın, merkezi sinir sisteminde glukoz homeostazisini sağladığı düşünülmektedir (146).

Diyabetik hastalarda intervertebral disk dejenerasyonu (IVDD) görülebilmektedir. Hipergliseminin, nükleus pulposus (NP) ve mezenşimal kök hücreler (MSC) üzerine negatif etkisi olduğu bilinmektedir. NPMSC tedavisi; IVDD hastalarında son yıllarda üzerine çalışılan deneysel bir tedavi yaklaşımıdır. Yapılan bir çalışmada, hiperglisemik NPMSC hücrelerinde apoptozisin arttığı ve SIRT6 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu durum NPMSC hücrelerinde apoptozisin baskılanmasında SIRT6'nın önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (147).

Sirtuin 6 kalp hastalıklarında da üzerine çalışılan bir proteindir (148, 149). Diyabetik kardiyomiyopati gelişiminde, SIRT6'nın koruyucu rolü olduğu ifade edilmektedir (149). Bir araştırmada, yüksek yağlı diyetle bağlı diyabet geliştirilen farelerin kardiyomiyositlerinde SIRT6 ifadesinin azaldığı görülmüştür. SIRT6'nın aşırı ifade edildiği transgenik farelerde ise obezite ve insülin direnci gelişmemiştir. Çalışmada; SIRT6'nın kardiyomiyositlerdeki Nrf2 ifadesini stabilize ederek kardiyomiyopati gelişimini engellediği öne sürülmüştür (149).

Tip 1 diyabet oluşturulan farelerde, diyabetik retinopati gelişiminde SIRT6 ifadesi incelendiğinde, diyabetik grupların retinalarında SIRT6 ve beyin kökenli nöroprotektif faktör (BDNF) ifadesinin azaldığı, buna karşın VEGF, H3K56 ve H3K9 faktörlerinin ifadelerinde artış olduğu görülmektedir. SIRT6 geni susturulmuş farelerde, sayılan faktörlerin seviyelerindeki değişimler diyabetik retinopatide SIRT6'nın kritik rol üstlendiğini göstermektedir (39, 150).

SIRT6'nın renal homeostazi üzerine fonksiyonları; özellikle SIRT6 geni susturulmuş farelerde, glomerüllerde ve podositlerde oluşan hasarlar üzerinden incelenmektedir. SIRT6'nın podosit fonksiyonunda ve glomerüler geçirgenliğin korunmasında anahtar bir enzim olduğu görülmektedir. SIRT6 geni delesyonunun renal hipertrofiyi ve proteinüri ilerlemesini hızlandırdığı ifade edilmektedir (151). Farelerde yapılan diyabetik nefropati çalışmalarında, SIRT6'nın özellikle podositlerde ifade edildiği ve diyabetik gruplarda SIRT6 ifadesinde azalma olduğu belirtilmektedir. Diyabetik nefropatide, podositlerde SIRT6 ifadesindeki azalmaya bağlı olarak apoptozisin arttığı görülmektedir. Özellikle AMP kinaz defosforilasyonu ve mitokondriyal disfonksiyonun apoptoziste etkili olduğu ifade edilmektedir (38, 152).

Sirtuin 6'nın, SIRT1 ile beraber, spermatidlerin olgunlaşma süreçlerinde rol adıkları ifade edilmektedir. Bir çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde obezite oluşturulmuş, testislerde SIRT6 ekspresyonunda önemli bir azalma ile beraber, sperm protaminasyonunda düşüş rapor edilmiştir. Testiküler germ hücrelerinde, azalan SIRT6 ifadesiyle beraber, H3K9 asetilasyonunda ve DNA hasarında artış görüldüğü kaydedilmektedir (131, 153).

Dişi genital sistemde SIRT6'nın fonksiyonuna bakıldığında; folikülogenezis, ovaryum gelişimi, oosit maturasyonu ve kromatin konfigürasyonu gibi görevleri olduğu belirtilmektedir (131).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kuruluna sunulmuş ve 2017.06.01 numaralı karar ile onay alınmıştır (Ek 1). Bu onaydan sonra, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi destek için başvurulmuş ve 2017/184 no'lu proje olarak desteklenmesine karar verilmiştir. İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden, 3 aylık, ağırlıkları 250–320 gr arasında değişen 20 adet *Sprague Dawley* erkek sıçan alınmıştır. Denekler, Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'ne getirilmiş ve deney öncesi bir hafta ortama uyumları beklenmiştir. Biyolojik ve fizyolojik olarak aynı özelliklere sahip olan deneklerimiz, kontrol grubu (n=8) ve diyabet grubu (n=8) olmak üzere 2 farklı gruba ayrılmıştır. Deney süresince tüm deneklerimiz, stabil laboratuvar koşulları altında tutulmuş (22±1°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda), günlük içme suyu ile birlikte, ham %21 protein içeren pelet yemlerle (Purina, Bursa, Türkiye) beslenmiştir.

Diyabet oluşturmak için kullandığımız STZ (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya)'in iyi çözüldüğü ve stabilitesini koruduğu bir solüsyon olan sitrat tamponu, steril enjeksiyonluk suyla hazırlanmış ve pH'sı 4.2'ye ayarlanmıştır. STZ, sitrat tamponunda çözüldükten sonra 10 dakika içinde deneklere uygulanmıştır.

Deneklerimizden;

1. Kontrol grubu; sadece pH'sı 4,2 olan 0,1M'lık sitrat tamponu verilen grup (n=8),
2. Diyabet grubu; tek doz 50 mg/kg STZ (pH' sı 4,2 olan; 0,1M'lık sitrat tamponunda çözümlenerek) verilen grup (n=8) olmak üzere iki grup oluşturulmuştur.

Deneklerin kan-glukoz düzeyleri; deneye başlamadan önce, STZ uygulandıktan 48 saat sonra model oluşum kontrolü amaçlı ve sonra bir ay süresince her hafta, deneklerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinde, glukometre ile ölçülmüştür (IME-DC, Hof, Almanya). STZ

uygulandıktan sonra, kan glukoz değerleri 250 mg/dl'nin üzerinde olan denekler, "diyabetik" kabul edilmiştir (154).

Tüm deneklerin, planlanan bir aylık deney süresinin sonunda, ketasol (Ricterpharma, Viyana, Avusturya) ve basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında, sağ ve sol testis dokuları total olarak çıkarılmış, ışık, elektron mikroskopik ve western blot çalışmaları için işlemlendirilmiştir.

Biyokimyasal İncelemeler

Deneklerin kan serumlarındaki testosteron düzeyleri; sakrifikasyon öncesinde alınan kardiyak kan örneklerinden elde edilen süpernatantlarda, Sıçan Testosteron Elisa kit (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, Çin) ile firmanın önerileri doğrultusunda, hizmet alımı yapılarak Elisa yöntemiyle çalışılmıştır.

Işık Mikroskopik, Elektron Mikroskopik ve İmmünohistokimyasal İncelemeler

Işık mikroskopik rutin boyamalar ve immünohistokimyasal incelemeler için; testis doku örnekleri, %10'luk formaldehitte fikse edildikten sonra, dokular yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçilmiştir. Dehidratasyon aşamasından sonra, saydamlaştırma basamağı için dokular, toluol (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) ile muamele edilmiş, önce yumuşak parafin (Merck Millipore) ve sonrasında sert parafine (Merck Millipore) alınarak, parafin bloklar elde edilmiştir. Dokulardan histolojik ve morfometrik analizler için alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere, testisin histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak H-E boyası uygulanmıştır. Entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirildikten sonra, Olympus BX-51 mikroskobunda incelenerek, değişik büyütmelerde fotoğrafları çekilmiştir.

Hazırladığımız H-E boyası uygulanmış preparatların kullanımıyla, tüm deneklerin testis doku örneklerinde seminifer tübül çaplarının ölçümü; X200'lük büyütmede, oküler mikrometre kullanılarak, yuvarlak veya yuvarlağa yakın rastgele seçilmiş, her preparatta 10 seminifer tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirilmiştir (155, 156).

Elektron mikroskopik incelemeler için sakrifikasyondan sonra alınan testis dokuları; 1 mm³'lük parçalara bölünüp, pH'sı 7.3 olan fosfat tamponu ile hazırlanmış %2,5'luk gluteraldehitte 1,5 saat prefiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, aynı tamponla hazırlanmış %1'lik OsO₄ solüsyonunda 1 saat postfiksasyon uygulanmıştır. Bu aşamadan itibaren dokular, takip bitene kadar çalkalayıcı üzerinde tutulmuştur. OsO₄ solüsyonunda bir saat bekleyen dokular, sonrasında tekrar fosfat tamponunda 15 dk yıkanmışlardır. Dehidratasyon için yükselen alkol derecelerinden geçirilen dokular, propilen oksit ile saydamlaştırılmış ve araldit inklüzyonu

uygulanarak bloklanmıştır. Blokların kesim bölgelerini belirlemek amacıyla; yarı ince kesitler alınarak (RMC-MTX Ultramikrotom-ABD) toluidin mavisiyle boyanmıştır. Belirlenen bölgelerden ince kesitler alınıp, uranil asetat ve Reynold'un kurşun sitrat boyaları ile boyanmıştır. Daha sonra kesitler Anabilim Dalımızda bulunan Jeol 1010 transmisyon elektron mikroskopunda incelenerek, bulgular fotoğraflanmıştır.

Bax, Bcl-2, Kaspaz 3, KU70, SIRT1, SIRT6 proteinlerinin immünreaktivitelerinin değerlendirilebilmesi ve TUNEL tekniğinin uygulanması için, 5 µm kalınlığındaki testis kesitleri, poli-L-lisin kaplı lamlara alınmış ve üretici firmaların önerileri doğrultusunda immünohistokimyasal işlemler uygulanmıştır.

TUNEL Prosedürü

Bu çalışmada elde edilen testis doku kesitlerindeki apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL tekniğinden yararlanılmıştır. Bu amaçla 5 µm kalınlığında alınan testis doku kesitleri, bir gece 37°C'lik etüvde bekletilmiş ve ardından oda ısısında 5 dk soğumaya bırakılmıştır. Deparafinizasyon işlemi için toluol ve dehidratasyon işlemi için alkol serilerinden geçirilen kesitler, daha sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH 7.4, İnvitrogen) ile yıkanmıştır. Proteinlerin sindirilmesi için, proteinaz K solüsyonu (Merck Millipore) ile muamele edilen kesitler, sonra distile sudan geçirilmiştir. Bundan sonraki aşamalar üretici firmanın önerileri doğrultusunda, ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon SA. Merck Millipore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Endojen peroksidazın bloke edilmesi için kesitler %3'lük H₂O₂'e alınmış ve daha sonra kesitler dengeleme tamponu ile oda ısısında 30 dk bekletilmiş ve ardından sırasıyla Tdt enzimi, durdurma/yıkama tamponu ve anti-digoxigenin peroksidaz ile muamele edildikten sonra, 3,3'-diaminobenzidine tetrahidroklorid dihidrate (DAB) kullanılarak kromojenize edilen kesitlere, hematoksilin zıt boyaması yapılmıştır. Son olarak kesitler, alkol ve toluol serilerinden geçirilerek, kapatılmıştır.

İmmünohistokimyasal Prosedür

İmmünohistokimyasal incelemeler için parafine gömülen testis doku örneklerinden 5 µm'lik kesitler alınmış ve bir gece 56°C'lik etüvde bekletilmiştir. Ardından deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri uygulanan preparatlar, antijen geri kazanımı için sitrat tamponunda (pH 6; Invitrogen) kaynatılmıştır. Sonrasında kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için H₂O₂ (Abcam, Cambridge, ABD)'e maruz bırakılmışlardır. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikorun üretildiği türe uygun bloklama solüsyonunda (İnvitrogen) 10 dk. inkübe edilen kesitler, oda sıcaklığında, antikor dilüe etme solüsyonuyla (İnvitrogen) hazırlanan,

tavşan poliklonal Bax antikoru (1/100 dilüsyonda; Abcam, Cambridge, ABD), tavşan poliklonal Bcl-2 antikoru (1/200 dilüsyonda; LifeSpan BioSciences, Seattle, ABD), tavşan poliklonal KU70 antikoru (1/100 dilüsyonda; FnTest, Hubei, Çin) ve tavşan poliklonal SIRT1 antikorida (1/500 dilüsyonda; Novus Biologicals, Kolorado, ABD) +4 °C’de bir gece; tavşan poliklonal aktif kaspaz 3 antikoru (1/500 dilüsyonda; Abcam) ve tavşan poliklonal SIRT6 antikorida (1/1000 dilüsyonda; Novus Biologicals) 1 saat süreyle oda ısısında bekletilmişlerdir. Primer antikorum üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (İnvitrogen) 10 dk. oda ısısında tutulmuşlar ve son olarak HRP-streptavidin (İnvitrogen) ile 10 dk muamele edilmişlerdir. DAB (İnvitrogen) ile kromojenize edilen kesitler, hematoksin ile zıt boyama yapıldıktan sonra entellanla kapatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar BX-51 Olympus marka araştırma mikroskopunda incelenerek, fotoğrafları çekilmiştir.

Western Blot ile Protein Analizi

Testis doku örnekleri, alındıktan sonra tartılmış ve elde edilen dokuların ağırlıkları kayıt edilmiştir. Örneklere ağırlıklarına uygun miktarda, proteaz ve fosfataz inhibitör içeren doku ekstraksiyon tamponu (RIPA Lysis Buffer, ChemCruz, Gelderland, Hollanda) eklenmiştir. Tüm işlemler +4°C’de sürdürülmüş ve bir homojenizatör kullanılarak, homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 30 dk süre ile buz üzerinde inkübe edilmiş ve daha sonra örnek tüpleri +4°C’de 10.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantı alınan örneklerdeki protein miktarları, Nanodrop cihazı (Optizen NanoQ, Mecasy, Daejeon, Güney Kore) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda ölçülmüştür. Bu aşamada protein miktarı belirlenen tüm örnekler, eşit miktarda protein içerecek şekilde, örnek tamponu (İnvitrogen), örnek indirgeyici ajan (İnvitrogen) ve distile su miktarları da hesaplanarak, kuyucuklara yüklenmek üzere hazırlanmıştır. Dikey elektroforez cihazının tankı (Life Technologies Inc., Carlsbad, ABD), yürütme tamponu (İnvitrogen) ile doldurulmuş ve proteinlerin moleküler ağırlığına uygun olarak seçilen hazır jelde (Nupage Novex % 4-12 Bis-tris gel, İnvitrogen) yürütülmüşlerdir. iBlot 2 Gel Transfer cihazı (Life Technologies Inc) kullanılarak, nitroselülöz membrana (İnvitrogen) transfer edildikten sonra membranlar, iBind™ Flex Western Device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı kullanılarak, tavşan poliklonal KU70 (1/1000 dilüsyonda; FnTest), tavşan poliklonal SIRT1 (1/1000 dilüsyonda; Novus Biologicals) ve tavşan poliklonal SIRT6 (1/1000 dilüsyonda; Novus Biologicals) antikoları ile 2 saat inkübe edilmişlerdir. Tüm antikolar, iBind Flex solüsyon kiti (Thermo Fisher Scientific) içinde hazır bulunan yıkama solüsyonu ile dilüe edilmiştir. Sonrasında membranlar, kit içindeki yıkama solüsyonunda 3 kez 5’er dk yıkanmış ve sonra görüntü alma aşaması için hazır hale getirilmiştir. Kemiluminesans (SuperSignal West Pico Plus, Thermo

Scientific) ile 5 dk muamele edilen membranların, Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)'de bulunan Chemidoc™ MP Imaging System Biorad (Model No: Universal Hood 3, Biorad, ABD) cihazı kullanılarak görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Tüm bant profilleri Image J 1.48v programı (Wayne Rasband, National Institutes of Health, ABD) kullanılarak analiz edilmiş ve her membranda yer alan örnekler 'β aktin antikoru'yla normalize edilmişlerdir.

Hücre Sayımı ve İstatistiksel Analizler

TUNEL preparatlarının değerlendirmesinde, TUNEL tekniği uygulanan her bir testis kesitinde yer alan, ortalama 100 seminifer tübülde en az 3 ve daha fazla apoptotik hücre bulunduran seminifer tübüller sayılarak "apoptotik tübül indeksi" ve seminifer tübüllerde yer alan ortalama 1000 hücredeki apoptotik hücreler sayılarak da "apoptotik hücre indeksi" hesaplanmıştır (76).

Bax, Bcl-2, KU70, SIRT1, SIRT6 immünoaktiviteleri; histolojik skorlama yöntemleri ile semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. Bax/Bcl-2 oranı hesaplanarak, gruplar arası istatistiksel değişimi belirlenmiştir. İmmünoaktivite değerlendirmeleri; her bir hayvana ait testis kesitinde, rastgele 5 alan seçilerek, X200'lik büyütme kullanarak gerçekleştirilmiştir. Histolojik skorlama, kesitlerde immünoaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi (P_i) ve boyanma derecesi (i) dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Boyanma dereceleri; 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirilmiş ve ortalama histolojik skor, her bir hayvana ait kesit için $H\ SCORE = \sum i \times P_i(i+1)$ formülü ile hesaplanmıştır (155, 157-161).

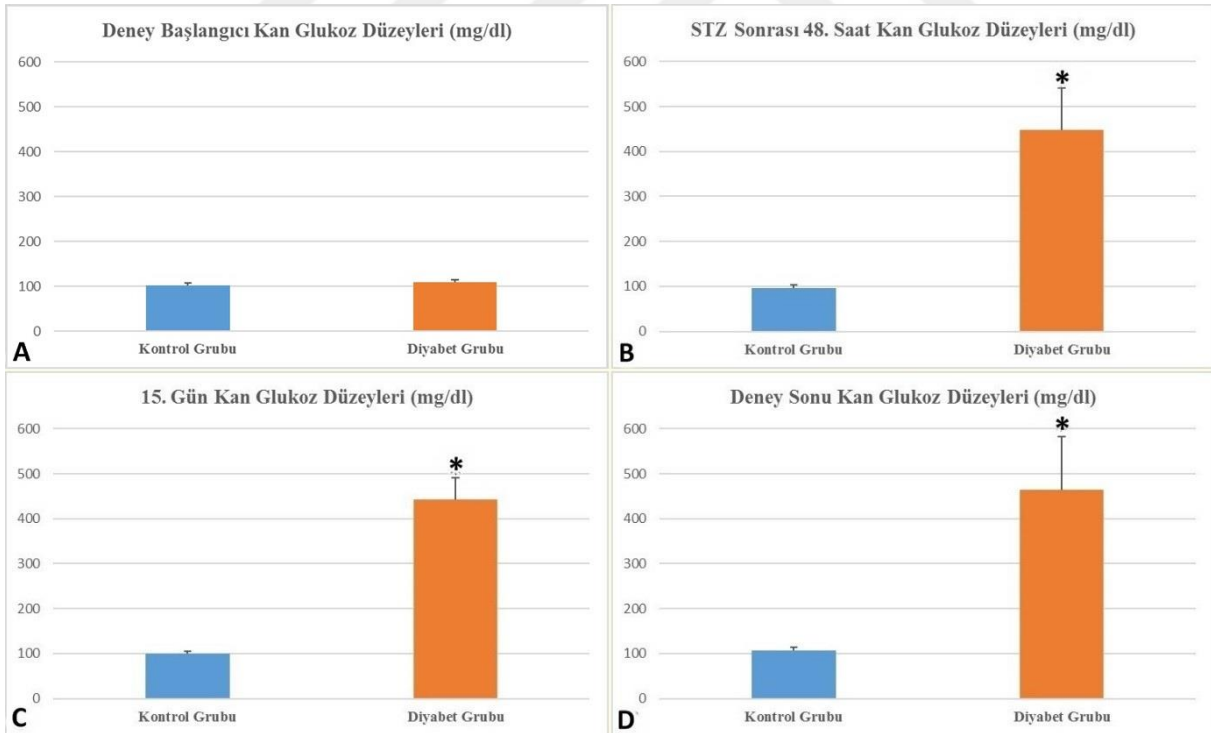
Kaspaz 3 preparatlarının değerlendirilmesinde, kesitlerin hangi grup deneğe ait olduğunu bilen ve bilmeyen birer araştırmacı tarafından, X200 objektif kullanılarak, her preparattaki 1000 hücre içinde bulunan immünopozitif hücre sayılarına göre skorlama yapılmıştır (76).

İstatistiksel analizler için; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda SPSS 20.0 programı (Lisans no: 10240642) kullanılmış, değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak alınmıştır. $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Student t testi ile kontrol ve diyabet grubundaki deneklerin kan-glukoz düzeylerinde, farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Diyabet ve kontrol grubu deneklere ait seminifer tübül çapı ölçümleri, apoptotik seminifer tübül ve apoptotik hücre indeksleri, biyokimyasal ve immünohistokimyasal ölçümler, Mann-Whitney U testi uygulanarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

KAN GLUKOZ DÜZEYİ BULGULARI

Deneye başlamadan önce, tüm deneklerin 'kan glukoz düzeyleri' ölçülmüştür. Kontrol ve diyabet gruplarının kan glukoz ölçümleri; diyabet oluşturulduktan 48 saat sonra, bir aylık deney süresince her hafta ve deney sonunda tekrarlanmıştır.

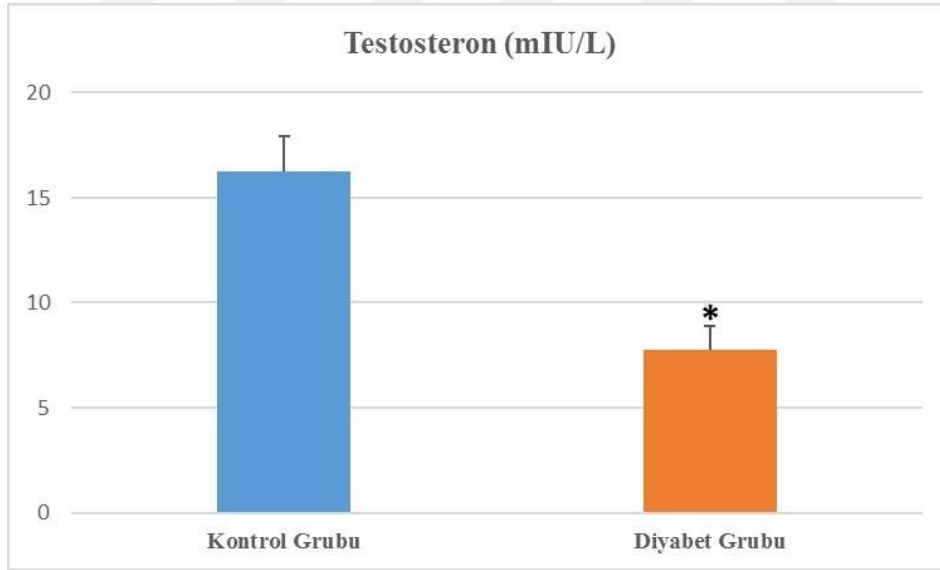


Şekil 5. Deney süresince ölçülen kan glukoz değerlerini içeren grafik. A. Deney başlangıcı kan glukoz değerleri. B. STZ sonrası 48. saat kan glukoz değerleri. C. 15. gün kan glukoz değerleri. D. Deney sonu kan glukoz değerleri. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Deney öncesi ölçülen kan glukoz değerlerinde, kontrol ve diyabet grubu arasında farklılık saptanmamıştır ($P=0.584$; Şekil 5A). STZ uygulanmasından 48 saat sonra ölçülen diyabet grubuna ait kan glukoz değerleri (448.62 ± 92.44), kontrol grubu değerlerine (96.62 ± 7.34) göre anlamlı olarak artmıştır ($P<0.001$; Şekil 5B) ve diyabet grubu deneklerin değerleri, diyabetin oluştuğunu gösterir şekilde 250 mg/dl'nin üzerinde bulunmuştur. Deneyin 15. günü ölçülen kan glukoz değerlerine bakıldığında, diyabet grubu değerleri ($442.12 \pm 49,23$) ve kontrol grubu değerleri (100 ± 5.92) arasındaki fark devam etmiştir ($P<0.001$; Şekil 5C). Deney sonu kan glukoz değerlerinde ise diyabet (463.75 ± 118.91) ve kontrol grubu değerleri (106.5 ± 7.19) stabil kalmış ($P<0.001$; Şekil 5D) ve diyabet grubu kan glukoz düzeyleri, 4 haftalık deney süresince 250 mg/dl'nin üzerinde seyretmiştir (Şekil 5).

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Deney sonrası kardiyak ponksiyon ile alınan kan örneklerinde, kontrol ve diyabet grubu deneklerinin Elisa yöntemiyle ölçülen testosteron değerleri karşılaştırıldığında; diyabet grubu testosteron seviyeleri (7.73 ± 1.14), kontrol grubu değerlerine göre (16.25 ± 1.67) istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($P<0.001$; Şekil 6).



Şekil 6. Kontrol ve diyabet grubu serum testosteron değerlerinin izlendiği grafikte, *kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

MORFOMETRİK BULGULAR

Hazırladığımız H-E boyası uygulanmış preparatlarda, her iki grubun testis doku örneklerinde seminifer tübül çaplarının ölçümü; X200'lük büyütmede, oküler mikrometre kullanılarak, yuvarlak veya yuvarlağa yakın rastgele seçilmiş, her preparatta 10 seminifer tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirilmiştir (155, 156).

Kontrol ve diyabet grubu deneklerinin seminifer tübül çap ölçümleri karşılaştırıldığında; diyabet grubu değerleri (275.38 ± 11.04), kontrol grubu değerlerine (345.63 ± 14.77) göre istatistiksel anlamlılıkla azalmıştır ($P < 0.001$; Şekil 7).



Şekil 7. Kontrol ve diyabet grubu seminifer tübül çapı değerlerini gösteren grafik. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

MORFOLOJİK BULGULAR

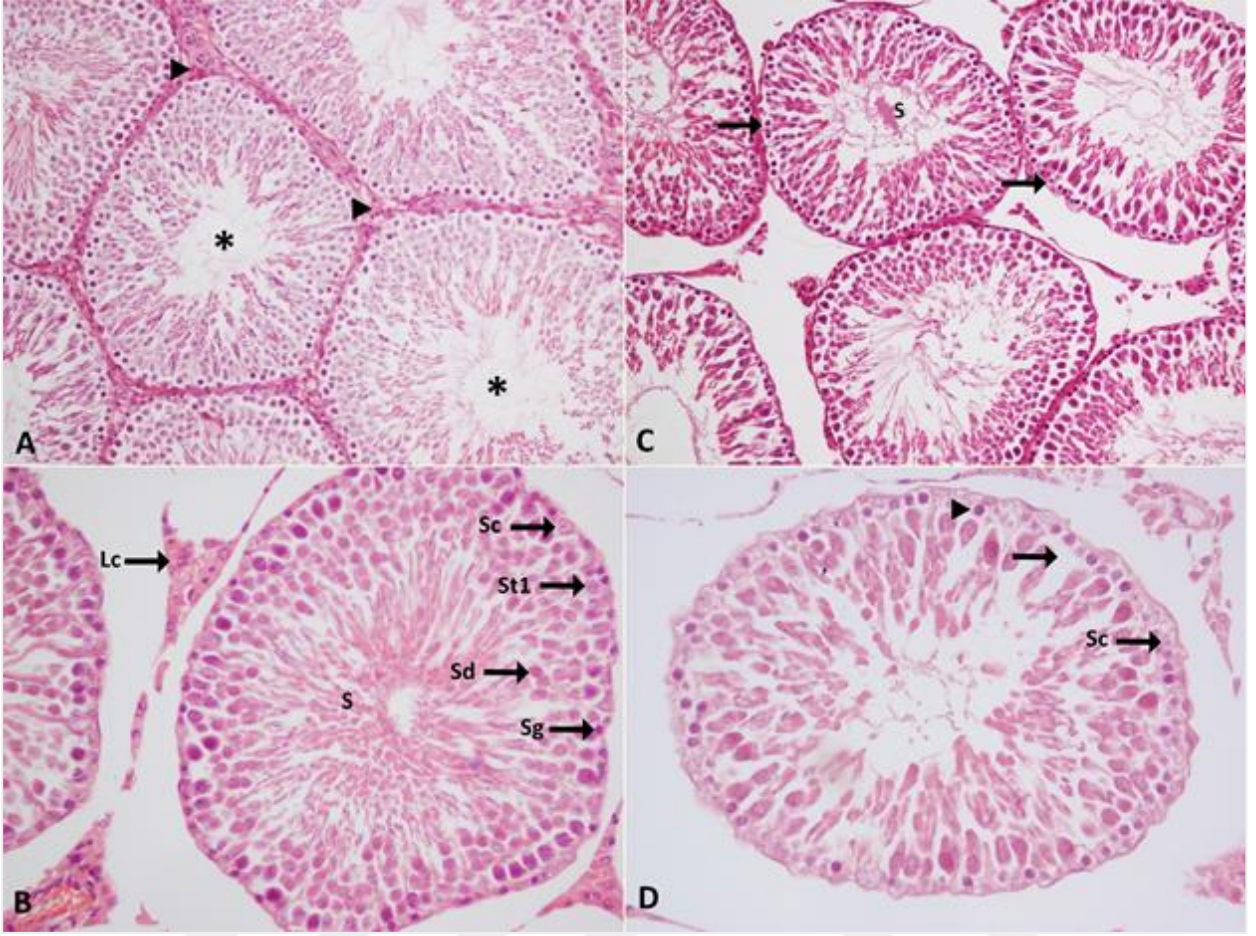
Işık ve Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna ait deneklerden alınan testis doku kesitleri incelendiğinde, seminifer tübülleri döşeyen epitelde organizasyon bütünlüğü izlenmiştir. Seminifer tübüllerde, bazal membrandan lümene doğru spermatogenik seri hücrelerinin sırasıyla; spermatogonyum, spermatosit-I, spermatosit-II, erken ve geç spermatid şeklinde düzenli yerleştikleri görülmüştür. Spermiler ise lümeninde yer almaktadır (Şekil 8A, 8B; Şekil 9A, 9B, 9C, 9F). Spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri, bazal membran üzerine yerleşmişlerdir (Şekil 8B; Şekil 9A, 9B). Spermatosit-I'ler belirgin nükleusları, geniş sitoplazmaları ve en büyük çapa sahip spermatogenik seri hücreleri olmalarıyla kolaylıkla ayırt edilmekte ve genellikle seminifer tübüllerin ikinci hücre sırasını oluşturmaktadırlar (Şekil 8A, 8B; Şekil 9A, 9C).

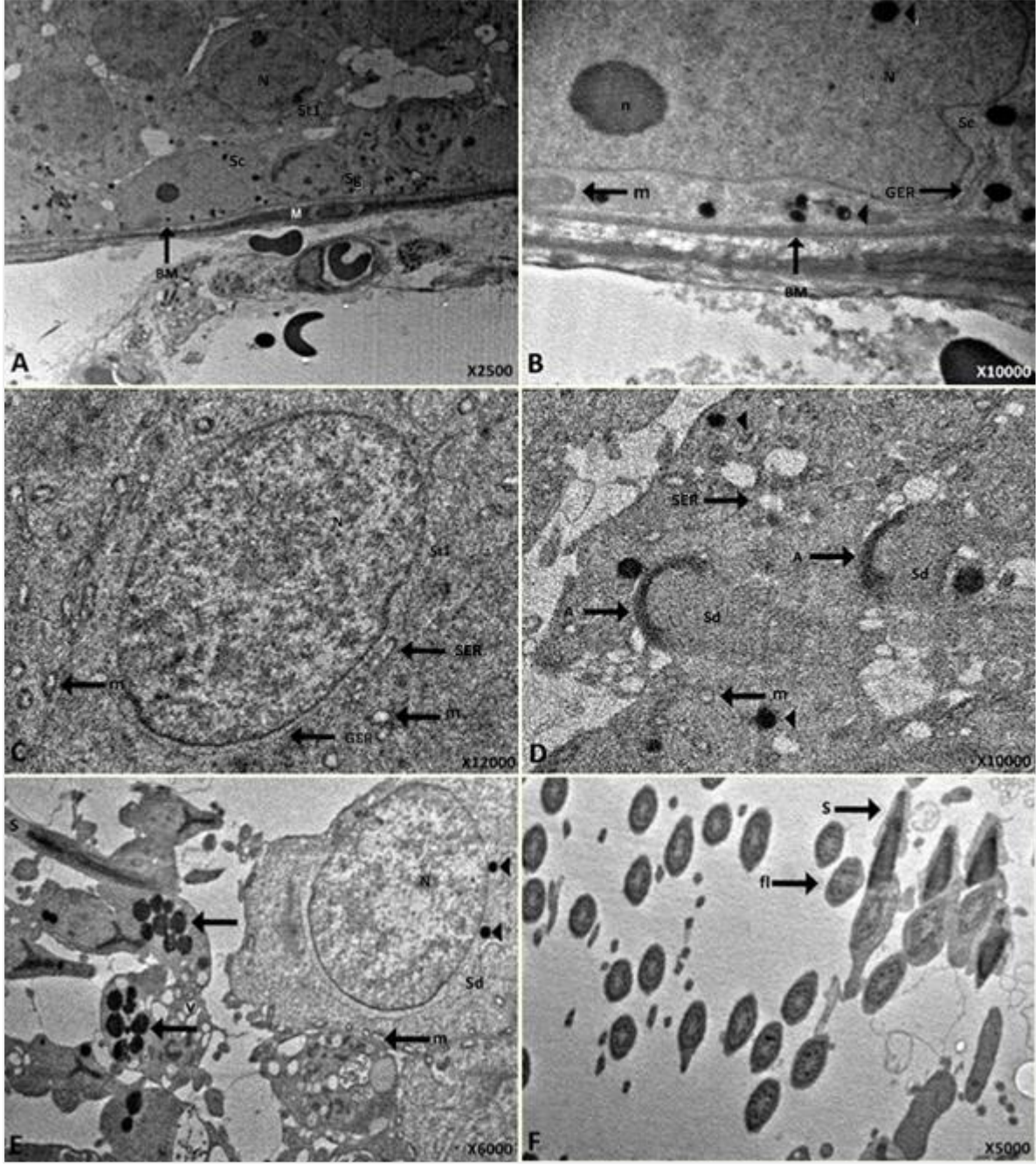
Spermatosit-II'ler çok sık izlenmemekle birlikte, spermatosit-I'lerin hemen üzerinde konumlanmaktadır. Spermatidler, koyu boyanan nükleuslarıyla lümene yakın, spermiler ise uzun, iğ şeklindeki nükleusları ile lümeninde konumlanmış olarak izlenmektedir (Şekil 8A, 8B; Şekil 9D, 9E, 9F). Testis dokusunda interstisyel bağ dokusunda bulunan çoğunlukla poligonol şekilli olan Leydig hücreleri; oval biçimli nükleusları ve eozinofilik boyanan sitoplazmalarıyla, interstisyel alanda bulunan diğer hücrelerden kolaylıkla ayırt edilmektedir (Şekil 8B).

Diyabet grubunda gerçekleştirdiğimiz morfolometrik değerlendirmelerimiz neticesinde, çaplarının kontrole göre anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edilen seminifer tübüllerde, şekilsel değişimler izlenmiştir. Seminifer tübüllerde izlenen bu şekilsel değişimlerin; spermatogenik seri hücrelerinin diziliminde bozulma, hücrelerde sitoplazma kaybı ve organizasyon bozuklukları sebebiyle ortaya çıktığı kanısındayız.

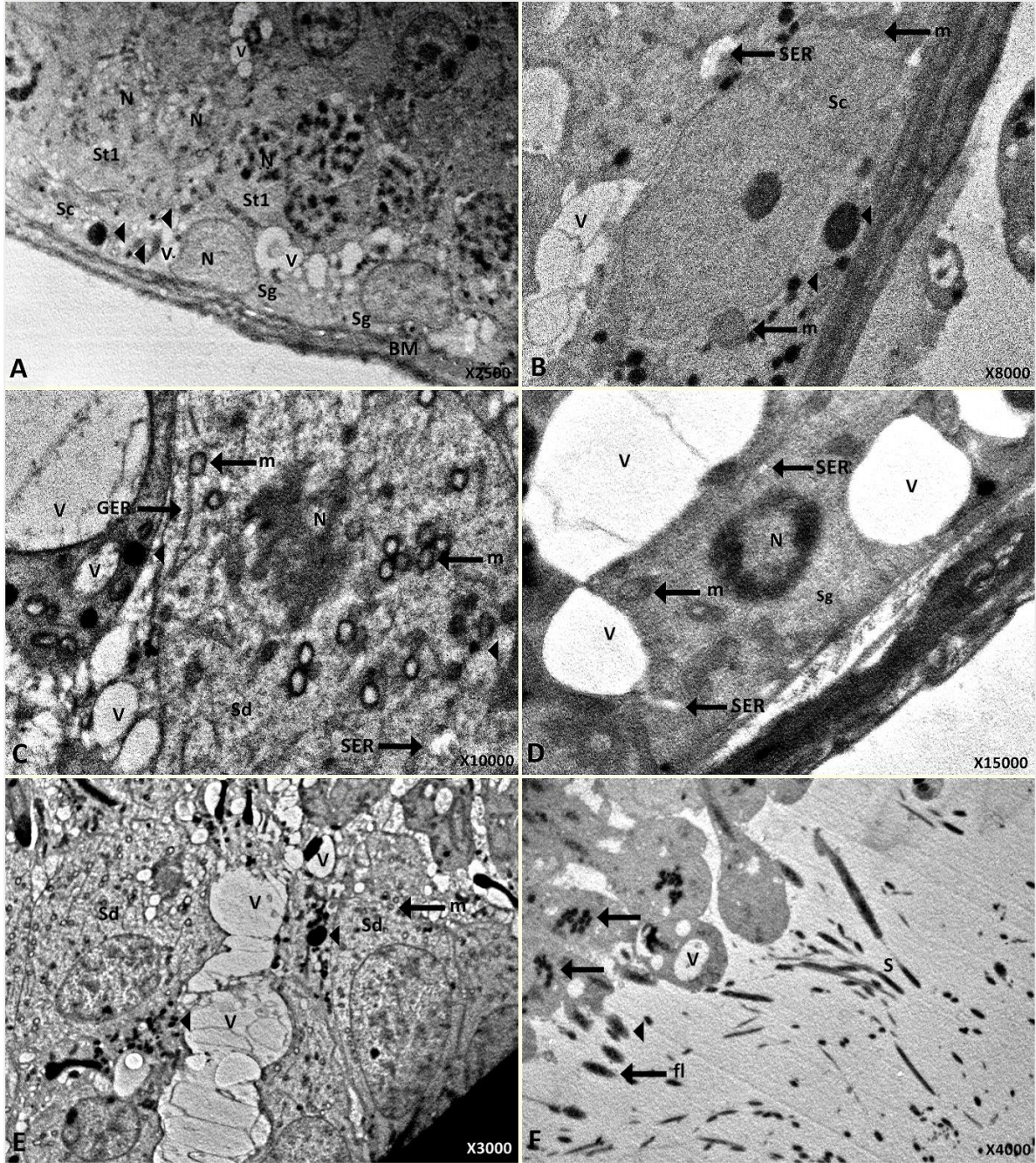
Diyabet grubunda yer alan deneklerin testis dokularının, H-E boyama yaptığımız preparatlarında seminifer tübüller genel olarak değerlendirildiğinde; Sertoli hücreleri ile az sayıda spermatogenik seri hücrelerinin oluşturduğu seminifer tübüllerin yanı sıra; spermatogonyum, spermatosit-I, spermatid ve sperm bulunduran tübüller de izlenmiştir (Şekil 8C). Sertoli ve spermatogenik hücrelerin dejenerasyonu sebebiyle, germinal epitelde yer yer geniş vakuollerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 8C, 8D; Şekil 10A-F). Spermatogenik hücrelerin sitoplazmalarında elektron yoğun cisimciklerin birikimi dikkat çekmektedir. Özellikle lümene yakın bulunan ve rezidüel cisimcikler içeren spermatidler ile beraber, spermelerde elektron yoğun cisimcik birikimi ve geniş vakuoller bulunmaktadır (Şekil 10E, 10F). Sertoli hücrelerinde düzensiz nükleus, çok miktarda vakuol oluşumu, mitokondrilerde krista kaybı, düz endoplazmik retikulum azalması (SER) tespit edilmiştir (Şekil 10A, 10B). Bazı spermatogonyum ve spermatidlerin sitoplazmalarında vakuol oluşumu, mitokondrilerde dış membranda kalınlaşma, düz endoplazmik retikulum azalması, nükleuslarında kromatin görünümünde farklılaşmalar görülmüştür (Şekil 10A, 10C, 10D). Seminifer tübül bazal membranlarında izlenen ondülasyonların da tübül epitel hücrelerinde izlenen bu dejenerasyonlar sebebiyle meydana geldiği düşüncesindeyiz (Şekil 8C, 8D; 10A).



Şekil 8. Kontrol ve diyabet grubu testis kesitlerinde; A. Kontrol grubunda normal yapıda seminifer tübüller (*) ile interstisyel bağ doku (▶) izlenmektedir, H-E, X200. B. Kontrol grubuna ait, seminifer tübül epitelinde spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-1'ler (St1), spermatidler (Sd), spermler (S), Sertoli hücreleri (Sc) ve interstisyel alanda Leydig hücreleri (Lc) izlenmektedir, H-E, X400. C. Diyabet grubu testis kesitinde, seminifer tübüllerde spermler (S) ve diyabetin sebep olduğu histopatolojik değişiklikler izlenmektedir (→), H-E, X200. D. Diyabetik grubun testis kesitlerinde, hücrelerde organizasyon bozukluğu, ayrışmalar (→) ve piknotik hücre nükleusları (▶) dikkat çekmektedir, Sertoli hücreleri (Sc), H-E, X400.



Şekil 9. Kontrol grubu elektron mikroskopik görüntülerinin izlendiği şekilde; A. Normal yapıda bazal membran (BM), peritübüler myoid hücre (M), Sertoli hücresi (Sc), spermatogonyum (Sg), spermatosit-I (St1) ve nükleusu (N) izlenmektedir. B. Normal yapıda izlenen Sertoli hücresi (Sc), nükleus (N), nükleolus (n), mitokondri (m), granüler endoplazmik retikulum (GER) ve elektron yoğun cisimcikler (►) görülmektedir. C. Spermatosit-I (St1) sitoplazmasında çok sayıda mitokondri (m), granüler endoplazmik retikulum (GER) ve düz endoplazmik retikulum (SER) izlenmektedir. D. Akrozomal (A) yapılarıyla izlenen spermatidler (Sd), mitokondriler (m), düz endoplazmik retikulum (SER) ve elektron yoğun cisimcikler (►) görülmektedir. E. Lümeneye yakın konumlanmış bir erken spermatid (Sd), lümeneye yer alan spermler (S), rezidüel cisimcikler (→), vakuolizasyonlar (V) ve elektron yoğun cisimcikler (►) izlenmektedir. F. Lümeneye yer alan spermler (S) ve mikrotübül yapılarını içeren flagellumlar (fl) görülmektedir. Kurşun sitrat-uranil asetat.



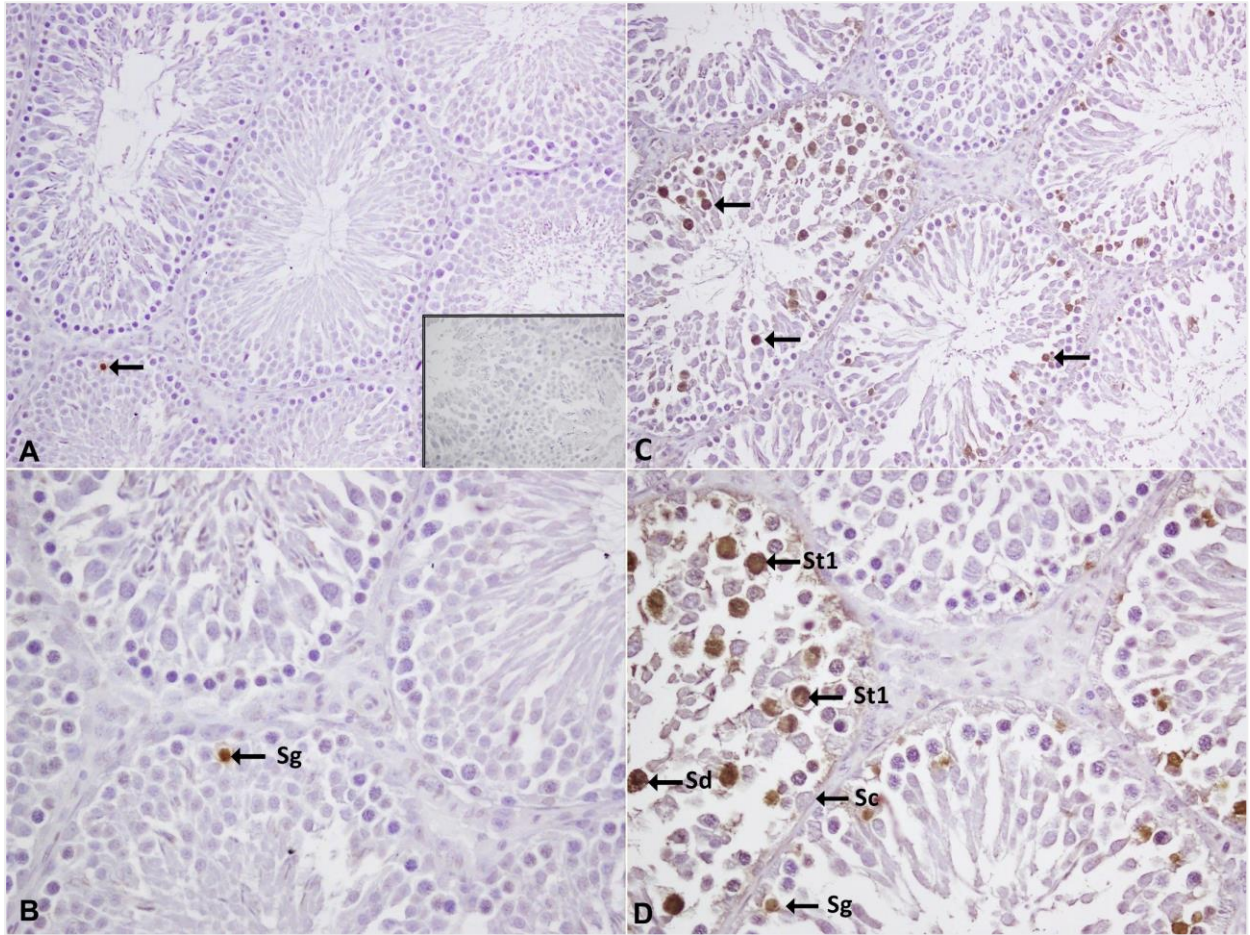
Şekil 10. Diyabet grubu elektron mikroskopik görüntülerinin izlendiği şekilde; A. Düzensiz bazal membran (BM) yapısı ile birlikte, Sertoli hücrelerinde (Sc) vakuoller (V), spermatogonyum (Sg), dejenere olmuş nükleuslarıyla (N) spermatosit-I'ler (St1) ve elektron yoğun cisimcikler (▶) görülmektedir. B. Sertoli hücrelerinde (Sc) elektron yoğun cisimcikler (▶), geniş vakuoller (V), mitokondri (m) ve düz endoplazmik retikulum (SER) dikkat çekmektedir. C. Spermatid (Sd) sitoplazmasında dejenere nükleus (N), vakuoller (V), mitokondriler (m), granüler endoplazmik retikulum (GER), düz endoplazmik retikulum (SER) ve elektron yoğun cisimcikler (▶) izlenmektedir. D. Spermatogonyum (Sg) içerisinde vakuol (V), az sayıda mitokondri (m), düz endoplazmik retikulum (SER) ve nükleus (N) görülmektedir. E. Spermatidler (Sd), mitokondri (m), çok sayıda vakuol (V) ve elektron yoğun cisimcik (▶) görülmektedir. F. Lümeninde az sayıda sperm (S), spermere ait mikrotübül yapılarını içeren flagellumlar (fl) ve rezidüel cisimcikler (▶) izlenmektedir. Kurşun sitrat-uranil asetat.

TUNEL Bulguları

Kontrol ve diyabet gruplarında TUNEL metoduyla, apoptotik hücreler gösterilmeye çalışılmıştır. Apoptozisin değerlendirilmesinde, “apoptotik hücre indeksi” ve “apoptotik tübül indeksi” olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla kullanılan TUNEL reaksiyonuyla; kontrol grubu testis kesitlerinde, seminifer tübüllerde bulunan az sayıda hücrede pozitivite izlenmiş ve bunların özellikle spermatogonyumlar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11A, 11B).

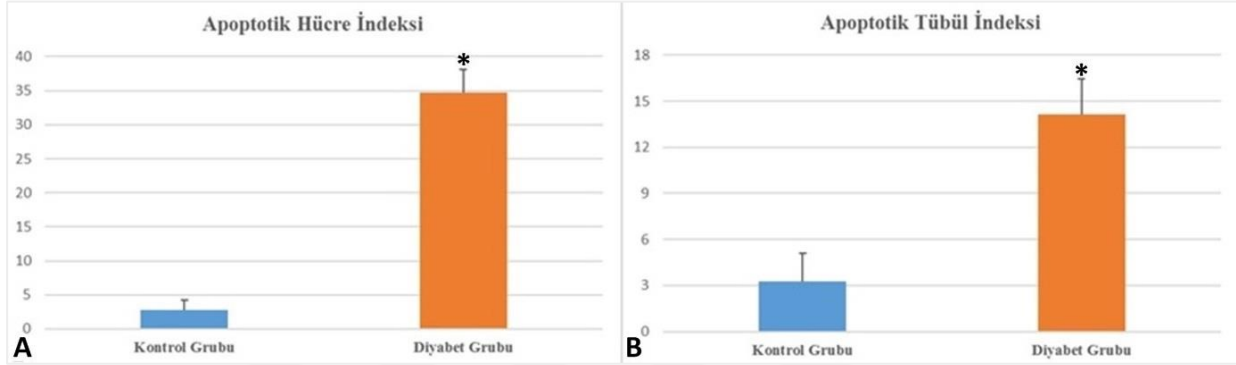
Ancak diyabet grubu testis kesitlerindeki seminifer tübüllerde, spermatogonyumların yanı sıra, spermatogenik seriye ait diğer hücrelerde de çok sayıda TUNEL pozitivitesi izlenmiştir (Şekil 11C, 11D).



Şekil 11. Kontrol ve diyabet grubu TUNEL bulgularını gösteren şekilde; A. Kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücreler izlenmektedir (→), X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoksilin zıt boyaması, X400. B. Kontrol grubuna ait preparatta TUNEL pozitif spermatogonyum (Sg) görülmektedir, X400. C. Diyabet grubunda TUNEL pozitif hücreler izlenmektedir (→), X200. D. Diyabet grubuna ait kesitte TUNEL pozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd) ve Sertoli hücreleri (Sc) görülmektedir, X400. TUNEL ve hematoksilin zıt boyaması.

Apoptotik hücre indeksi değerleri, kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırıldığında; diyabet grubu değerlerinin (34.75 ± 3.37), kontrol grubuna (2.75 ± 1.48) göre anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($P < 0.001$; Şekil 12A)

Apoptotik tübül indeksi değerlerine bakıldığında ise diyabet grubu değerleri (14.13 ± 2.32), kontrol grubu değerlerine (3.25 ± 1.83) göre istatistiksel anlamlılıkla artmıştır ($P < 0.001$; Şekil 12B).



Şekil 12. Kontrol ve diyabet gruplarında Tunel indeksi değerlerini gösteren şekilde; A. Apoptotik hücre indeksi. B. Apoptotik tübül indeksi. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

İmmünohistokimya ve Western Blot Bulguları

Bax, Bcl-2, KU70, SIRT1, SIRT6 immünreaktiviteleri, histolojik skorlama yöntemi ile semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. İmmünreaktivite değerlendirmeleri; kesitlerin hangi grup deneğe ait olduğunu bilen ve bilmeyen birer araştırmacı tarafından, her bir hayvana ait testis kesitinde, rastgele 5 alan seçilerek, X200 büyütme kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

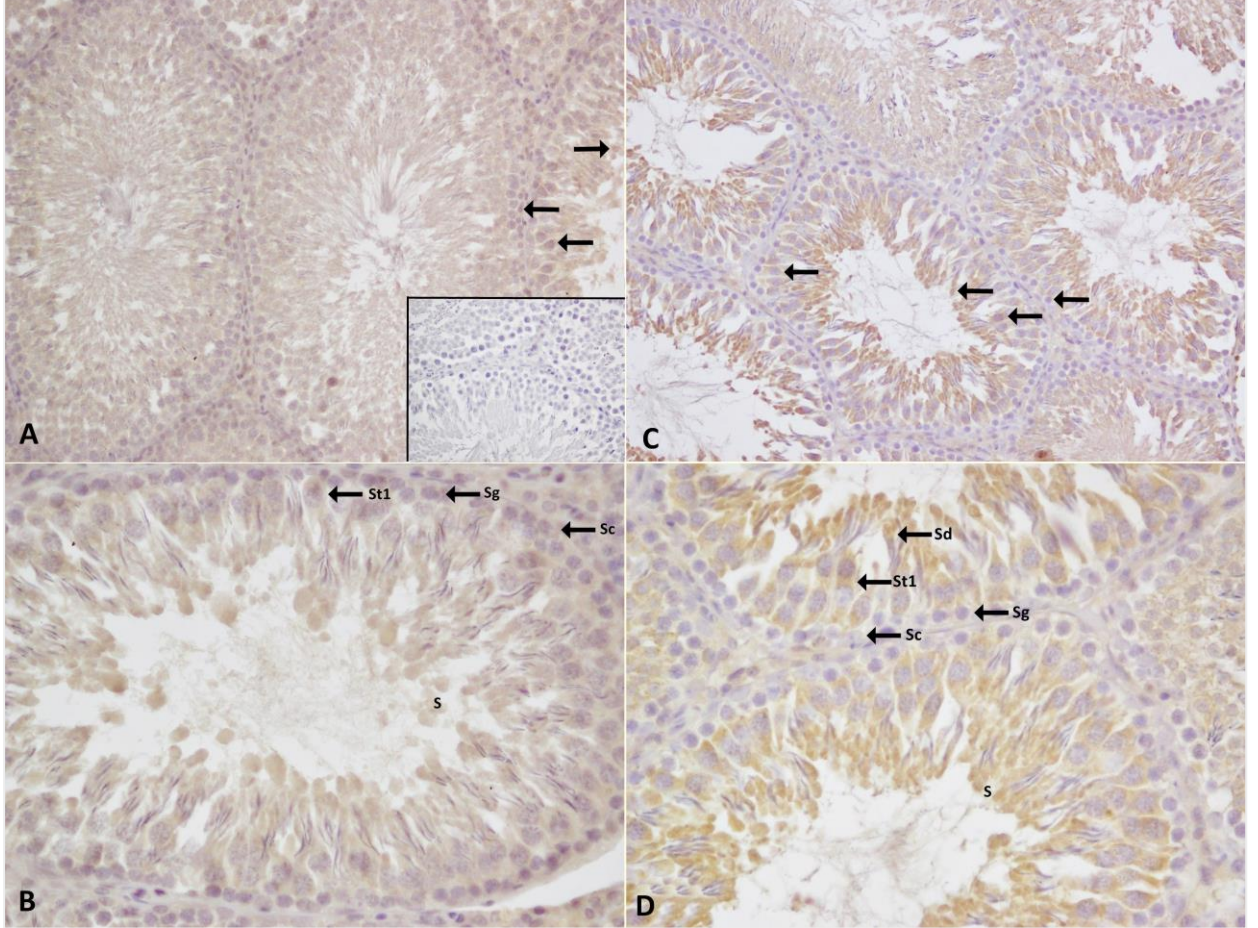
Kaspaz 3 preparatlarının değerlendirilmesinde ise X200 objektif kullanılarak, her bir deneğe ait preparatlardaki 5 farklı alanda, 1000 hücre içinde bulunan immünpozitif hücre sayılarına göre skorlama yapılmıştır.

Bax, Bcl-2 ve kaspaz 3 ifadeleri immünohistokimya, KU70, SIRT1 ve SIRT6 ifadeleri ise hem immünohistokimya hem de western blot yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bax bulguları: Tüm deneklere ait testis doku kesitlerinde sitoplazmik boyanma gösteren Bax immünreaktiviteleri incelendiğinde; kontrol grubunda, seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücre serilerinde zayıf boyanma olduğu gözlenmiştir. Sertoli hücrelerinde boyanma izlenmezken, spermatogonyumlarda oldukça zayıf, diğer spermatogenik seri hücrelerinde ise hafif şiddette boyanma tespit edilmiştir (Şekil 13A, 13B).

Diyabet grubu Bax immünreaktiviteyi incelendiğinde ise Sertoli hücrelerinde boyanma görülmemiş, spermatogonyumlarda zayıf boyanma gözlenmiş, spermatosit-I ve diğer spermatogenik seri hücrelerinde orta şiddette boyanma izlenmiştir (Şekil 13C, 13D).

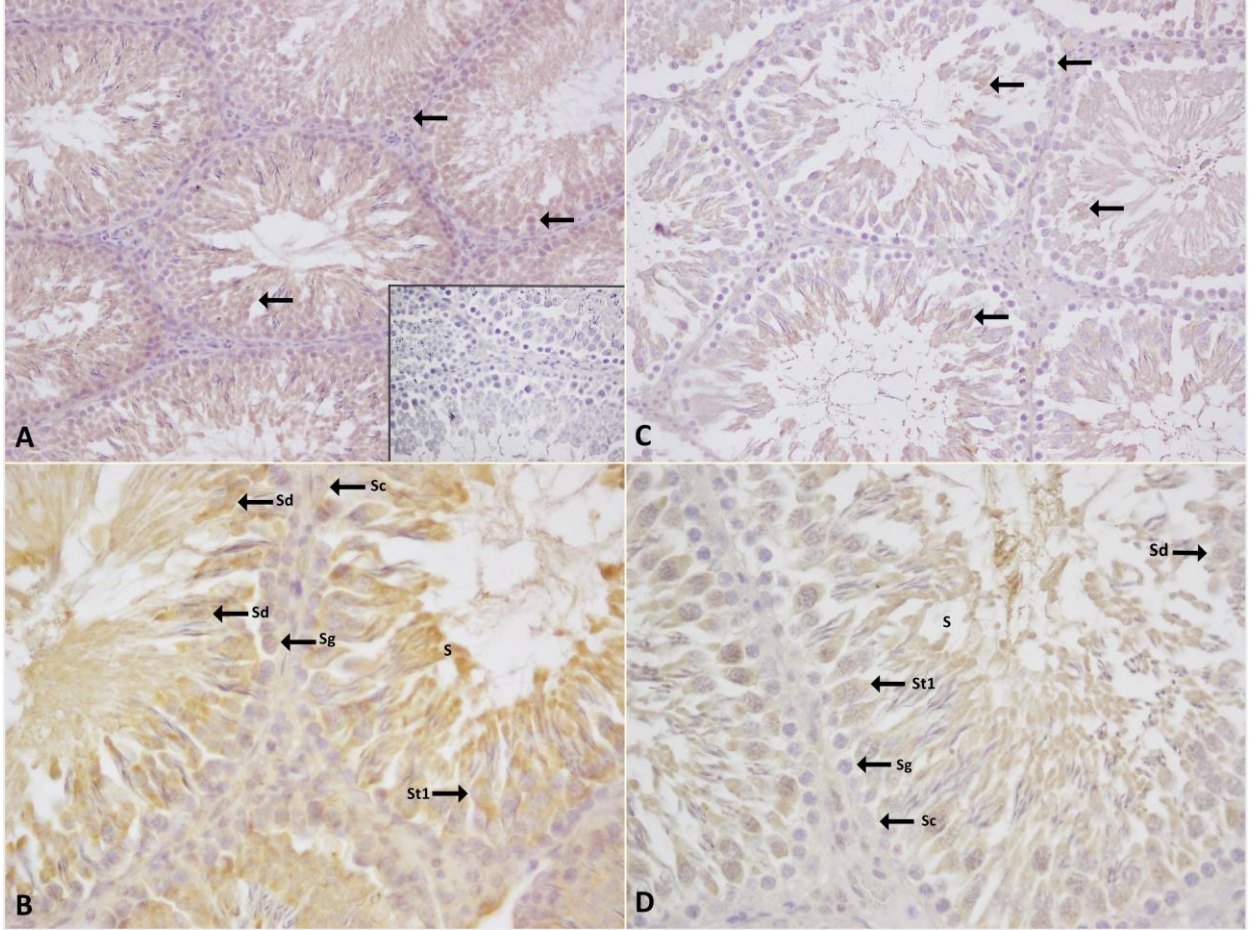
Diyabet grubunda Bax immünreaktiviteyi (234.38 ± 18.48), kontrol grubuna (121.13 ± 7.18) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği belirlenmiştir (P<0.001, Şekil 15A).



Şekil 13. Kontrol ve diyabet gruplarına ait Bax sitoplazmik immünreaktiviteyi gösteren hücrelerin görüldüğü şekilde; A. Kontrol grubunda immünpozitif hücreler oklarla işaretlenmiş olarak izlenmektedir (→), X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoksilen zıt boyaması, X400. B. Kontrol grubuna ait kesitte immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermler (S) görülmektedir, X400. C. Diyabet grubuna ait preparatta immünpozitif hücreler oklarla belirtilmiştir (→), X200. D. Diyabet grubunda immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), spermler (S) izlenmektedir. Her iki grupta da, Sertoli hücrelerinde (Sc) immünreaktivite görülmemiştir, X400. Bax ve hematoksilen zıt boyaması.

Bcl-2 bulguları: Seminifer tübüllerdeki hücrelerde, sitoplazmik boyanma gösteren Bcl-2 immünreaktiviteyi bakıldığında; kontrol grubuna ait testis doku kesitlerinde, seminifer tübüllerdeki hücre serilerinde orta ve yoğun derecede sitoplazmik boyanma olduğu gözlenmiştir. Spermatogonyumlarda zayıf, spermatosit-I hücrelerinde orta şiddette sitoplazmik immünreaktivite izlenirken, Sertoli hücrelerinde boyanma görülmemiştir (Şekil 14A, 14B).

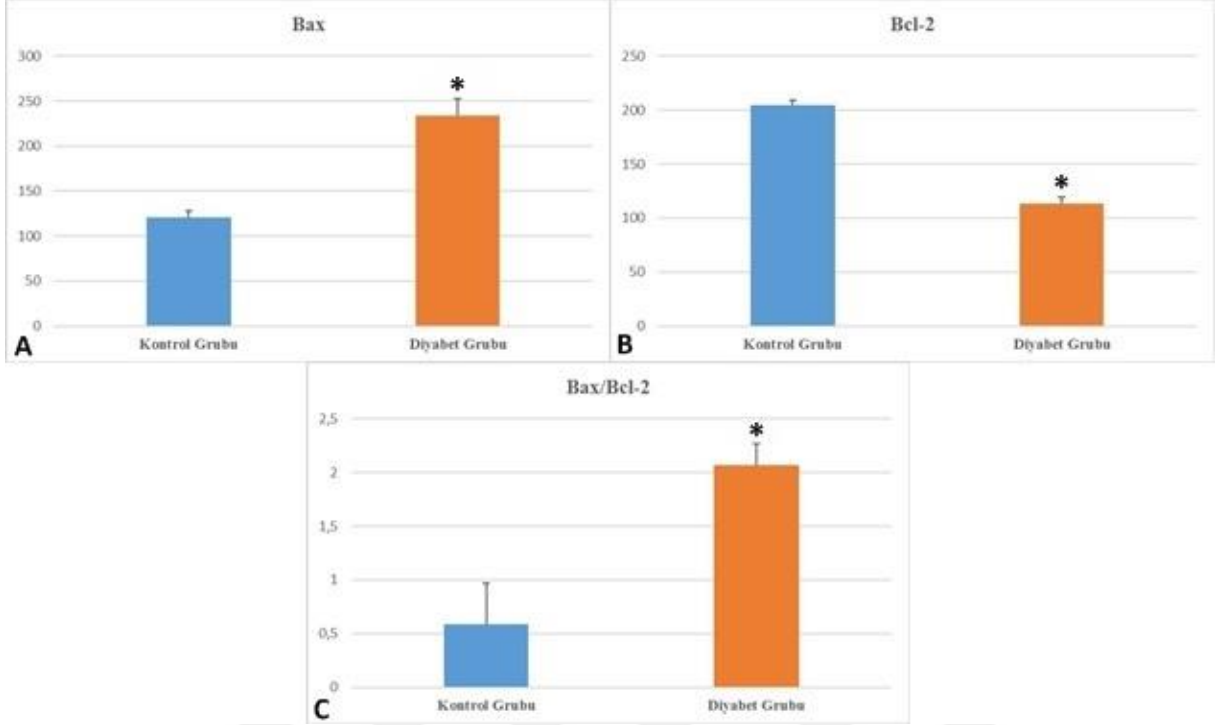
Diyabet grubu testis kesitlerinde ise spermatogonyumlarda ve Sertoli hücrelerinde boyanma izlenmemiş, diğer seri hücrelerinde zayıf şiddette boyanma gözlenmiştir (Şekil 14C, 14D). Bcl-2 immünreaktivitesi diyabet grubu değerleri (113.13 ± 5.93), kontrol grubuna (204.38 ± 4.95) göre istatistiksel anlamlılıkla azalmıştır ($P < 0.001$, Şekil 15B).



Şekil 14. Kontrol ve diyabet gruplarında Bcl-2 immünreaktivitelerinin izlendiği mikrograflarda; **A.** Kontrol grubuna ait kesitte immünpozitif hücreler oklarla belirtilmiştir (\rightarrow), X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoksilen zıt boyaması, X400. **B.** Kontrol grubunda immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), spermler (S) şekildeki gibidir, X400. **C.** Diyabet grubuna ait preparatta immünpozitif hücreler oklarla gösterilmiştir (\rightarrow), X200. **D.** Diyabet grubunda immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), spermler (S) izlenmektedir, X400. Bcl-2 ve hematoksilen zıt boyaması uygulanan preparatlarda Sertoli hücrelerinde (Sc) immünreaktivite görülmemiştir.

Bax/Bcl-2 oranı çalışılan dokulardaki hücrelerin apoptoze gidip gitmeyeceğine karar vermede oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Eğer Bax ifadesi artarsa, hücre apoptoze yönelecek; Bcl-2 ifadesi artarsa, hücre hayatta kalacaktır. Bu amaçla; Bax/Bcl-2 oranını incelediğimizde, bu oranın diyabet grubunda (2.07 ± 0.204) kontrol grubuna (0.59 ± 0.38) göre

anlamli olarak yuksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$, Şekil 15C). Bu durum bize diyabet grubunda apoptozise eğilimli hucrelerin anlamli olarak arttiğını gostermektedir.



Şekil 15. Kontrol ve diyabet gruplarına ait Bax, Bcl-2 grafiklerinin izlendiği bu Şekilde; A. Bax immunreaktivite değerleri. B. Bcl-2 immunreaktivite değerleri. C. Bax/Bcl-2 oranı grafiğini gostermektedir. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P<0.05$ anlamli kabul edilmiştir.

Kaspaz 3 bulguları: Her iki gruba ait testis doku kesitlerinde, kaspaz 3 immunreaktiviteyi incelendiğinde, hucreyel lokalizasyonunun hem nukleer hem de sitoplazmik olduğu gorumuştur.

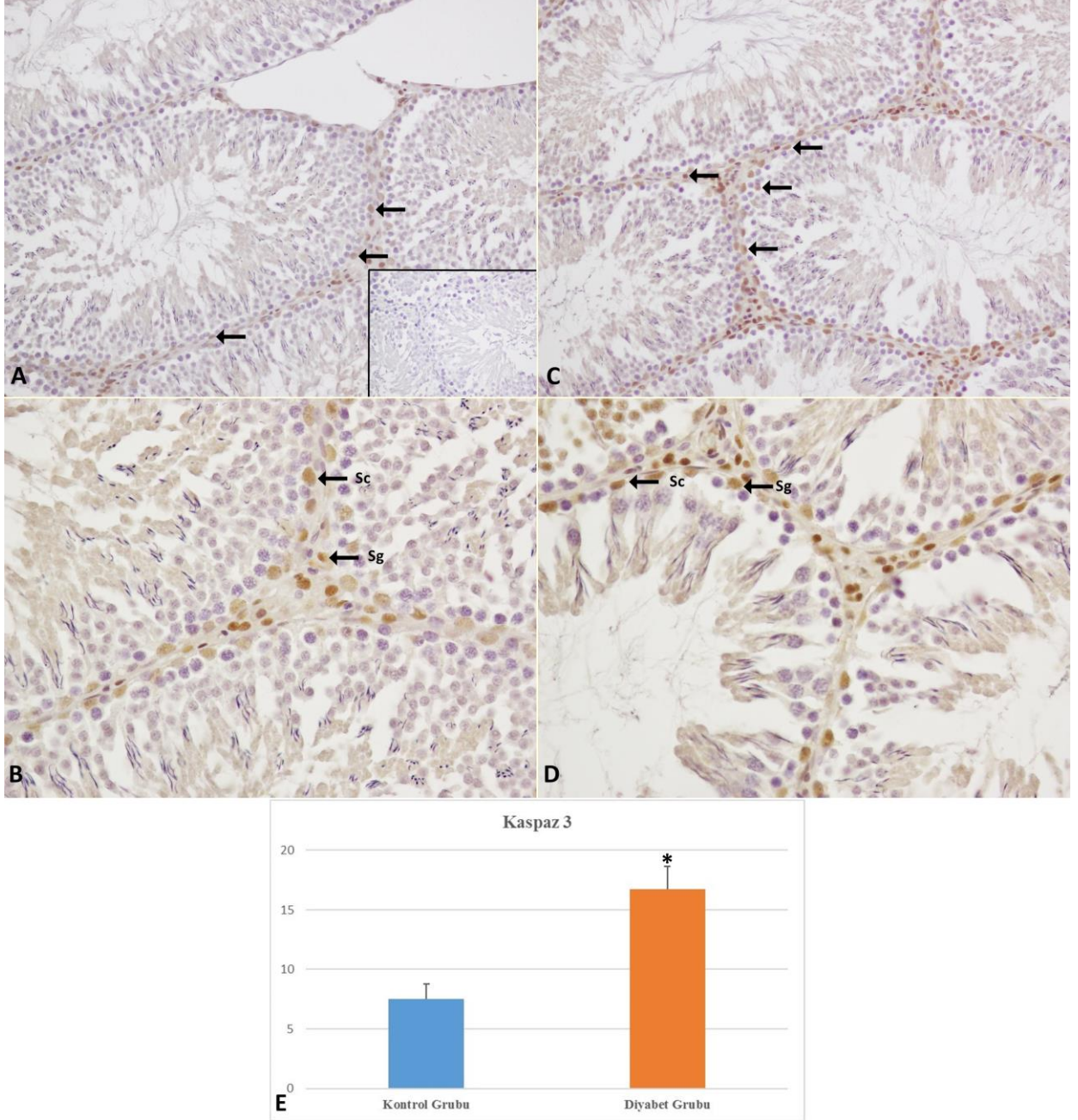
Kontrol grubu testis doku kesitlerinde, az sayıda hucrede boyanma olduğu gorumuş, spermatogenik seri hucrelerinde ve Sertoli hucrelerinde hafif Şiddette boyanma izlenmiştir (Şekil 16A, 16B).

Ancak diyabetik grubun testis preparatlarına bakıldığında, seminifer tubullerde cok sayıda immunpozitif hucre tespit edilmiştir (Şekil 16C, 16D).

Her iki grup testis doku kesitlerinde kaspaz 3 immunreaktivitesi genellikle sadece spermatogonyum ve Sertoli hucrelerinde gozlenmiştir.

Gruplar arası kaspaz 3 immunreaktivite değerleri karşılaştırıldığında; diyabet grubu değerlerinin (16.75 ± 1.9), kontrol grubuna (7.5 ± 1.3) gore anlamli olarak yuksek olduğu saptanmiştir ($P<0.001$, Şekil 16E).

Her iki grupta da interstisyel alanlarda yer alan bazı hücrelerdeki immünreaktivite belirgindir (Şekil 16). Ancak diyabetik grup testis kesitlerinde, interstisyel sahalarda immünreaktivite gösteren hücre sayısı ve yoğunluğu artışı, histolojik bir skorlama yapmamıza rağmen dikkat çekicidir.



Şekil 16. Kontrol ve diyabet gruplarında kaspaz 3 immünreaktiviteleri ve grafiğinin bulunduğu şekilde; A. Kontrol grubuna ait mikrografta immünpozitif hücreler gösterilmiştir (→), X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoksilin zıt boyaması, X400. B. Kontrol grubunda immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), Sertoli hücresi (Sc) izlenmektedir, X400. C. Diyabet grubuna ait kesitte immünpozitif hücreler görülmektedir (→), X200. D. Diyabet grubunda immünpozitif spermatogonyumlar (Sg) ve Sertoli hücresi (Sc) izlenmektedir, X400. E. Kaspaz 3 immünreaktivite grafiği şekildeki gibidir. Kaspaz 3 ve hematoksilin zıt boyaması. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

KU70 bulguları: Testis kesitlerinde KU70 hücrel lokalizasyonunun hem nükleer hem de sitoplazmik olması dikkat çekmiştir.

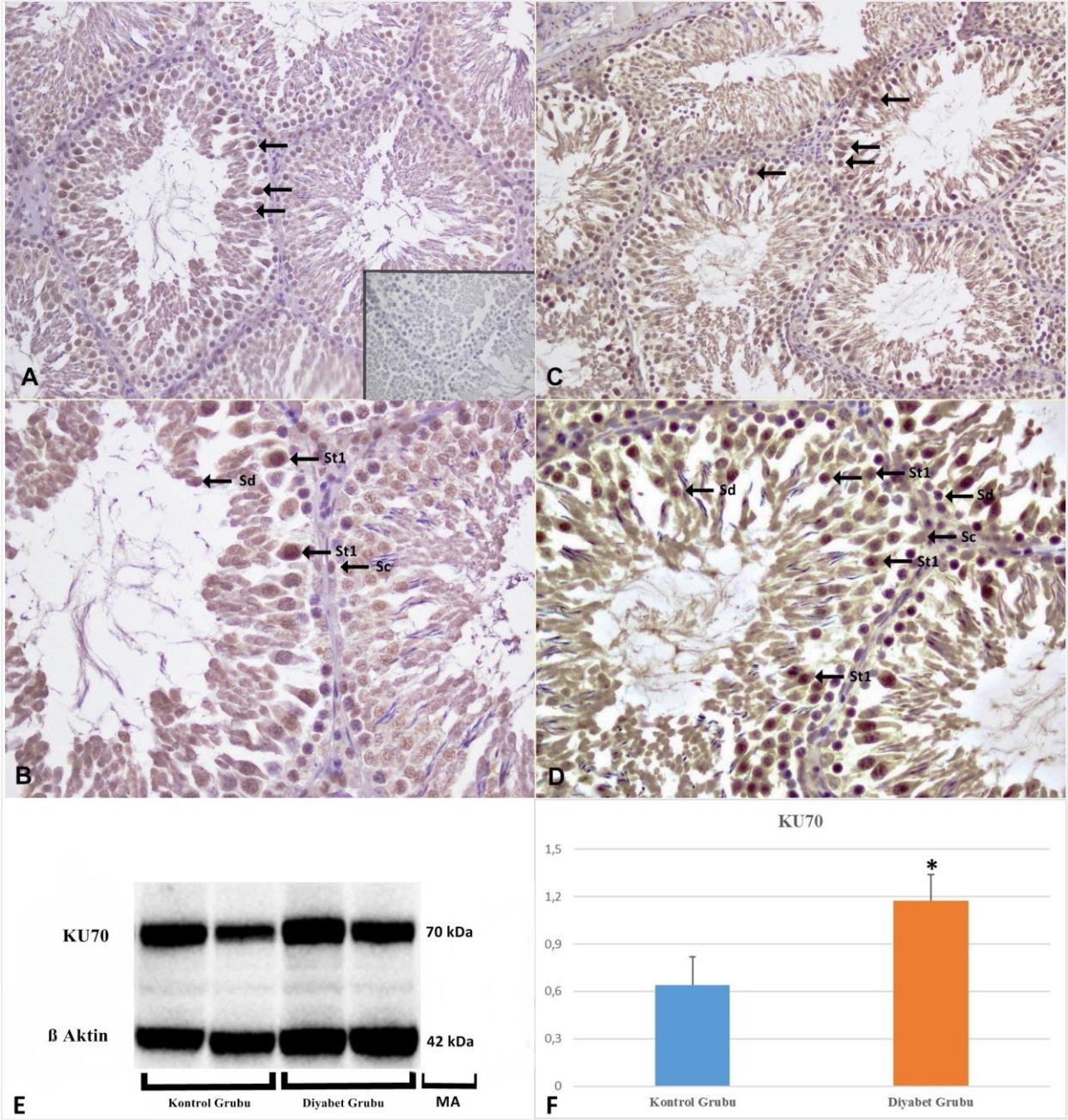
Kontrol grubuna ait testis doku kesitlerinde KU70 immünreaktiviteyi incelendiğinde, spermatogonyum ve Sertoli hücrelerinde oldukça az hücrede boyanma tespit edilmiş, spermatosit-I'lerde ve diğeri spermatogenik seri hücrelerinde zayıf ve orta şiddette boyanma izlenmiştir (Şekil 17A, 17B).

Diyabet grubu testis kesitlerine bakıldığında ise seminifer tübüllerdeki hücrelerde, genel olarak orta ve yoğun şiddette boyanma gözlenmiştir. Sertoli hücrelerinde zayıf şiddette boyanma izlenirken, spermatogonyumlarda, spermatosit-I'lerde ve diğeri spermatogenik seri hücrelerinde orta ve yoğun şiddette boyanma belirlenmiştir (Şekil 17C, 17D).

KU70 immünreaktivitesi diyabet grubu değeri (248.75 ± 5.82), kontrol grubu değeri (106.88 ± 5.30) göre istatistiksel anlamlılıkla yüksek bulunmuştur (P<0.001).

Western blot tekniğı uygulanan kontrol ve diyabet grubu testis dokularında, KU70 protein ifadesi değeri karşılaştırıldığında; diyabet grubu değeri (1.17 ± 0.16), kontrol grubu değeri (0.64 ± 0.17) göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (P=0.004; Şekil 17E, 17F).

Elde ettiğimiz verilere göre immünohistokimya ve western blot analiz sonuçlarımız birbiriyle uyumludur ve KU70 ifadesinin diyabetik testis dokularında arttığı açıkça görülmektedir.



Şekil 17. KU70 immünreaktivitesinin ve western blot değerlerinin izlendiği bu şekilde; **A.** Kontrol grubuna ait kesitte immünpozitif hücreler oklarla işaretlenmiştir (→), X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoxilen zıt boyaması, X400. **B.** Kontrol grubunda immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd) ve Sertoli hücresi (Sc) izlenmektedir, X400. **C.** Diyabet grubuna ait preparatta immünpozitif hücreler görülmektedir (→), X200. **D.** Diyabet grubuna ait mikrografta immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd) ve Sertoli hücresi (Sc) şeklindeki gibi belirtilmiştir, X400. **E** ve **F.** KU70 western blot bantlarını ve grafiğini göstermektedir. Moleküler ağırlık (MA). KU70 ve hematoxilen zıt boyaması. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

SIRT1 bulguları: Testis doku kesitlerinde SIRT1 immünreaktiviteyi incelendiğinde, hücreyel lokalizasyonunun nükleer ve sitoplazmik olduğu gözlenmiştir.

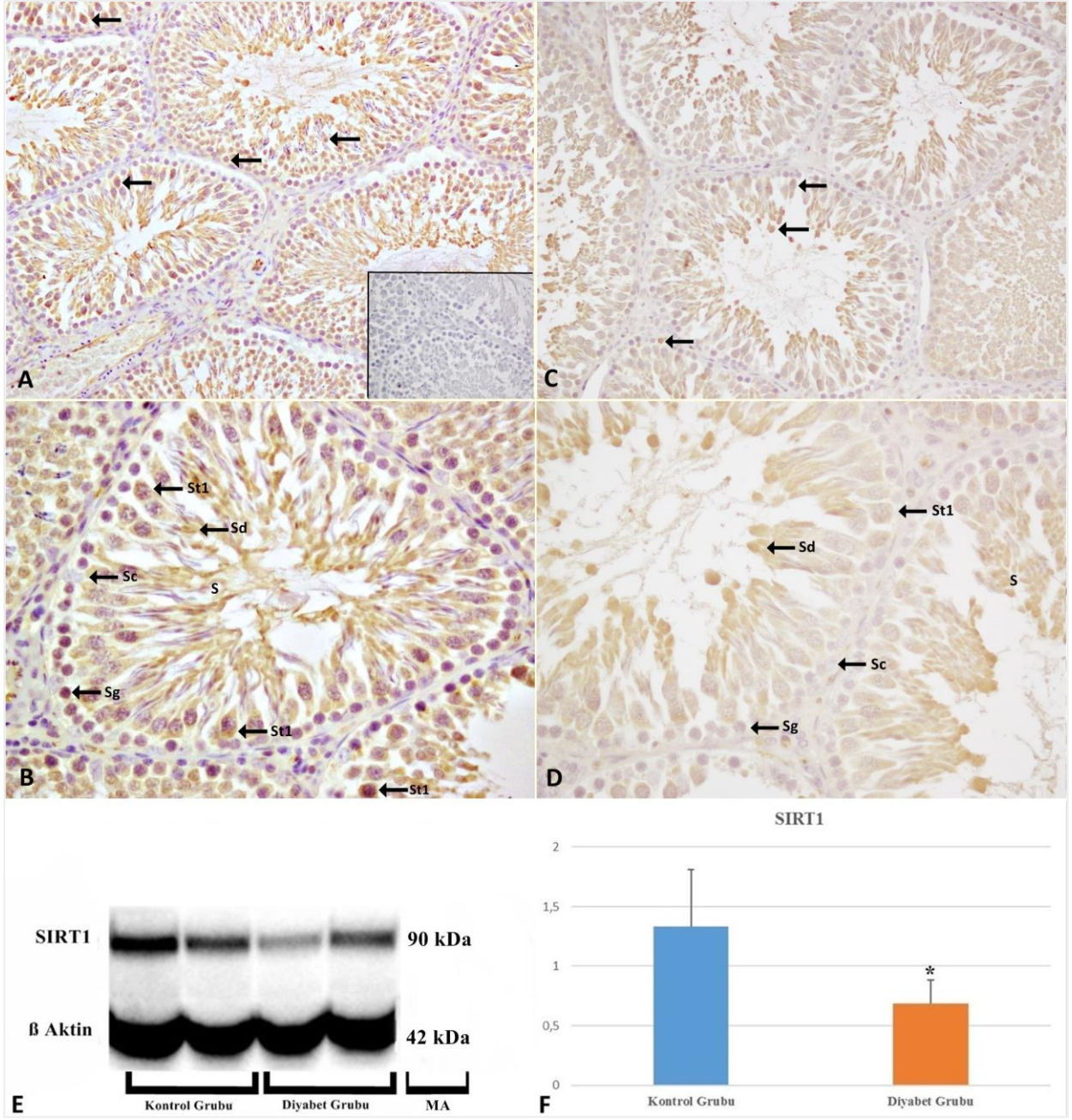
Kontrol grubuna ait testis doku kesitlerinde; çok sayıda hücrede immünreaktivite izlenmiştir. Sertoli hücrelerinde boyanma görülmezken, spermatogonyum, spermatosit-I'ler ve diğer spermatogenik seri hücrelerinde orta ve yoğun şiddette boyanma saptanmıştır (Şekil 18A, 18B).

Diyabet grubu testis kesitlerine bakıldığında; seminifer tübüllerde genel olarak zayıf şiddette immünreaktivite görülmüştür. Spermatogonyumlarda zayıf derecede boyanma izlenirken, Sertoli hücrelerinde boyanma tespit edilmemiştir (Şekil 18C, 18D).

SIRT1 immünreaktivitesi diyabet grubu değerlerinin (98.75 ± 7.44), kontrol grubu değerlerine (193.13 ± 4.58) göre anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür ($P < 0.001$).

Testis dokularındaki SIRT1 ifadesi western blot analiziyle değerlendirildiğinde; diyabet grubu değerlerinin (0.68 ± 0.19), kontrol grubuna (1.33 ± 0.48) göre istatistiksel anlamlılıkla azaldığı belirlenmiştir ($P = 0.004$; 18E, 18F).

İmmünohistokimya ve western blot analiz sonuçlarının birbirine paralel olduğu ve her iki analizde de SIRT1 ifadesinin, diyabetik testis dokularında anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 18. SIRT1 bulgularının izlendiği görselde; A. Kontrol grubunda immünpozitif hücreler oklarla belirtildiği gibidir (→), X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoxilen zıt boyaması, X400. B. Kontrol grubuna ait kesitte immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), spermler (S) izlenmektedir, X400. C. Diyabet grubunda immünpozitif hücreler görülmektedir (→), X200. D. Diyabet grubuna ait mikrografta immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), spermler (S) izlenmektedir, X400. Her iki grupta da, Sertoli hücrelerinde (Sc) boyanma izlenmemiştir. E ve F. SIRT1 western blot bant ve grafiğini göstermektedir. Moleküler ağırlık (MA). SIRT1 ve hematoxilen zıt boyaması. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

SIRT6 bulguları: SIRT6'nın testis doku kesitlerindeki hücresel lokalizasyonunun hem nükleer hem de sitoplazmik olduğu görülmüştür.

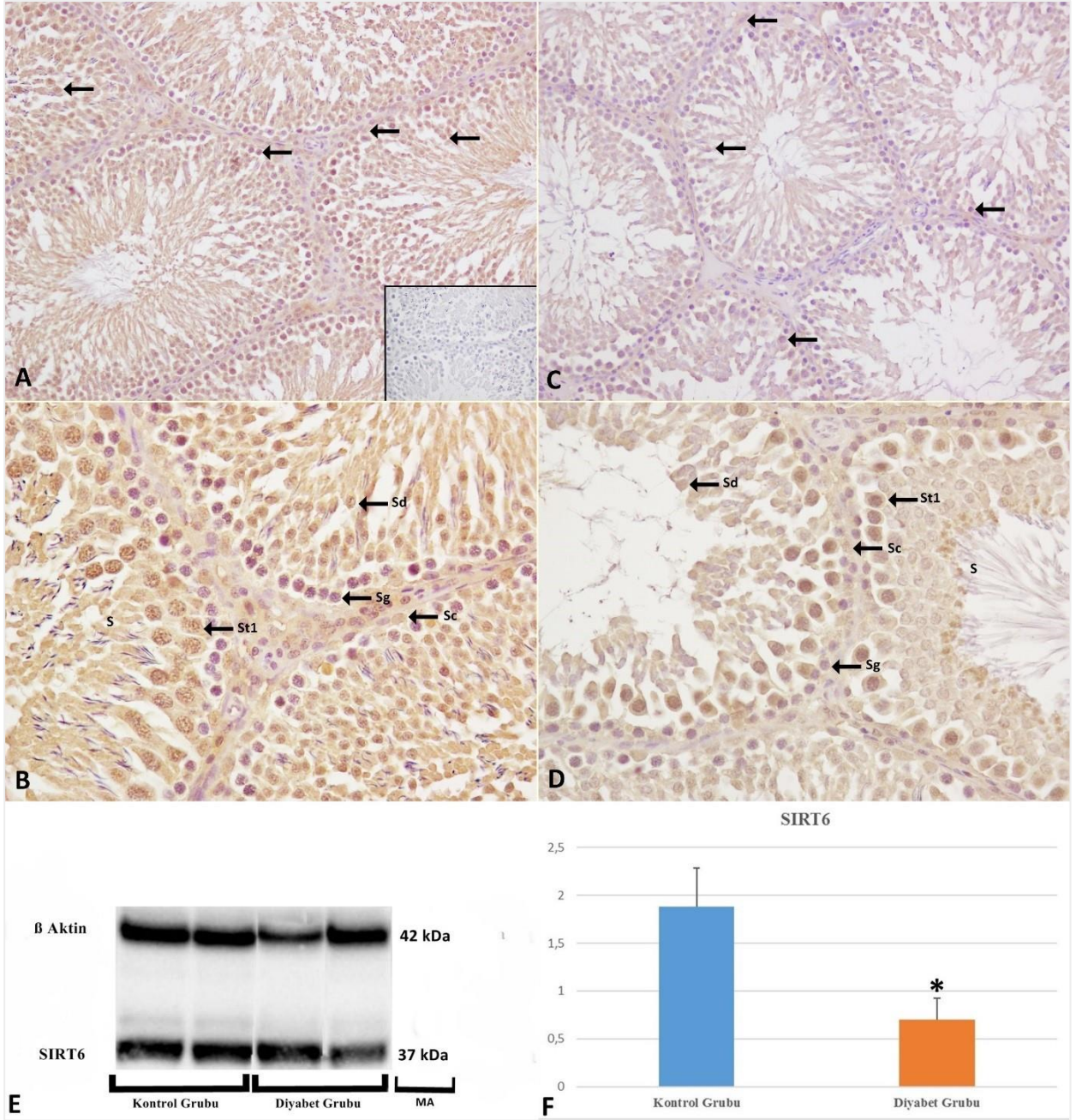
Kontrol grubu testis doku kesitlerinde, yoğun şiddette SIRT6 immünpozitif hücreler izlenmiştir. Sertoli hücrelerinde zayıf ve orta derecede boyanma izlenirken; spermatogonyumlarda, spermatosit-I'lerde ve diğer spermatogenik hücrelerde orta ve yoğun derecede boyanma tespit edilmiştir (Şekil 19A, 19B).

Diyabetik grubun testis preparatlarındaki seminifer tübüllerde, immünreaktivitenin boyanma şiddetinin daha zayıf olduğu görülmüştür. Spermatogonyum ve Sertoli hücrelerinde zayıf immünpozitivite izlenmiş, diğer seri hücrelerinde zayıf ve orta derecede boyanma olduğu belirlenmiştir (Şekil 19C, 19D).

SIRT6 immünreaktivitesi diyabet grubu değerlerinin (64.63 ± 7.44), kontrol grubu değerlerine (145.88 ± 8.56) göre anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$).

Western blot tekniği uygulanan testis dokularında, SIRT6 protein ifadeleri karşılaştırıldığında; diyabet grubu değerlerinin (0.70 ± 0.22), kontrol grubu değerlerine (1.88 ± 0.40) göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.001$; Şekil 19E, 19F).

SIRT6 ifadesinin hem immünohistokimyasal hem de western blot analiz sonuçlarında, birbirine uyumlu şekilde diyabetik testis dokularında istatistiksel anlamlılıkla azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 19. Kontrol ve diyabet grubu SIRT6 bulgularının görüldüğü şekilde; A. Kontrol grubuna ait mikrografta immünpozitif hücreler izlenmektedir (→), X200. İçsel şekil; negatif kontrol, hematoxilen zıt boyaması, X400. B. Kontrol grubunda immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), spermler (S), Sertoli hücresi (Sc) şeklindeki gibi görülmektedir, X400. C. Diyabet grubuna ait preparatta immünpozitif hücreler oklarla gösterilmiştir (→), X200. D. Diyabet grubuna ait kesitte immünpozitif spermatogonyumlar (Sg), spermatosit-I'ler (St1), spermatidler (Sd), spermler (S), Sertoli hücresi (Sc) izlenmektedir, X400. E ve F. SIRT6 western blot bant ve grafiğini göstermektedir. Moleküler ağırlık (MA). SIRT6 ve hematoxilen zıt boyaması. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

TARTIŞMA

Diyabetin başlıca komplikasyonları arasında; nöropati, retinopati, nefropati, mikro ve makrovasküler patolojiler bulunmaktadır. İnfertilite açısından bakıldığında; gerek Tip 1 gerekse Tip 2 diyabetin erkeklerde anormal sperm üretimine ve seksüel disfonksiyona neden olduğu, sperm sayı, hareketlilik ve morfolojisinde olumsuz değişimlere sebep olarak, subfertilite/infertilite olgularında artışa yol açtığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (1, 4, 10, 76, 162).

Çalışmamızda STZ uygulanan deneklerin, kan glukoz düzeyleri 250 mg/dl'den fazla olanlar, diğer deneysel diyabet oluşturulan çalışmalarda olduğu gibi diyabetik kabul edilmişlerdir (10, 93, 125, 163).

Diyabetik erkekler ve denekler üzerinde yapılan çalışmalar diyabetin; hipotalamus-hipofiz-testis aksını etkileyerek, testosteron sentez ve sekresyonunu düşürdüğünü göstermektedir (7, 163-166). Bunun dışında, prostat glandüler hacimde artış, spermatogenezisde ve sperm kalitesinde azalma, erektil disfonksiyon, retrograd ejakülasyon ve libido azalması gibi durumlar da diyabet çalışmaları ile ortaya konulmuştur (10, 12, 73, 167).

Diyabetik sıçanların serum testosteron düzeylerinde düşüşle birlikte, seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerin sayısının azalması ve dejenerasyonları sonucunda, seminifer tübül çaplarında da ciddi değişimlerin meydana geldiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (11, 83, 168-173). Bu çalışmalar gibi bizim çalışmamızda da, diyabet grubu serum testosteron düzeylerinde ve seminifer tübül çaplarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (13, 76, 83, 155).

Çalışmamızda; Cai ve ark. (174), Öztürk ve ark. (175), Altay ve ark. (176), Amaral ve ark. (10), Sadık ve ark. (155), Köroglu ve ark. (84), Bozdemir ve ark. (74), Bayram ve ark. (76), Ersoy ve Kızılay'ın (13) çalışmalarına paralel şekilde, diyabetik testis doku kesitlerinde seminifer

tübüllerde; spermatogenik seri hücrelerinin diziliminde bozulma, hücre kaybı, anormal spermatogenez ve genellikle lümene yakın konumlanmış dev hücreler gözlenmiştir. Sertoli hücre dejenerasyonu sebebiyle, germinal epitelde yer yer geniş vakuollerin ortaya çıktığı görülmüştür.

Diyabette bazı seminifer tübüllerde atrofi, seminifer epitelin hücre tabaka sayısında azalma ve bazal membranlarda kalınlaşma olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (12, 172, 175, 177, 178). Cameron ve ark. (177)'in çalışmasında; tübül beslenmesinin, diyabete bağlı olarak kapiler ve seminifer tübül bazal membranlarında meydana gelen kalınlaşmayla bozulduğu bildirilmiştir. Öztürk ve ark. (175) ise diyabete bağlı olarak Leydig hücre disfonksiyonu ile birlikte testosteronun azalması ve tübül bazal membranlarındaki kalınlaşma sebebiyle, testosteronun tübül içerisine diffüzyonunun zorlaşmasının, spermatogenezin sürekliliğini engelleyebileceğini ileri sürmüştür.

Diyabetik testis dokusunun elektron mikroskopik olarak incelendiği çalışmalarda bizim bulgularımıza benzer sonuçlar bulunmaktadır. Trindade ve ark. (12)'in 2013 yılında yaptıkları çalışmada, alloxanla diyabet oluşturulmuş sıçanların testis dokularında histopatolojik ve ultrastrüktürel incelemeler sonucunda seminifer tübüllerde düzensiz bazal membran yapısı, Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların yapısında bozulmalar ile özellikle Sertoli hücre sitoplazmalarında vakuol oluşumu kaydedilmiştir. Spermatogonyum ve spermatisitlerde, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik nükleus görünümü bulgular arasındadır. Neredeyse tüm spermatogenik seri hücrelerinde dejenerasyonlar, lipid ve elektron yoğun madde birikimine dikkat çekilmiş, bu hücrelerde çok sayıda dejenere olmuş mitokondri bulunduğu kaydedilmiştir. Köroğlu ve ark. (84)'in çalışmalarında, spermatogenik hücrelerde dejenerasyona ek olarak, akrozomal yapılarda ve spermilerin kuyruklarında deformasyon gördüklerini belirtmişlerdir. Bu alanda yapılan diğer çalışmalara bakıldığında; seminifer tübül bazal membranlarında kalınlaşma ve düzensizlik, Sertoli hücrelerinde vakuolizasyonların yanı sıra, düz endoplazmik retikulumların yapılarında bozulmalar görülmüştür. Spermatogenik seri hücrelerin de nükleuslarında yoğunlaşma, mitokondri ve düz endoplazmik retikulum yapılarında bozulmalar kaydedilmiştir. Mitokondri sayısında azalmayla birlikte, organelin şeklinde değişim, krista yapısında düzensizlikler görülmüştür (83, 85-88). Trindade ve ark. (12) ile Kianifard ve ark. (83), Sertoli hücrelerinde görülen vakuolizasyonların ve düz endoplazmik retikulum azalmasının, bu hücrelerin fonksiyonlarını ve spermatogenez sürecini olumsuz etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Diyabete bağlı olarak görülen mitokondri dejenerasyonu ve sayılarındaki azalmanın; spermatogenik hücrelerde ATP üretiminde yetersizliğe ve ROS üretiminde artışa sebep olarak, infertiliteye yol açabileceği belirtilmiştir (12, 83). İnfertilitenin altında yatan sebepler incelendiğinde, mitokondrilerdeki dejenerasyonun büyük rol oynadığı görülmektedir. Mitokondri dejenerasyonuna bağlı olarak,

spermatogenik seri hücrelerinin sitoplazmalarında elektron yoğun cisimcik ve lipofuskin birikimi artmakta, bu da ROS'un yükselmesine sebep olmaktadır. Artan ROS ise lipid peroksidasyonuna neden olarak, hücrelerde dejeneratif etki göstermektedir (12, 83, 85).

Diyabet sonucu, ROS'un aşırı üretimi ve antioksidan savunma etkinliğinin azalması nedeniyle, oksidatif stresin arttığı ve buna bağlı olarak lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonu, mitokondriyal DNA mutasyonu ve hasarı çalışmalarda rapor edilmiştir. Diyabetle ilişkili oksidatif stres, azalmış testiküler mitokondriyal disfonksiyonu da içerebilen, cinsel işlev üzerindeki birçok değişikliğin tetikleyicisi olabilir. Hücre içerisinde biriken ROS'lar, apoptozisi hızlandırarak, sperm hareketliliği ve morfolojisi üzerinde negatif etki oluşturur. Hiperglisemi, hem enerji üretimine hem de serbest radikal metabolizmasına etki ederek, sperm konsantrasyonu ve hareketliliğinde değişime sebebiyet verir (8, 10, 179).

Oksidatif stresin testis dokusuna etkilerinin incelendiği çalışmalarda, diyabete bağlı testiküler disfonksiyon ile apoptozis arasında ilişki olduğu belirtilmiş, hiperglisemi sonucu ROS artışı ve devamında gelişen oksidatif stresin, apoptozisi indüklediği ileri sürülmüştür (74, 76, 174, 179). ROS ve apoptozis arasındaki mekanizmayı anlamaya yönelik çalışmalar süregelmektedir. Bu anlamda apoptotik sinyal yolları ve buralarda rol oynayan faktörler, enzimler ve proteinler büyük önem taşımaktadır. Protein Kinaz C (PKC) aktivasyonu-oksidatif stres ilişkisini inceleyen bir çalışmada, PKC ilişkili nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz mekanizması inhibe edildiğinde, diyabete bağlı oksidatif streste önemli ölçüde azalma olduğu görülmüştür (180). Başka bir çalışmada ise NADPH inhibitörü olan 'Aposin' ile ROS artışının bloke edildiği ve germ hücre apoptozisinde büyük ölçüde azalma olduğu belirtilmiştir (181).

Apoptozisin düzenlenmesinde, Bcl-2 ailesi ve kaspazlar önemli rol oynar. Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerinden Bax, apoptotik süreçte kritik rol oynayan proteinlerden biridir (7, 16, 182). İntrensek yolda, Bax, Bak'ı aktifleştirir. Sonrasında gelen bir dizi reaksiyon sonucunda kaspaz-3, kaspaz aktive edici DNaz'ı serbestleştirir. Kaspaz aktive edici DNaz, nükleusta kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (14, 174). Çalışmamızda diyabetik gruplardaki Bax immünreaktivitesi sonuçları, diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ghosh ve ark. (171) ile Ding ve ark. (87) yaptıkları çalışmalarda, Bax ifadesinin diyabetik testiküler dokularda anlamlı şekilde arttığını ve Bax'ın apoptotik süreçte rol aldığını ifade etmişlerdir. Liu ve ark. (161) tarafından yapılan bir çalışmada da Bax ifadesinin diyabetik testis dokularında arttığı ve diyabetik testislerde görülen hasar mekanizmasında, Bax ifadesinin artmasının önemli olduğu ileri sürülmüştür. Diyabetik testiküler dokularda Bax ifadesinin anlamlı şekilde arttığı ve apoptotik yolda rol aldığı başka çalışmalarla da

onaylanmıştır (7, 179, 183, 184). Tüm bu çalışmalar; apoptotik süreçte Bax proteininin oldukça önemli rol oynadığını ve diyabete bağlı apoptoziste öne çıktığını göstermektedir.

Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri, Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bcl-2; her hücrede mitokondrinin iç membranında bulunan bir proteindir ve güçlü bir apoptozis inhibitörüdür. Bcl-2; sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya geçişini bloke ederek, serbest radikal üretiminin azalmasına neden olur, dolayısıyla antioksidan bir özelliğe de sahiptir (14, 82, 185). Bax ve Bcl-2 proteininin gen ifadesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile değerlendirildiği bir çalışmada, diyabetik sıçanların testis dokularında Bax geninin ifadesinde anlamlı artış, Bcl-2 geninin ifadesinde ise önemli bir azalma gözlenirken, Bax/Bcl-2 oranının anlamlı bir şekilde arttığı ifade edilmiştir (155). İrtegün ve ark. (185) tarafından yapılan ve diyabetik testis dokusunda Bcl-2 ifadesinin hem immünohistokimya hem de western blot yöntemiyle incelendiği çalışmada ise diyabetik testis dokularında Bcl-2 ifadesinin, kontrol deneklere göre anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise diyabetik sıçanların testis dokularında, western blot yöntemiyle Bcl-2 ailesine ait proteinlerin (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax ve Bad) ifadeleri araştırılmış, antiapoptotik proteinlerinin ifadelerinde, diyabetik grupta kontrole göre anlamlı bir azalma görülürken, proapoptotik proteinlerin ifadeleri diyabetik grupta artmıştır (184). Bulgularımızın benzer olduğu diğer birçok çalışmada da, Bcl-2 ifadesinin antiapoptotik yolakta rol oynadığı ve diyabetik dokularda anlamlı şekilde azaldığı gösterilmektedir (32, 155, 161, 179, 183). Bax/Bcl-2 oranı, bilindiği üzere hücrelerin apoptoza gidip gitmeyeceğini saptamada kullanılan önemli bir bulgudur. Bu oran; 1'den büyükse, hücrenin apoptoza gideceğini göstermektedir. Hücrede hangi proteinler fazla ise hücre o tarafa meyillidir. Çalışmamızda Bax/Bcl-2 oranının, diğer çalışmalara paralel şekilde anlamlı olarak arttığı görülmüştür (32, 155, 161, 171, 186).

Kaspaz 3, apoptotik yolakta kritik rol üstlenen ve dokuların apoptozise gitme eğilimini gösteren bir diğer belirteçtir. Etektör kaspazlar grubundan olan kaspaz 3; kaspaz aktive edici DNaz'ı serbestleştirerek, nükleusta kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur. DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive eder (14, 79, 187). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, immünohistokimyasal ve western blot analizleri ile kaspaz 3 immünreaktivitesinin değerlendirildiği başka çalışmalar ile benzerdir (32, 76, 179, 186, 188). Bayram ve ark. (76)'ın yaptıkları çalışmada, kaspaz 3 immünreaktivitesinin diyabet grubunda anlamlı olarak arttığı ve özellikle Sertoli hücrelerinde de ekspresyon görüldüğü ifade edilmiştir. Benzer şekilde Khamis ve ark. (186) yaptıkları çalışmada, diyabetik testiküler dokuda kaspaz 3 mRNA ifadesinin anlamlı şekilde yükseldiğini göstermişlerdir. Koh (179) ise kaspaz 3 ifadesini diyabetik testis dokularında, western blot yöntemiyle analiz etmiş ve diyabetik gruplarda anlamlı olarak arttığını, artan kaspaz 3 ifadesinin,

kaspaz ile aktive edilmiş DNaz aktivasyonunu indüklediğini ve bunun da DNA fragmantasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir.

TUNEL yöntemi, hücrede apoptozisin son aşamasında meydana gelen DNA kırıklarına bağlı olarak, kırılan DNA parçacıklarının 3'-OH uçlarını belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır (14, 17, 82, 179, 184). Çalışmamızda TUNEL yöntemi kullanılarak 'apoptotik hücre' ve 'apoptotik tübül' indeksleri değerlendirildiğinde, diğer çalışmalarda olduğu gibi diyabetik testis dokularında anlamlı bir artış görülmüştür. Bu bulgularımız da daha önceki çalışmalarla örtüşmektedir (13, 76, 81, 189, 190).

DNA tamir mekanizmalarında rol oynayan birçok proteinden biri olan KU70; DNA çift zincir kırıklarında, NHEJ yolağında görevli bir proteindir. KU proteinlerinin DNA tamiri dışında; hücre sinyali, proliferasyon, replikasyon, transkripsiyon aktivasyonu ve apoptoziste görevli olduğu bilinmektedir. KU70; Bax aktivitesini baskılayarak, apoptozisin düzenlenmesinde görev almaktadır. Hücre içinde hem nükleusta hem de sitoplazmada lokalizedir (21-23). Testisler dışında beyin, plasenta ve meme bezleri gibi dokularda da ifade edildiği belirtilmektedir (157).

Çalışmamızda, kontrol grubuna ait testis dokularında KU70'in hücrel lokalizasyonun, hem nükleer hem de sitoplazmik olduğu görülmüştür. İmmünohistokimya ve western blot yöntemleriyle, diyabetik testis dokularında arttığını tespit ettiğimiz KU70 ifadesinin incelendiği bir başka çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. KU70 üzerine yapılan az sayıdaki diyabet çalışmalarına bakıldığında, Tunçdemir ve arkadaşlarının (93) yaptıkları diyabetik nefropati çalışmasında KU70 ifadesinin; diyabetik grupta, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığını belirtmişlerdir. KU70'in incelendiği başka bir hiperglisemik apoptozis çalışmasında, hiperglisemik ortamda kültüre edilen fare dorsal kök gangliyonu nöronlarına, bupivakain isimli anestezi madde verilmiştir. Araştırmada hipergliseminin; DNA-PKcs'yi inaktive ederek, KU70 inhibisyonuna sebep olduğu, sonuç olarak DNA hasarına ve apoptozise yol açtığı ileri sürülmüştür (92). Hiperglisemik ortamda kardiyomyosit hücre kültüründe KU70 ifadesinin incelendiği bir başka çalışmada; hipergliseminin KU70 asetilasyonunu yükselttiği ve buna bağlı olarak Bax aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Tedavi uygulanan gruplarda ise KU70 asetilasyonunun azalarak, KU70/Bax bağlantısının arttığını ve apoptozisin inhibe edildiğini ortaya koymuşlardır (26).

Diyabetik gruplarda ifadesi artan KU70'in apoptotik yolda önemli bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, KU70'in sitoplazmada Bax'a bağlanarak, Bax'ı mitokondriden izole edip, por oluşumunu engellediği ve apoptozisi bloke ettiği ifade edilmektedir. Buna göre KU70'in interensek yolda apoptozisin inhibisyonunda önemli bir rol üstlendiği ileri sürülmektedir (21, 91, 188, 191).

Hada ve ark. (25) tarafından yapılan bir çalışma, KU70'in fonksiyonları konusunda ilginç veriler ortaya koymuştur. Buna göre KU70; bir yandan DNA tamirinde görev alıp, diğer yandan sitoplazmada Bax'ı serbest bırakarak, apoptozisi indüklemektedir. Çalışmada, radyasyon verilen nöroblastoma hücrelerinde, radyasyon uygulamasından sonra asetillenmiş KU70, sitoplazmadan nükleusa taşınmış ve DNA tamir aktivitesini düşürerek, apoptozisi daha fazla indüklemiştir. Bu çalışmada, sitoplazmik KU70'in nükleusta etkin olmasının, bu hücrelere özgü olabileceği ifade edilmiştir. KU70'in fonksiyonlarının tam olarak anlaşılabilmesi için, daha fazla kantitatif araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada diyabetik testis dokularındaki etkinliğini araştırdığımız diğer proteinler SIRT1 ve SIRT6'dır. SIRT1; p53, p73, E2F1 ve KU70 gibi proteinleri hedefleyerek, apoptoziste kritik bir rol oynamaktadır. Buna göre SIRT1; p53'ü, lizin amino asit kalıntılarından deasetilize ederek, transkripsiyonel etkinliğini azaltır, oksidatif strese ve DNA hasarlarına karşı hücrede apoptozisi baskılar. Ayrıca hücre döngüsü düzenleyicisi olan E2F1'i inhibe ederek, apoptozisi inhibe eder. p73'ün transkripsiyonel etkinliğini baskılayarak, p73 aracılı apoptozisi engeller. Diğer taraftan FOXO4 ile interaktif hareket ederek, kaspaz 3 ve kaspaz 7'yi baskılar ve apoptotik etkinliklerini bloke eder (22, 29, 30, 91).

Çalışmalarda insülin metabolizması üzerinde de etkili olduğu görülen SIRT1'in pankreas β hücrelerinde aşırı ifade edildiğinde, insülin sekresyonunu ve ATP üretimini arttırdığı gösterilmiştir. SIRT1'in bazı hedef proteinleri deasetilize ederek, glikoneogenezisi azaltıp, glikolizisi inhibe ettiği belirlenmiştir. SIRT1 geninin baskılanmasının, oligozoospermi, teratozoospermi ve ovulasyon bozukluklarına sebep olduğu da görülmüştür (29, 34, 35, 94, 96, 158). McBurney ve ark. (127)'in farelerde yaptıkları bir çalışmada, spermatogenez sürecinde, spermatozoidlerin yüksek miktarda SIRT1 ifade ettiği ve SIRT1 geni susturulduğunda, sperm anomalileri ve infertilite görüldüğü belirtilmiştir.

Embriyonik gelişimde SIRT1'in birçok dokuda ifade edildiği belirtilmiştir. Ogawa ve ark. (128) tarafından yapılan çalışmada; farelerde fetal dönemde, nöroepitelyum, dorsal kök gangliyonu, trigeminal gangliyon, göz, kalp, böbrek, testis, karaciğer ve akciğer dokularında SIRT1 ifadesi immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiş ve fetal gelişimde SIRT1 ifadesinin önemli olduğu öne sürülmüştür. Özellikle embriyonik gelişimde testislerde, güçlü bir SIRT1 immünreaktivitesi olduğu ifade edilmiştir.

Mu ve ark. (130) tarafından yapılan bir çalışmada; yüksek yağlı diyetle obezite oluşturulmuş fare testis dokularında SIRT1 ve C1q/TNF ilişkili protein 3 (CTRP3) protein ifadesi incelenmiş ve diyet gruplarında her iki protein ifadesinin de azaldığı belirtilmiştir. CTRP3'ün

antiapoptotik bir protein olduğu ve SIRT1 aktivitesini indüklediği öne sürülmüş, testislerde antiapoptotik bir rol alabilecekleri ifade edilmiştir.

Diyabetik deneklerimizin testis dokularında, immünohistokimya ve western blot yöntemleriyle SIRT1'in azaldığını tespit ettiğimiz bulgularımız, SIRT1 ifadesinin incelendiği çalışmalarla benzerdir. Tip 1 diyabet oluşturulan sıçanların testis dokularında SIRT1 immünreaktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada; diyabetik grupta, kontrol grubuna göre azalmış SIRT1 ifadesine dikkat çekilmiştir. SIRT1 testislerde insülin duyarlılığını arttırmakta, glukotoksisiteyi ise azaltmaktadır. PARP/SIRT1 etkileşiminin, testiküler apoptotik yolda etkili olabileceği düşünülmektedir (129, 192). 5 gün boyunca 50 mg/kg STZ verilerek, diyabetik grup oluşturulan başka bir çalışmada ise SIRT1 ifadesi, quantitative real time PCR (qPCR), western blot ve immünohistokimyasal metodlarla incelenmiş, yine bulgularımıza paralel şekilde testislerde diyabetik grupta, SIRT1 ifadesinin azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada diyabetik testislerde, miR-34a ifadesinin arttığı, SIRT1 ifadesinin azaldığı, dolayısıyla miR-34a'nın SIRT1'i baskılayarak, apoptozisi indüklediği ileri sürülmüştür (32).

Jiang ve ark. (111), fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21) geni susturulmuş diyabetik fare testis dokusunda SIRT1 protein ifadesini, western blot ve immünfloresan metodlarıyla incelemiş, SIRT1 ifadesinin diyabetik testis dokularında azaldığı belirlenmiştir. Çalışmada SIRT1 protein ifadesinin, FGF21 tarafından düzenlendiği ileri sürülmüştür.

Zhao ve ark. (193) tarafından yapılan ve çinko eksikliğinin testise etkilerinin incelendiği bir çalışmada, Tip 1 diyabet oluşturulan fare testis dokularında SIRT1 protein ifadesi, western blot yöntemiyle incelenmiş ve diyabetik gruplarda anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir. Sonuç olarak çinkonun, diyabetik testis dokularında SIRT1 ativitesini düzenlediğini öne sürmüşlerdir.

DeneySEL diyabet oluşturulan ratlarda, hipotalamus dokusunda PCR yöntemiyle SIRT1 mRNA'sının incelendiği bir çalışmada, diyabet grubu deneklerde, kontrole göre istatistiksel olarak bir azalma olduğu belirtilmiştir (194).

Diyabetik sıçanlarda oluşturulan orta serebral arter oklüzyonunda, SIRT1 ifadesi diyabetik gruplarda azalmış, buna karşın tedavi gruplarında artmıştır. SIRT1'in burada nöroprotektif bir etki gösterdiği ve NF-κB'in transkripsiyonel etkisini azaltarak, protektif fonksiyon gördüğü belirtilmiştir (117).

SIRT1/PGC1-α/MtTFA yolağının etkileşiminin, diyabetik nöropatiyi baskılayıcı bir rol oynadığı da ifade edilmiştir (118). Ratlarda yapılan başka bir diyabetik nöropati çalışmasında SIRT1 ifadesinin, diyabetik gruplarda kontrole göre istatistiksel anlamlılıkla azaldığı gösterilmiştir (119).

SIRT1; diyabetik retinopatide oksidatif stresi azaltmakta ve anti-inflamatuar etki göstermektedir. SIRT1 ifadesinin azalmasına bağlı olarak; High mobility group box 1 (Hmgb1) asetilasyonu artmakta, bu durum da diyabetik retinopatinin gelişiminde etkili olmaktadır (120). SIRT1'in MMP-2 ve MMP-9'un aktivasyonlarını düzenlediği ve bu yolla, diyabete bağlı retinopatinin patogenezinde rol oynadığı belirtilmektedir (120). Diyabetik farelerde yapılan bir retinopati çalışmasında, SIRT1 ifadesi western blot analiziyle ve immünohistokimyasal olarak incelenmiş, SIRT1'in diyabetik grupta kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır (121). Sıçan retinal endotelial hücre kültüründe yapılan başka bir çalışmada ise hiperglisemik grupta, SIRT1 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Hipergliseminin, PARP'ı aktive ederek, NAD+'ın tükenmesine ve SIRT1 aktivitesinin inhibisyonuna yol açabileceği ileri sürülmüştür (123).

Çalışmalar SIRT1'in diyabetik böbreklerde; apoptozisi ve oksidatif stresi baskıladığı, apoptotik proteinlerin ve çeşitli transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonuna neden olarak, diyabetik nefropatinin patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Diyabetik nefropati çalışmalarına bakıldığında; diyabetik böbrek dokularında SIRT1 ifadesindeki azalmanın, p53, NF- κ B, FOXO gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna sebep olarak, diyabetik nefropatinin patogenezinde ve gelişiminde rolü olabileceği öne sürülmektedir (31, 124-126).

Yapılan çalışmalarda SIRT1'in; KU70'i deasetilleyerek, KU70/Bax bağlantısını sağladığı ve apoptozisin inhibisyonunda önemli bir rol oynadığı ifade edilmektedir. Buna göre KU70'in asetilasyonu; KU70/Bax bağlantısını ortadan kaldırarak, Bax'ın izole olmasına ve apoptozisin indüklenmesine neden olmaktadır. Apoptotik sürecin başında; sitoplazmada SIRT1 tarafından deasetile edilen KU70 proteinleri, Bax proteinleri ile bağ kurup, apoptozisi bloke etmektedir (133, 158, 188). Bu anlamda diyabetik grupta azalan SIRT1 ifadesinin, KU70/Bax bağlantısının sağlanamaması ve sonuç olarak apoptozisin inhibe edilememesine sebep olduğu düşünülmektedir (161). Bu araştırmacıların vardığı teoriyi, bizim bulgularımız da desteklemektedir.

Çalışmamızda, diyabetik testis dokularındaki ifadesinin azaldığını belirlediğimiz SIRT6; DNA tamir mekanizmasında, baz eksizyon tamiri yolağında rol oynayan bir proteindir. Farelerde, SIRT6 ifadesi baskılandığında omurga eğriliği, metabolik bozukluklar, olgunlaşmadan yaşlanma gibi farklı durumlar bildirilmiştir (33, 36). Ayrıca karaciğerde yağ asitlerinin oksidasyonunu ve iskelet kasında glukoz alımını arttırdığı bildirilmiştir (30). SIRT6; NHEJ tamir yolağında da görevlidir (30). KU70/KU80 heterodimerini stabilize ederek, DNA'nın hasarlı bölgesindeki onarımda kilit rol üstlenirken, proapoptotik genlerin ifadelerini de azalttığı öne sürülmektedir (30).

Yapılan literatür taramasında, SIRT6 ifadesinin incelendiği çalışmaların sınırlı olduğu saptanmıştır. SIRT6'nın, SIRT1 ile beraber, spermatidlerin olgunlaşma süreçlerinde rol adıkları

saptanmıştır (131). Fare testislerinde yapılan bir çalışmada, immunofloresans boyamalarda SIRT6 ekspresyonunun hem nükleer hem de sitoplazmik olarak spermatogonyum, spermatosit ve erken spermatidlerde olduğu ifade edilmiştir (195). Yüksek yağlı diyete bağlı yapılan bir obezite çalışmasında, SIRT6 ifadesinin kontrol ve diyet grupları arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı, daha çok erken ve geç spermatidlerde nükleer immünreaktivite gösterdiği tespit edilmiştir. SIRT6 ekspresyonunda önemli bir azalma ile sperm protaminasyonunda da azalma olduğu saptanmıştır. Testiküler germ hücrelerinde, azalan SIRT6 ifadesiyle beraber, H3K9 asetilasyonunda ve DNA hasarında artış görüldüğü kaydedilmektedir (153).

Tip 2 diyabet modeli oluşturulan farelerin serebral kortekslerinde, SIRT6 ifadesinin immünohistokimyasal olarak incelendiği bir çalışmada, SIRT6'nın nükleer lokalizasyon gösterdiği ve diyabetik grupta ifadesinin azaldığı belirtilmiştir. Çalışmada SIRT6'nın nöronlarda glukoz homeostazını sağladığı üzerinde durulmaktadır (146).

Tip 1 diyabet oluşturulan farelerde, diyabetik retinopati gelişiminde SIRT6 ifadesinin western blot yöntemi ile incelendiği bir çalışmada; diyabetik grupların retinalarında SIRT6 ve beyin kökenli nöroprotektif faktör (BDNF) ifadesinin azaldığı, buna karşın VEGF, H3K56 ve H3K9 faktörlerinin ifadelerinde artış olduğu belirtilmiştir (39).

Fan ve ark. (38) ile Liu ve arkadaşlarının (152) yaptıkları çalışmalarda, farelerde diyabetik nefropati oluşturup, SIRT6 ifadesini western blot, immünohistokimya ve immunfloresan yöntemlerle incelediklerinde, diyabetik gruplarda SIRT6 ifadesinin anlamlı derecede düştüğünü gösterilmişlerdir. Fan ve ark. (38) diyabetik nefropatide, podositlerde SIRT6 ifadesindeki azalmaya bağlı olarak apoptozisin arttığını, özellikle AMP kinaz defosforilasyonu ve mitokondriyal disfonksiyonun apoptoziste etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Liu ve ark. (152) SIRT6'nın, Wnt sinyalinin düzenleyicisi olduğu ve H3K9 deasetilasyonu ile Notch1/Notch4 transkripsiyon faktörlerini inhibe ederek, anti-inflamatuar ve antiapoptotik etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Literatürde, SIRT6/KU70 ilişkisine dair bilgiler oldukça sınırlıdır. Ancak Tao ve ark. (37) 2017 yılında ilk kez, SIRT6'nın da yine SIRT1 gibi, KU70 deasetilasyonu yaptığını ve KU70/Bax ilişkili apoptozisi inhibe ettiğini, hepatoselüler karsinoma hücre kültürü modelinde ortaya koymuşlardır. Zhang ve ark. (196) ise yaptıkları çalışmada, insan dental pulpa hücrelerinde bakteriyel lipopolisakkarit etkisine bağlı apoptoziste, SIRT6 ve KU70 ifadesini incelemişler, SIRT6'nın KU70'i deasetilize ederek, KU70/Bax bağlantısını arttırdığını ve apoptozisi inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Diyabete bağlı infertilite/subfertilite üzerine moleküler düzeyde çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Dolayısıyla hem proapoptotik hem de antiapoptotik yollarda görevli olan

proteinler, faktörler, sinyal yolları üzerindeki çalışmalar, diyabete bağlı infertilitenin altında yatan apoptozis mekanizmasının aydınlatılması ve dokularda meydana gelen hasarların önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Literatür bilgilerine dayanarak ilk kez diyabetik testis dokularında KU70, SIRT1 ve SIRT6 ifadelerinin bir arada gösterildiği bu çalışmada, elde ettiğimiz bulgular ışığında; diyabetik testis dokularında görülen apoptoziste KU70, SIRT1 ve SIRT6 proteinlerinin önemli bir rolü olabileceği kanısındayız. Apoptotik proteinlerle ilişkileri başka çalışmalarla da kanıtlanan bu proteinlerin rolünün, kantitatif farklı yöntemlerle de araştırılması ve özellikle diğer apoptotik yollarla karşılaştırılarak, öneminin irdelenmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak çalışmamızın, diyabetik testis dokularında KU70, SIRT1 ve SIRT6 proteinlerinin, apoptozis ve infertilitedeki olası rollerinin belirlenmesi ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği kanısındayız.

SONUÇLAR

Diyabetik erkek infertilitesinin ortaya çıkmasında oldukça önemli olan apoptozisin moleküler mekanizmalarında rolü olabileceğini düşündüğümüz KU70, SIRT1 ve SIRT6 proteinlerinin etkilerinin aydınlatılmasına ve buna bağlı olarak yeni tedavi protokollerinin gündeme gelmesine katkı sağlamayı amaçladığımız bu çalışmada; aynı biyolojik ve fizyolojik koşullar altında tutulan *Sprague Dawley* erkek sıçanlardan, kontrol grubu (n=8) ve tek doz 50 mg/kg streptozotosin uygulanan diyabet grubu (n=8) olmak üzere 2 grup oluşturulmuş ve denekler dört haftalık süre sonunda kurban edilmişlerdir.

Diyabet grubu bulgularımız, kontrol grubu bulgularıyla karşılaştırıldığında;

- 1- Diyabet grubunda serum testosteron düzeylerinin ve seminifer tübül çaplarının istatistiksel anlamlılıkla azaldığı ($P<0.001$),
- 2- H-E ve elektron mikroskopik bulgularımıza göre diyabet grubunda; literatürde yer alan tüm histopatolojik bulguların gözlemlendiği, ek bir bulgumuzun olmadığı
- 3- ‘Apoptotik hücre’ ve ‘apoptotik tübül’ indekslerinin diyabet grubunda, anlamlı derecede arttığı ($P<0.001$),
- 4- Bax ve kaspaz 3 ifadelerinin diyabet grubu testis dokusunda, anlamlı derecede yüksek bulunduğu ($P<0.001$),
- 5- Bcl-2 ifadesinin diyabet grubu testis dokusunda, istatistiksel anlamlılıkla azaldığı ($P<0.001$), buna karşın Bax/Bcl-2 oranının anlamlı olarak arttığı ($P<0.001$),
- 6- KU70 ifadesinin, diyabet grubu testis dokusunda, istatistiksel anlamlılıkla yüksek bulunduğu ($P=0.004$),

7- SIRT1 ve SIRT6 protein ifadelerinin ise diyabet grubu deneklerinde, istatistiksel anlamlılıkla azaldığı ($P<0.001$) belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular; diyabetik erkek hastalarda karşılaşılan subfertilite/infertilite olgularında, KU70, SIRT1 ve SIRT6 proteinlerinin önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.



ÖZET

Diyabetik erkek infertilite/subfertilitesi, günümüzde diyabetin önemli komplikasyonları arasında yerini almış, bu komplikasyona sebep olan moleküler mekanizmalarla ilgili oldukça fazla araştırma yapılan ve çözüm bekleyen bir sağlık sorunudur. Diyabetik erkek infertilitesinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve elde edilen verilerle yeni tedavi metodlarının geliştirilmesi, sorunun çözümü için önem arz etmektedir. Buradan hareketle çalışmamızda; KU70, SIRT1 ve SIRT6 proteinlerinin bahse konu mekanizmalar içerisindeki rolünün aydınlatılmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Stabil laboratuvar koşulları altında tuttuğumuz *Sprague Dawley* erkek sıçanlardan, kontrol grubu (n=8) ve tek doz 50 mg/kg streptozotosin uygulanan diyabet grubu (n=8) olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Diyabet grubunda; ışık ve elektron mikroskopik incelemelerimizde diyabetik testis dokusunda şimdiye kadar literatürde yer alan tüm histopatolojik bulgular gözlenmiş, morfometrik olarak da seminifer tübül çaplarının azaldığı (P<0.001) tespit edilmiştir. Serum testosteron seviyeleri düşen (P<0.001) diyabetik grup deneklerimizde; ‘apoptotik hücre indeksi’, ‘apoptotik tübül indeksi’ ve Bax ifadelerinin, kontrole kıyasla anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (tümü P<0.001). Bcl-2 protein ifadesi, diyabetik grupta istatistiksel anlamlılıkla azalmış (P<0.001), Bax/Bcl-2 oranı ise artmıştır (P<0.001). Kaspaz 3 immünreaktivitesi, Bax/Bcl-2 oranındaki artışa paralel şekilde yükselmiştir (P<0.001).

Çalışmamızın başlıca araştırma sorusu olan KU70, SIRT1 ve SIRT6 ifadelerinde ise KU70 diyabet grubunda istatistiksel anlamlılıkla artarken (P=0.004), SIRT1 ve SIRT6 ifadelerinin diyabetik grupta, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düştüğü belirlenmiştir (sırasıyla P=0.004; P<0.001).

Sonuç olarak bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgularla; diyabetik erkek hastalarda karşılaşılan subfertilite/infertilite olgularında, KU70, SIRT1 ve SIRT6 proteinlerinin önemli bir rolü olabileceği ve bu proteinlerin, kantitatif başka çalışmalarla da desteklenerek öneminin vurgulanması gerektiği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, testis, KU70, SIRT1, SIRT6.



THE ROLE OF KU70, SIRT1 AND SIRT6 PROTEINS IN DIABETIC TESTIS TISSUE

SUMMARY

Diabetic male infertility/subfertility is one of the most important complications of diabetes today. It is a health problem that has been investigated a lot of molecular mechanisms causing this complication. The clarification of the molecular mechanisms underlying diabetic male infertility and the development of new treatment methods with the data obtained are important for the solution of this problem. In our study we aimed to contribute to the elucidation of the role of KU70, SIRT1 and SIRT6 proteins in these mechanisms.

Sprague Dawley male rats were divided into control (n=8) and single dose of 50 mg/kg streptozotocin administered diabetic groups (n=8) which were kept under stable laboratory conditions. In the diabetes group, all histopathological findings in testes tissues according with literature were obtained by light and electron microscopic examinations. It was determined that the diaphragmatic tubule diameters and serum testosterone levels decreased (all $P < 0.001$). Otherwise, apoptotic cell and tubule indexes and Bax immunoreactivity significantly increased when compared to control testes (all $P < 0.001$). While statistically significant decrease was seen in Bcl-2 immunoreactivity, Bax/Bcl-2 ratio and caspase 3 immunoreactivity increased in diabetic group (all $P < 0.001$).

In the diabetes group, while the KU70 immunoreactivity showed statistically significant increase ($P = 0.004$), SIRT1 and SIRT6 expressions decreased significantly when compared to the control group ($P = 0.004$; $P < 0.001$, respectively).

As a result, we suggest KU70, SIRT1 and SIRT6 proteins may play an important role in subfertility/infertility cases encountered in diabetic male patients. The importance of these proteins should be emphasized by supporting other quantitative studies.

Keywords: Diabetes, testis, KU70, SIRT1, SIRT6.



KAYNAKLAR

1. Antonioli L, Blandizzi C, Csoka B, Pacher P, Hasko G. Adenosine signalling in diabetes mellitus--pathophysiology and therapeutic considerations. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(4):228-41.
2. https://www.turkdiaborg/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019pdf 09.2.2020 tarihinde erişildi.
3. https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF_Atlas_9th_Edition_2019pdf 29.11.2019 tarihinde erişildi.
4. American Diabetes A. (2) Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care* 2019;42:13-28.
5. Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab* 2016;20(4):546-51.
6. Raffaele M, Li Volti G, Barbagallo IA, Vanella L. Therapeutic Efficacy of Stem Cells Transplantation in Diabetes: Role of Heme Oxygenase. *Front Cell Dev Biol* 2016;4(80):1-7.
7. Zha W, Bai Y, Xu L, Liu Y, Yang Z, Gao H, et al. Curcumin Attenuates Testicular Injury in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Biomed Res Int* 2018;2018:1-10.
8. Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia* 2009;41(6):361-8.
9. Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int J Androl* 2006;29(4):482-8.

10. Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr Diabetes Rev* 2008;4(1):46-54.
11. Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832(5):626-35.
12. Trindade AA, Simoes AC, Silva RJ, Macedo CS, Spadella CT. Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras* 2013;28(4):256-65.
13. Ersoy O, Kizilay G. Effects of fucoidan on diabetic rat testicular tissue. *Biotech Histochem* 2018;93(4):277-85.
14. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
15. Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003;23:499-508.
16. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *Van Vet J* 2008;19(1):55-63.
17. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006;12(9):440-50.
18. Davis JD, Lin SY. DNA damage and breast cancer. *World J Clin Oncol* 2011;2(9):329-38.
19. Kurtoğlu EL, Tekedereli İ. DNA Onarım Mekanizmaları. *Balikesir Sağlık Bil Derg* 2015;4(3):169-77.
20. Kelley MR, Fishel ML. DNA Repair Proteins as Molecular Targets for Cancer Therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8(4):417-25.
21. Wang B, Xie M, Li R, Owonikoko TK, Ramalingam SS, Khuri FR, et al. Role of Ku70 in deubiquitination of Mcl-1 and suppression of apoptosis. *Cell Death Differ* 2014;21(7):1160-9.
22. Yu W, Li L, Wang G, Zhang W, Xu J, Liang A. KU70 Inhibition Impairs Both Non-Homologous End Joining and Homologous Recombination DNA Damage Repair Through SHP-1 Induced Dephosphorylation of SIRT1 in Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 2018;49(6):2111-23.
23. Alshareeda AT, Negm OH, Albarakati N, Green AR, Nolan C, Sultana R, et al. Clinicopathological significance of KU70/KU80, a key DNA damage repair protein in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;139(2):301-10.
24. Koike M. Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J Radiat Res* 2002;43(3):223-36.

25. Hada M, Kwok RP. Regulation of ku70-bax complex in cells. *J Cell Death* 2014;7:11-3.
26. Xu TJ, Liu Y, Li P, Xu XL, Zeng JR. Insulin in combination with selenium inhibits HG/Pal-induced cardiomyocyte apoptosis by Cbl-b regulating p38MAPK/CBP/Ku70 pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20(15):3297-303.
27. Tavana O, Puebla-Osorio N, Kim J, Sang M, Jang S, Zhu C. Ku70 functions in addition to nonhomologous end joining in pancreatic β -cells: a connection to β -catenin regulation. *Diabetes* 2013;62(7):2429-38.
28. Gomez JA, Gama V, Yoshida T, Sun W, Hayes P, Leskov K, et al. Bax-inhibiting peptides derived from Ku70 and cell-penetrating pentapeptides. *Biochem Soc Trans* 2007;35(4):797-801.
29. Bayram A, İğci M. Sirtuin Genleri ve İşlevleri. *Fırat Tıp Derg* 2013;18(3):136-40.
30. Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(10):608-24.
31. Wang W, Sun W, Cheng Y, Xu Z, Cai L. Role of sirtuin-1 in diabetic nephropathy. *J Mol Med* 2019;97(3):291-309.
32. Jiao D, Zhang H, Jiang Z, Huang W, Liu Z, Wang Z, et al. MicroRNA-34a targets sirtuin 1 and leads to diabetes-induced testicular apoptotic cell death. *J Mol Med* 2018;96(9):939-49.
33. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007;404(1):1-13.
34. Rahman S, Islam R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Commun Signal* 2011;9(11):1-8.
35. Bell EL, Nagamori I, Williams EO, Del Rosario AM, Bryson BD, Watson N, et al. SirT1 is required in the male germ cell for differentiation and fecundity in mice. *Development* 2014;141(18):3495-504.
36. Sharma A, Diecke S, Zhang WY, Lan F, He C, Mordwinkin NM, et al. The role of SIRT6 protein in aging and reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 2013;288(25):18439-47.
37. Tao N-N, Ren J-H, Tang H, Ran L-K, Zhou H-Z, Liu B, et al. Deacetylation of Ku70 by SIRT6 attenuates Bax-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;485(4):713-9.
38. Fan Y, Yang Q, Yang Y, Gao Z, Ma Y, Zhang L, et al. Sirt6 Suppresses High Glucose-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Podocytes through AMPK Activation. *Int J Biol Sci* 2019;15(3):701-13.

39. Zorrilla-Zubilete MA, Yeste A, Quintana FJ, Toiber D, Mostoslavsky R, Silberman DM. Epigenetic control of early neurodegenerative events in diabetic retinopathy by the histone deacetylase SIRT 6. *J Neurochem* 2018;144(2):128-38.
40. Kerner W, Bruckel J, German Diabetes A. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014;122(7):384-6.
41. Shanmugasundaram D, Duraiswamy A, Viswanathan A, Sasikumar CS, Cherian SM, Cherian KM. Development of an antidiabetic polyherbal formulation (ADPHF6) and assessment of its antioxidant activity against ROS-induced damage in pUC19 and human lymphocytes - an in vitro study. *J Complement Integr Med* 2016;13(3):267-74.
42. Günalay S, Taşkıran E, Demir B, Erdem S, Mergen H, Akar H. Tip 2 diabetes mellitus hastalarında tedavi yöntemleri, glisemik kontrol ve diyabet komplikasyonları ile depresyon ve anksiyete riski arasındaki ilişki. *FNG & Bilim Tıp Dergisi* 2016;2(1):16-9.
43. Ding G-L, Liu Y, Liu M-E, Pan J-X, Guo M-X, Sheng J-Z, et al. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian J Androl* 2015;17(6):948-53.
44. Group NDD. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* 1979;28(12):1039-57.
45. Organization WH. WHO Expert Committee on diabetes Mellitus. Geneva: World Health Organization;1980.
46. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(3):481-97.
47. Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc* 1982;104(5):653-60.
48. Wenzlau JM, Hutton JC. Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2013;13(5):608-15.
49. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J* 2012;27(4):269-73.
50. Swinnen SG, Hoekstra JB, DeVries JH. Insulin therapy for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:253-9.
51. Kirkman MS, Briscoe VJ, Clark N, Florez H, Haas LB, Halter JB, et al. Diabetes in older adults. *Diabetes Care* 2012;35(12):2650-64.
52. Kim SY, England L, Wilson HG, Bish C, Satten GA, Dietz P. Percentage of gestational diabetes mellitus attributable to overweight and obesity. *Am J Public Health* 2010;100(6):1047-52.

53. Virjee S, Robinson S, Johnston DG. Screening for diabetes in pregnancy. *J R Soc Med* 2001;94(10):502-9.
54. Kurçer Z, Karaoğlu D. Deneysel Diyabet Modellerinde Alloksan ve Streptozotosin Kullanımı. *Türk Jem* 2012;16:34-40.
55. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi *Genel Tıp Derg* 2007;17(4):231-6.
56. İrer SV, Alper G. Deneysel Diyabet Modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004;2(3):127-36.
57. Mishra G, Panda PK, Satapathy T. Animal models for type 2 diabetes: A review. *World J Pharm Sci* 2016;4(1):141-7.
58. Maqbool M, Dar MA, Gani I, Mir SA. Animal models in diabetes mellitus: an overview. *J Drug Deliv* 2019;9(1-s):472-5.
59. Dunn JS, Kirkpatrick J, McLetchie N, Telfer S. Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. *J Pathol Bacteriol* 1943;55(3)245-57.
60. Junod A, Lambert A, Stauffacher W, Renold A. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;126(1):201-5.
61. Sharma R, Dave V, Sharma S, Jain P, Yadav S. Experimental Models on Diabetes: A Comprehensive Review. *IJAP* 2013;4(1-8).
62. Goud BJ, Dwarakanath.V, Swamy BKC. Streptozotocin - A Diabetogenic Agent in Animal Models. *IjpprHuman* 2015;3(1):253-269.
63. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51(2):216-26.
64. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.
65. Bansal K, Reddy K, Trigunayat A. Anti-hyperglycaemic study of Eladi Churna in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. *IJTK* 2019;18(1):34-40.
66. Sancak B, Cumhuriyet M. Fonksiyonel Anatomi. Ankara: Metu Press; 2002. s. 322-4.
67. Arifoğlu Y. Her Yönüyle Anatomi. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri; 2019. s. 468.
68. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Baykal B (Editor). Erkek Üreme Sistemi. İstanbul: Palme Yayıncılık; 2013. s. 784-802.
69. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F (Editorler). İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi; 2009. s. 175-8.

70. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Editor). Ankara: Palme Yayıncılık; 2011. s. 246-51.
71. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2009. s. 253-64.
72. Mescher AL. Temel Histoloji Text and Atlas. Solakoğlu S, Erdoğan A, Mutlu HS (Editorler). Erkek Üreme Sistemi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2019. s. 439-48.
73. Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev* 2014;10(3):147-57.
74. Donmez YB, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Acta Cir Bras* 2014;29(10):644-50.
75. Lotti F, Maggi M. Sexual dysfunction and male infertility. *Nat Rev Urol* 2018;15(5):287-307.
76. Bayram S, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y. Evaluation of the Fas/FasL signaling pathway in diabetic rat testis. *Biotech Histochem* 2016;91(3):204-11.
77. Roessner C, Paasch U, Kratzsch J, Glander HJ, Grunewald S. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reprod Biomed Online* 2012;25(3):292-9.
78. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
79. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2011;20(3):145-58.
80. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001;26(1):61-6.
81. Li Y-J, Song T-B, Cai Y-Y, Zhou J-S, Song X, Zhao X, et al. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci* 2009;108(2):427-36.
82. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Van Vet J* 2008;273-8.
83. Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15(1):623-35.
84. Koroglu P, Senturk GE, Yucel D, Ozakpinar OB, Uras F, Arbak S. The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. *Peptides* 2015;63:47-54.
85. Cambay Z, Baydas G, Tuzcu M, Bal R. Pomegranate (*Punica granatum L.*) flower improves learning and memory performances impaired by diabetes mellitus in rats. *Acta Physiologica Hungarica* 2011;98(4):409-20.

86. Öztaş E, Yılmaz TE, Güzel E, Sezer Z, Okyar A, Özhan G. Gliclazide alone or in combination with atorvastatin ameliorated reproductive damage in streptozotocin-induced type 2 diabetic male rats. *Saudi Pharm J* 2019;27(3):422-31.
87. Ding C, Wang Q, Hao Y, Ma X, Wu L, Li W, et al. Vitamin D supplement improved testicular function in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;473(1):161-7.
88. Wankeu-Nya M, Florea A, Bâlici S, Watcho P, Matei H, Kamanyi A. *Dracaena arborea* alleviates ultra-structural spermatogenic alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 2013;13(71):1-9
89. Kanwal A, Dsouza LA. Sirtuins and diabetes: optimizing the sweetness in the blood. *Transl Med Commun* 2019;4(3):1-8.
90. Lebrun P, Montminy MR, Van Obberghen E. Regulation of the pancreatic duodenal homeobox-1 protein by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2005;280(46):38203-10.
91. Kerr E, Holohan C, McLaughlin KM, Majkut J, Dolan S, Redmond K, et al. Identification of an acetylation-dependant Ku70/FLIP complex that regulates FLIP expression and HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2012;19(8):1317-27.
92. Wang Y, Lai L, Guo W, Peng S, Liu R, Hong P, et al. Inhibition of Ku70 in a high-glucose environment aggravates bupivacaine-induced dorsal root ganglion neurotoxicity. *Toxicol Lett* 2020;318104-13.
93. Tuncdemir M, Ozturk M. Regulation of the Ku70 and apoptosis-related proteins in experimental diabetic nephropathy. *Metabolism* 2016;65(10):1466-77.
94. Satoh A, Stein L, Imai S. The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity. *Handb Exp Pharmacol* 2011;206:125-62.
95. Sirotkin AV. The Role and Application of Sirtuins and mTOR Signaling in the Control of Ovarian Functions. *Cells* 2016;5(42)1-8.
96. Rato L, Alves MG, Silva BM, Sousa M, Oliveira PF. Sirtuins: Novel Players in Male Reproductive Health. *Curr Med Chem* 2016;23(11):1084-99.
97. Morigi M, Perico L, Benigni A. Sirtuins in Renal Health and Disease. *J Am Soc Nephrol* 2018;29(7):1799-809.
98. Klar AJ, Fogel S, Macleod K. MAR1—a regulator of the HMa and HM α loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1979;93(1):37-50.
99. Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 2002;277(47):45099-107.

100. Schiedel M, Robba D, Rumpf T, Sippl W, Jung M. The Current State of NAD⁺-Dependent Histone Deacetylases (Sirtuins) as Novel Therapeutic Targets. *Med Res Rev* 2018;38(1):147-200.
101. Herskovits AZ, Guarente L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell research* 2013;23(6):746-58.
102. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005;363:15-23.
103. Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO Rep* 2005;6(6):520-4.
104. Yang T, Zhou R, Yu S, Yu S, Cui Z, Hu P, et al. Cytoplasmic SIRT1 inhibits cell migration and invasion by impeding epithelial–mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Mol Cell Biochem* 2019;459(1-2):157-69.
105. Bouras T, Fu M, Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, et al. SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem* 2005;280(11):10264-76.
106. Dai JM, Wang ZY, Sun DC, Lin RX, Wang SQ. SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J Cell Physiol* 2007;210(1):161-6.
107. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004;303(5666):2011-5.
108. Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res* 2005;65(22):10457-63.
109. Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 2005;280(21):20589-95.
110. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 2005;434(7029):113-8.
111. Jiang X, Chen J, Zhang C, Zhang Z, Tan Y, Feng W, et al. The protective effect of FGF21 on diabetes-induced male germ cell apoptosis is associated with up-regulated testicular AKT and AMPK/Sirt1/PGC-1 α signaling. *Endocrinology* 2015;156(3):1156-70.
112. Lemieux ME, Yang X, Jardine K, He X, Jacobsen KX, Staines WA, et al. The Sirt1 deacetylase modulates the insulin-like growth factor signaling pathway in mammals. *Mech Ageing Dev* 2005;126(10):1097-105.

113. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 1999;13(19):2570-80.
114. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 2007;100(10):1512-21.
115. Waldman M, Nudelman V, Shainberg A, Abraham NG, Kornwoski R, Aravot D, et al. PARP-1 inhibition protects the diabetic heart through activation of SIRT1-PGC-1 α axis. *Exp Cell Res* 2018;373(1-2):112-8.
116. Waldman M, Cohen K, Yadin D, Nudelman V, Gorfil D, Laniado-Schwartzman M, et al. Regulation of diabetic cardiomyopathy by caloric restriction is mediated by intracellular signaling pathways involving 'SIRT1 and PGC-1 α '. *Cardiovasc Diabetol* 2018;17(111):1-12.
117. Fusco R, Scuto M, Cordaro M, D'Amico R, Gugliandolo E, Siracusa R, et al. N-Palmitoylethanolamide-Oxazoline Protects against Middle Cerebral Artery Occlusion Injury in Diabetic Rats by Regulating the SIRT1 Pathway. *Int J Mol Sci* 2019;20(4845):1-22.
118. Chandrasekaran K, Anjaneyulu M, Choi J, Kumar P, Salimian M, Ho C-Y, et al. Role of mitochondria in diabetic peripheral neuropathy: Influencing the NAD⁺-dependent SIRT1-PGC-1 α -TFAM pathway. *Int Rev Neurobiol* 2019;145:177-209.
119. Yerra VG, Kalvala AK, Kumar A. Isoliquiritigenin reduces oxidative damage and alleviates mitochondrial impairment by SIRT1 activation in experimental diabetic neuropathy. *J Nutr Biochem* 2017;47:41-52.
120. Mohammad G, Abdelaziz GM, Siddiquei MM, Ahmad A, De Hertogh G, Abu El-Asrar AM. Cross-Talk between Sirtuin 1 and the Proinflammatory Mediator High-Mobility Group Box-1 in the Regulation of Blood-Retinal Barrier Breakdown in Diabetic Retinopathy. *Curr Eye Res* 2019;44(10):1133-43.
121. Mishra M, Duraisamy AJ, Kowluru RA. Sirt1: a guardian of the development of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2018;67(4):745-54.
122. Karbasforooshan H, Karimi G. The role of SIRT1 in diabetic retinopathy. *Biomed Pharmacother* 2018;97:190-4.
123. Fan C, Ma Q, Xu M, Qiao Y, Zhang Y, Li P, et al. Ginsenoside Rb1 Attenuates High Glucose-Induced Oxidative Injury via the NAD-PARP-SIRT Axis in Rat Retinal Capillary Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* 2019;20(4936):1-19.
124. Ma F, Wu J, Jiang Z, Huang W, Jia Y, Sun W, et al. P53/NRF2 mediates SIRT1's protective effect on diabetic nephropathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Mol Cell Res* 2019;1866(8):1272-81.

125. Ahmed HH, Taha FM, Omar HS, Elwi HM, Abdelnasser M. Hydrogen sulfide modulates SIRT1 and suppresses oxidative stress in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biochem* 2019;457(1-2):1-9.
126. Sanajou D, Haghjo AG, Argani H, Roshangar L, Rashtchizadeh N, Ahmad SNS, et al. Reduction of renal tubular injury with a RAGE inhibitor FPS-ZM1, valsartan and their combination in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Eur J Pharmacol* 2019;5(842):40-8.
127. McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, et al. The Mammalian SIR2 Protein Has a Role in Embryogenesis and Gametogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23(1):38-4.
128. Ogawa T, Wakai C, Saito T, Murayama A, Mimura Y, Youfu S, et al. Distribution of the longevity gene product, SIRT1, in developing mouse organs. *Congenital Anomalies* 2011;51(2):70-9.
129. 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.
130. Mu Y, Yin T-l, Yin L, Hu X, Yang J. CTRP3 attenuates high-fat diet-induced male reproductive dysfunction in mice. *Clinical Science* 2018;132(8):883-99.
131. Tatone C, Di Emidio G, Barbonetti A, Carta G, Luciano AM, Falone S, et al. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. *Hum Reprod Update* 2018;24(3):267-89.
132. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 2006;124(2):315-29.
133. Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann Med* 2007;39(5):335-45.
134. Szegő ÉM, Outeiro TF, Kazantsev AG. Sirtuins in brain and neurodegenerative disease. *Introductory Review on Sirtuins in Biology, Aging, and Disease*. Elsevier 2018;13:175-95.
135. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. Sirtuins and type 2 diabetes: role in inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function. *Front Endocrinol* 2019;10(187):1-12.
136. Jing H, Lin H. Sirtuins in epigenetic regulation. *Chem Rev* 2015;115(6):2350-75.
137. Marquardt JU, Fischer K, Baus K, Kashyap A, Ma S, Krupp M, et al. Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* 2013;58(3):1054-64.

138. McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging* 2009;1(1):109-21.
139. Bauer I, Grozio A, Lasigliè D, Basile G, Sturla L, Magnone M, et al. The NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca²⁺ responses. *J Biol Chem* 2012;287(49):40924-37.
140. Thandavarayan RA, Garikipati VNS, Joladarashi D, Suresh Babu S, Jeyabal P, Verma SK, et al. Sirtuin-6 deficiency exacerbates diabetes-induced impairment of wound healing. *Exp Dermatol* 2015;24(10):773-8.
141. Song J, Yang B, Jia X, Li M, Tan W, Ma S, et al. Distinctive roles of sirtuins on diabetes, protective or detrimental? *Frontiers Endocrinol* 2018;9(724):1-13.
142. Kuang J, Chen L, Tang Q, Zhang J, Li Y, He J. The role of Sirt6 in obesity and diabetes. *Front Physiol* 2018;9(135):1-9.
143. Lin N, Niu Y, Zhang W, Li X, Yang Z, Su Q. microRNA-802 is involved in palmitate-induced damage to pancreatic beta cells through repression of sirtuin 6. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(11):11300-7.
144. Zhou S, Tang X, Chen H-Z. Sirtuins and insulin resistance. *Front Endocrinol* 2018;9(748):1-21.
145. Carreira MC, Izquierdo AG, Amil M, Casanueva FF, Crujeiras AB. Oxidative stress induced by excess of adiposity is related to a downregulation of hepatic SIRT6 expression in obese individuals. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018(6256052):1-7.
146. Favero G, Rezzani R, Rodella LF. Sirtuin 6 nuclear localization at cortical brain level of young diabetic mice: an immunohistochemical study. *Acta Histochem* 2014;116(1):272-7.
147. Liu Y, Li Y, Nan Lp, Wang F, Zhou Sf, Wang Jc, et al. The effect of high glucose on the biological characteristics of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biochem Funct* 2020:1-11.
148. Khan RI, Nirzhor SSR, Akter R. A review of the recent advances made with SIRT6 and its implications on aging related processes, major human diseases, and possible therapeutic targets. *Biomolecules* 2018;8(3):44.
149. Kanwal A, Pillai VB, Samant S, Gupta M, Gupta MP. The nuclear and mitochondrial sirtuins, Sirt6 and Sirt3, regulate each other's activity and protect the heart from developing obesity-mediated diabetic cardiomyopathy. *FASEB J* 2019;33(10):10872-88.
150. Liu R, Liu H, Ha Y, Tilton RG, Zhang W. Oxidative stress induces endothelial cell senescence via downregulation of Sirt6. *Biomed Res Int* 2014;2014(902842):2-13.

151. Morigi M, Perico L, Benigni A. Sirtuins in renal health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2018;29(7):1799-809.
152. Liu M, Liang K, Zhen J, Zhou M, Wang X, Wang Z, et al. Sirt6 deficiency exacerbates podocyte injury and proteinuria through targeting Notch signaling. *Nat Commun* 2017;8(1):1-15.
153. Palmer NO, Fullston T, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. SIRT6 in mouse spermatogenesis is modulated by diet-induced obesity. *Reprod Fertil Dev* 2011;23(7):929-39.
154. Nasirian F, Sarir H, Moradi-kor N. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of *Nannochloropsis oculata* microalgae in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomol Concepts* 2019;10(1):37-43.
155. Sadik NA, El-Seweidy MM, Shaker OG. The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rat testes. *Cell Physiol Biochem* 2011;28(5):887-98.
156. Franca L, Suescun M, Miranda J, Giovambattista A, Perello M, Spinedi E, et al. Testis structure and function in a nongenetic hyperadipose rat model at prepubertal and adult ages. *Endocrinology* 2006;147(3):1556-63.
157. Choi EK, Lee YH, Choi YS, Kwon HM, Choi MS, Ro JY, et al. Heterogeneous expression of Ku70 in human tissues is associated with morphological and functional alterations of the nucleus. *J Pathol* 2002;198(1):121-30.
158. Li C, Wang L, Zheng L, Zhan X, Xu B, Jiang J, et al. SIRT1 expression is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther* 2015;2015(8):977-984.
159. Azuma Y, Yokobori T, Mogi A, Altan B, Yajima T, Kosaka T, et al. SIRT6 expression is associated with poor prognosis and chemosensitivity in patients with non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2015;112(2):231-7.
160. Kukner A, Oner J, Oner H, Ozan E. Effect of the vitamin E on expression of apoptosis-related proteins in immobilized rat testes. *J Anim Vet Adv* 2010;9(1):180-5.
161. Liu Y, Yang Z, Kong D, Zhang Y, Yu W, Zha W. Metformin Ameliorates Testicular Damage in Male Mice with Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes through the PK2/PKR Pathway. *Oxidative Med Cell Longev* 2019;2019:1-14.
162. Bener A, Al-Ansari AA, Zirie M, Al-Hamaq AO. Is male fertility associated with type 2 diabetes mellitus? *Int Urol Nephrol* 2009;41(4):777-84.
163. Salimnejad R, Sazegar G, Borujeni MJS, Mousavi SM, Salehi F, Ghorbani F. Protective effect of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* on diabetes-induced testicular damage and serum testosterone concentration. *Int J Reprod Biomed* 2017;15(4):195-202.

164. Oghbaei H, Alipour MR, Hamidian G, Ahmadi M, Ghorbanzadeh V, Keyhanmanesh R. Two months sodium nitrate supplementation alleviates testicular injury in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Exp Physiol* 2018;103(12):1603-17.
165. Rezaei AA, Salehi I, Karimi SA, Rahnema M. The effects of *Commiphora mukul* extract on spermatogenesis and testosterone levels in male diabetic rats. *Clin Exp Reprod Med* 2020;47(1):34-41
166. Howland B, Zebrowski E. Some effects of experimentally-induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats. *Horm Metab Res* 1976;8(06):465-9.
167. La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Lanzafame F, Giammusso B, Vicari E. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. *Minerva Endocrinol* 2009;34(1):1-9.
168. Ayuob NN, Murad HA, Ali SS. Impaired expression of sex hormone receptors in male reproductive organs of diabetic rat in response to oral antidiabetic drugs. *Folia Histochem Cytobiol* 2015;53(1):35-48.
169. Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Ozercan I, Kuloglu T, et al. Protective effects of nanostructures of hydrated C60 fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology* 2011;282(3):69-81.
170. Barsiah S, Behnam-Rassouli M, Shahabipour F, Rostami S, Sabbaghi MA, Momeni Z, et al. Evaluation of testis hormonal and histopathological alterations in type I and type II diabetic rats. *Journal of cellular biochemistry* 2019;120(10):16775-85.
171. Ghosh S, Chowdhury S, Das AK, Sil PC. Taurine ameliorates oxidative stress induced inflammation and ER stress mediated testicular damage in STZ-induced diabetic Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2019;124(2019):64-80.
172. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res* 2008;40(4):354-60.
173. Samadian Z, Tofighi A, Razi M, Tolouei Azar J, Ghaderi Pakdel F. Moderate-intensity exercise training ameliorates the diabetes-suppressed spermatogenesis and improves sperm parameters: Insole and simultaneous with insulin. *Andrologia* 2019;51(11):1-11.
174. Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res* 2000;28(5):342-7.
175. Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. Deneysel Diyabetin Sıçan Testislerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(2):173-8.
176. Altay B, Çetinkalp Ş, Doğanavşargil B, Hekimgil M, Semerci B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil Steril* 2003;80(2):828-31.

177. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec* 1985;213(1):53-62.
178. Sisman AR, Kiray M, Camsari UM, Evren M, Ates M, Baykara B, et al. Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: nerve growth factor beta and vascular endothelial growth factor. *Dis Markers* 2014;2014:1-7.
179. Koh PO. Streptozotocin-Induced Diabetes Increases Apoptosis through JNK Phosphorylation and Bax Activation in Rat Testes. *J Vet Med Sci* 2007;69(9):969–71.
180. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD (P) H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(3):227-32.
181. Jin L, Lagoda G, Leite R, Webb RC, Burnett AL. NADPH oxidase activation: A mechanism of hypertension-associated erectile dysfunction. *J Sex Med* 2008;5(3):544-51.
182. He X, Sun J, Huang X. Expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 in hippocampus of rats with diabetes and subarachnoid hemorrhage. *Exp Ther Med* 2018;15(1):873-7.
183. Alsenosy A-wA, El-Far AH, Sadek KM, Ibrahim SA, Atta MS, Sayed-Ahmed A, et al. Graviola (*Annona muricata*) attenuates behavioural alterations and testicular oxidative stress induced by streptozotocin in diabetic rats. *PloS one* 2019;14(9):1-18.
184. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pBad/14-3-3 in rat testis. *Life Sci* 2007;81(13):1079-84.
185. İrtegün S, Deveci E. Diyabetik Sıçanların Testis Dokusunda VEGF ve Bcl-2 Ekspresyon Düzeylerinin İmmünohistokimya ve Western Blot Yöntemleri İle İncelenmes. *Dicle Med J* 2016;43(4):527-33.
186. Khamis T, Abdelalim AF, Abdallah SH, Saeed AA, Edress NM, Arisha AH. Early intervention with breast milk mesenchymal stem cells attenuates the development of diabetic-induced testicular dysfunction via hypothalamic Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH system in male rats. *Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;1866(165577):1-14.
187. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2005;37(11):719-27.
188. Liu H, Zhang S, Liu C, Wu J, Wang Y, Yuan L, et al. Resveratrol ameliorates Microcystin-LR-Induced testis germ cell apoptosis in rats via SIRT1 signaling pathway activation. *Toxins* 2018;10(6):235.

189. Hu JH, Jiang J, Hua Y, Na Y, Zhang MH, Min W, et al. Enhancement of germ cell apoptosis induced by ethanol in transgenic mice overexpressing Fas Ligand. *Cell Res* 2003;13(5):361-7.
190. Yin Y, DeWolf WC, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and-independent pathways in mice. *Biol Reprod* 1998;58(2):492-6.
191. Matsuyama S, Palmer J, Bates A, Poventud-Fuentes I, Wong K, Ngo J, et al. Bax-induced apoptosis shortens the life span of DNA repair defect Ku70-knockout mice by inducing emphysema. *Exp Biol Med* 2016;241(12):1265-71.
192. Al-Bader M, Kilarkaje N. Dataset of Trans-Resveratrol on diabetes-induced abnormal spermatogenesis, poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) expression in intra-testicular blood vessels, and stage-dependent expression of PARP1 and Sirtuin 1 in the rat testis. *Data Brief* 2017;10(2017):230-7.
193. Zhao Y, Tan Y, Dai J, Wang B, Li B, Guo L, et al. Zinc deficiency exacerbates diabetic down-regulation of Akt expression and function in the testis: essential roles of PTEN, PTP1B and TRB3. *J Nutr Biochem* 2012;23(8):1018-26.
194. Kong Z-L, Johnson A, Ko F-C, He J-L, Cheng S-C. Effect of Cistanche Tubulosa Extracts on Male Reproductive Function in Streptozotocin–Nicotinamide-Induced Diabetic Rats. *Nutrients* 2018;10(1562):1-22.
195. Ki BS, Park M, Woo Y, Lee WS, Ko JJ, Choi Y. Expression of Sirt1, Sirt2, Sirt5, and Sirt6 in the Mouse Testis. *Reprod Fertil Dev* 2015;39(2):73-47.
196. Zhang L, Bai L, Ren Q, Sun G, Si Y. Protective effects of SIRT6 against lipopolysaccharide (LPS) are mediated by deacetylation of Ku70. *Mol Immunol* 2018;101(2018):312-8.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller	No
Şekil 1. Streptozotosinin kimyasal yapısı	7
Şekil 2. Tek ve çift zincir kırıklarında görevli Sirtuinler ve KU proteinleri	18
Şekil 3. KU70/Bax kompleksi.....	18
Şekil 4. Sirtuinlerin hücre içinde lokalizasyonları	20
Şekil 5. Deney süresince ölçülen kan glukoz değerlerini içeren grafik	32
Şekil 6. Kontrol ve diyabet grubu serum testosteron değerlerini içeren grafik.....	33
Şekil 7. Kontrol ve diyabet grubu seminifer tübül çapı değerlerini gösteren grafik	34
Şekil 8. Kontrol ve diyabet grubu testis H-E kesitlerini gösteren şekil	36
Şekil 9. Kontrol grubu elektron mikroskopik görüntülerinin izlendiği şekil.	37
Şekil 10. Diyabet grubu elektron mikroskopik görüntülerinin izlendiği şekil.....	38
Şekil 11. Kontrol ve diyabet grubu TUNEL bulgularını gösteren şekil.....	39
Şekil 12. Kontrol ve diyabet gruplarında TUNEL indeks değerlerini gösteren şekil.	40
Şekil 13. Kontrol ve diyabet gruplarına ait Bax bulgularını gösteren şekil.	41
Şekil 14. Kontrol ve diyabet gruplarına ait Bcl-2 bulgularını gösteren şekil.....	42
Şekil 15. Kontrol ve diyabet gruplarına ait Bax, Bcl-2 grafiklerinin izlendiği şekil	43
Şekil 16. Kontrol ve diyabet gruplarına ait kaspaz 3 bulgularını gösteren şekil.....	44
Şekil 17. Kontrol ve diyabet gruplarına ait KU70 bulgularını gösteren şekil.....	46
Şekil 18. Kontrol ve diyabet gruplarına ait SIRT1 bulgularını gösteren şekil.....	48
Şekil 19. Kontrol ve diyabet gruplarına ait SIRT6 bulgularını gösteren şekil	50

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Edirne’de doğdu. Ortaöğrenimini İstanbul Kartal Lisesi’nde 2006 yılında tamamladıktan sonra, 2007-2011 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimini aldı. 2011-2013 yılları arasında, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2013-2020 yılları arasında, aynı Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalıştı. 2019 yılında, Çapa Tıp Fakültesi İnfertilite Bölümünde Klinik Embriyoloji programına katıldı. 2014 yılında, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı’nda başladığı doktora eğitimine devam etmektedir.

EKLER



Ek-1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2017/06

Karar Tarihi: 30.06.2017

KARAR NO: 2017.06.01

Yürütcülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'ın yaptığı, Arş. Gör. Selim DEMİRTAŞ'ın Doktora tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2017/17 protokol nolu "KU70, SIRT1 ve SIRT6 Proteinlerinin Diyabetik Testis Dokusundaki Rolü" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

-İZİNLI-

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

-KATILMADI-

Ecz. F. Uygur GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

-KATILMADI-

Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır