

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN
İkinci Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Engin DEVECİ

**JNK İNHİBİSYONUNUN DİYABETİK TESTİS
DOKULARINDAKİ ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİNE ETKİSİ**

(Doktora Tezi)

Şinasi BAYRAM

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN
İkinci Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Engin DEVECİ

**JNK İNHİBİSYONUNUN DİYABETİK TESTİS
DOKULARINDAKİ ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİNE ETKİSİ**

(Doktora Tezi)

Şinasi BAYRAM

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi-2018/162

Tez No :

EDİRNE – 2020

TEŞEKKÜR

Yetişmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen sevgili aileme minnettarım. Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, bana yardımcı olan başta danışmanım Sayın Prof.Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN olmak üzere, ikinci danışmanım Sayın Prof.Dr.Engin DEVECİ, değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR, Doç.Dr. Yeşim Hülya UZ, Doç.Dr. Melike SAPMAZ METİN'e ve Trakya Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarıma, katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca projemize mali destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
DİABETES MELLİTUS.....	3
DENEYSEL DİYABET MODELLERİ.....	5
TESTİSL EMBRİYOLOJİSİ VE HİSTOLOJİSİ.....	7
SPERMATOGENEZ.....	9
DİABETES MELLİTUS VE ERKEK İNFERTİLİTESİ.....	10
APOPTOZİS.....	11
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ.....	12
JNK ETKİNLİĞİ.....	15
JNK İNHİBİSYONU.....	17
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	20
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA.....	39
SONUÇLAR.....	44
ÖZET	46
SUMMARY.....	47
KAYNAKLAR.....	48
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	60
EKLER.....	

SİMGE VE KISALTMALAR

AIF	: Apoptozis İndükleyici Faktör
ATF	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü
ATP	: Adenozin Trifosfat
CHOP	: C/EBP Homolog Proteini
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DM	: Diabetes Mellitus
ER	: Endoplazmik Retikulum
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormon
i.p	: İntraperitoneal
LH	: Luteinleştirici Hormon
MAPK	: Mitojenlerin Aktive Ettiği Protein Kinaz
STZ	: Streptozotosin
JNK	: c-jun –N-Terminal Kinaz

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), tüm dünyada toplum sağlığını tehdit eden, yüksek kan glukoz düzeyleri ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Ülkemizde ve dünyada prevalansı hızla artmaktadır. Dünyada 2019 yılı itibarıyla yaklaşık 461 milyon olan diyabetli birey sayısının, 2045 yılında 230 milyon kişi artacağı öngörülmektedir (1). Böylesine hızlı bir şekilde artan, günümüz insanların kötü beslenme alışkanlıkları ve fiziksel aktivitelerinin azlığı sebebiyle de kontrol edilemeyen, DM ve komplikasyonlarının tedavisine 2019 yılı verilerine göre 763 milyar dolar harcandığı bildirilmiştir (2).

Tedavi sürecinde olmayan diyabet hastalarında pek çok komplikasyon ortaya çıkabildiği gibi, kötü yönetilen bir hastalık süreci de ölümlle sonuçlanabilmektedir. DM'nin başlıca komplikasyonları arasında; vasküler hastalıklar, nefropati, nöropati ve retinopati bulunmaktadır (1). Diyabetin bu iyi bilinen komplikasyonlarına ek olarak, erkek genital sisteminde de, önemli fizyo ve histopatolojiler ortaya çıkarabileceği ve bunların infertiliteyle sonuçlanabileceği son dönemlerde yapılan pek çok çalışmada vurgulanmıştır (3-8). Bu çalışmalarda diyabetin; erkek bireylerdeki üreme potansiyelini olumsuz etkilediği, biyokimyasal ve histopatolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Diyabete maruz kalan insanların testis dokularını incelemek çoğunlukla mümkün olmadığı için, insan testis dokularıyla büyük benzerlikler gösteren sıçan testis dokuları, diyabet araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (5-9).

Diyabete bağlı olarak gelişen erkek infertilitesi, yapılan çalışmalarda sıklıkla apoptozis (programlı hücre ölümü) ile ilişkilendirilmektedir. Seminifer tübüllerde meydana gelen germ hücre apoptozisi, anormal spermatogeneze neden olmaktadır (3, 4, 9). Bununla birlikte Leydig hücrelerinde meydana gelen hücresel hasarlar, testosteron seviyelerinde

azalmayla sonuçlanmaktadır. Azalmış testosteron seviyeleri ve apoptozis, erkeklerde infertiliteye neden olabilmektedir (4, 7, 8).

Mitojenlerin aktive ettiği protein kinazlar (MAPK'lar); hücre proliferasyonu, hücre ölümü ve embriyogenezis ile ilgili birçok hücre sinyalinin düzenlenmesinde etkili olan bir protein grubudur. Çok hücreli organizmalarda MAPK'lar; c-Jun N-terminal kinaz (JNK veya stresin aktive ettiği protein kinazlar-SAPK), p38 MAPK ve ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK)'lar olarak 3 alt gruba ayrılmaktadır. JNK, hücre sitoplazmasından hücre nükleusuna; proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi sinyallerin iletilmesinde görev alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. JNK'nın inhibe edilmesiyle artmış apoptozis sinyallerinin önlenmesi, son yıllarda yapılan çalışmalarda kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (10-14).

Programlı hücre ölümü olan apoptozisin düzenlenmesindeki önemli yollardan biri de "endoplazmik retikulum (ER) stres"i ile aktive olmaktadır. ER; hücrelerde temel olarak protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde görev alan önemli bir organdır. ER'da üretilen proteinlerin katlanamaması ya da yanlış katlanması, bu proteinlerin ER lümeninde birikmesiyle sonuçlanır (15-17). ER lümeninde biriken bu proteinler, ER stresine neden olarak; C/EBP homolog protein (CHOP), JNK ve kaspaz 12 aracılığıyla apoptozisi tetiklemektedir (17).

Diyabete maruz kalan erkeklerin testis dokularındaki artan apoptozisin aydınlatılmasına ilişkin yapılan çalışmalara rağmen, bu çok bilinmeyenli denklemin tüm yönleriyle çözülmesi için, halen pek çok araştırmaya ihtiyaç olduğu görüşündeyiz. Bu noktadan hareketle; diyabetik erkek sıçanlarda, ER stresine bağlı olarak arttığını düşündüğümüz apoptozis mekanizması üzerine JNK inhibisyonunun etkilerini, anahtar bazı proteinler yönünden araştırarak, literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

DIABETES MELLİTUS

Diyabet, pankreas tarafından üretilen insülin hormonunun eksikliğinde veya hücrelerin üretilen insülini etkin bir şekilde kullanamadığı durumlarda ortaya çıkan kronik bir hastalıktır. Hiperglisemi ile karakterize olan diyabet; bozulmuş karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması ile seyrederek, dejeneratif komplikasyonlara neden olmaktadır (1, 2).

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), 2019 yılında yayınladığı son raporunda, diyabet prevalansının tahmin edilenden daha hızlı arttığını bildirmektedir. 2010 yılında yapılan tahminlerde, 2025 yılında 438 milyon insanın diyabetik olacağı öngörülürken, bu sayının 2019 yılı itibariyle aşıldığı son raporda sunulmuştur (2). Diyabet hastalığı ve komplikasyonlarının tedavisi, ülkeler için ciddi ekonomik maliyetlere sebep olan, önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Diyabetin hızla artan prevalansının altında yatan başlıca nedenler; nüfus artışı, çevresel faktörler, kentleşme, kötü beslenme alışkanlıkları ve fiziksel inaktivite sonucu ortaya çıkan obezite şeklinde sıralanabilir. Yapılan bazı çalışmalarda, diyabet başlangıcı tanısı konulmuş bireylerde, yaşam tarzında yapılan iyileştirmelerle Tip II diyabet gelişme riskinin %40-58 oranında azaldığı görülmüştür (1, 2). Diyabet, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından (1) şöyle sınıflandırılmıştır;

- Tip I Diyabet,
- Tip II Diyabet,
- Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM),
- Sekonder Diyabet veya Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet

Tip I Diyabet

Pankreasta bulunan ve insülin üreten β hücrelerinin, otoimmün yıkımı sonucunda ortaya çıkan ve çoğunlukla çocukluk döneminde tanı konulan diyabet tipidir. “Juvenil diyabet” olarak da bilinen Tip I diyabet, dünya istatistiklerine bakıldığında her yıl %3'lük bir yükselme grafiği çizmektedir. Diyabetik insanların %5-10'unu oluşturan tip I diyabetli bireyler, kanda biriken keton cisimciklerinden korunmak için dışarıdan insülin takviyesi almak zorundadırlar. Bu nedenle “insüline bağımlı DM” olarak da anılmaktadır (1, 2). Pankreas β hücre yıkımına neden olan ve otoimmün olmayan nedenler, tip I diyabeti kapsamaz (örneğin; mitokondrial hasarlar, kistik fibrozis vb gibi) (1).

Tip I diyabetin başlıca risk faktörleri arasında; genotip, cinsiyet, yaş, ırk, coğrafi konum bulunmaktadır. Halsizlik, ağız kuruluğu, sık idarara çıkmak, kilo kaybı ve bulanık görme gibi semptomlar ani olarak gözlenmeye başlar (18, 19). Tip I diyabet tanısı konmasında ise çinko taşıyıcı 8 (ZnT8), glutamik asit dekarboksilaz 65 (GAD65) otoantikoları, tirozin fosfataz bağı adacık antijen 2 (IA-2 ve IA-2 β) sıklıkla kullanılan belirteçlerdir (20, 21).

Tip II Diyabet

Pankreas β hücrelerinden salgılanan insülin eksikliği ya da insülin reseptörlerinde meydana gelen dirençten kaynaklanan diyabet tipidir. Hücre reseptörlerindeki direnç sebebiyle insülin, hücre içerisine alınamaz, sonuç olarak çevre dokularda insülin etkisi kısıtlanır.

Diğer diyabet tiplerinden daha sık görülür. Sağlıksız beslenme, hareketsizlik ve obezite gibi faktörler, tip II diyabet riskini artırır. Klinik teşhis için genellikle; kan şekeri, lipid, keton cisimcikleri ve bazı metabolitlerin ölçümü kullanılmaktadır. Klinik semptomları arasında görme bulanıklığı, kilo kaybı, sık idrara çıkma (poliüri) ve ketoasidoz görülmektedir (1).

Tip II diyabetin tedavisinde, insülin ihtiyacı karşılanmalıdır. Oral hipoglisemik ilaçlar, tedavide kullanılmaktadır. Ancak özellikle bu hastalarda eşlik eden obezite varsa, bu sorunun ortadan kaldırılması, tedaviyi olumlu yönde etkilemektedir (22, 23).

Tip II diyabet genellikle erişkin yaşlarda görülen bir diyabet tipidir, ancak tanı konulması oldukça güçtür. Diyabetin bilinen semptomlarının zor farkedilmesi ve insanların yıllık rutin kontrollerini aksatmaları sebebiyle, tüm dünyada tanı almamış birçok diyabet hastasının bulunduğunu bilinmektedir (18, 24).

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

Hipergliseminin bir formu olan gestasyonel diyabet, hamileliğin 24.-28. haftaları esnasında teşhis edilir ve glukoz tolerans bozukluğunun görüldüğü diyabet tipidir. Gestasyonel diyabet riskini arttıran faktörler arasında; 25 yaşından sonraki gebelikler, genetik yatkınlık ve eşlik eden obezite önemlidir (1, 2).

Sekonder Diyabet veya Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet

Tüm diyabet vakalarının %1'den az kısmını oluşturur. Genellikle 25 yaşından önce yüksek kan şekeri ile tanı konulmaktadır. Bu tip diyabetin ortaya çıkmasının altında yatan nedenler arasında; β hücrelerinin fonksiyonlarında ve insülin etkinliğindeki bazı genetik defektler, enfeksiyonlar, bazı ilaç ve kimyasal ajanlar bulunmaktadır (1, 2).

DENEYSEL DİYABET MODELLERİ

Diyabetin patogenezinin anlaşılması için pek çok araştırmacı, deney hayvanları (genellikle; fare, sıçan, tavşan, kobay ve maymun) üzerinde deneysel diyabet modelleri oluşturmak amacıyla çeşitli kimyasal ajanlar (streptozotosin, alloksan, çinko şelatörleri, rodentisid-vacor, diet nitrozaminleri vb) kullanmışlardır. Streptozotosin ve alloksan, en çok tercih edilen kimyasal ajanlardır. Bununla birlikte spontan olarak diyabet modelleri elde edilebildiği gibi, virüsler aracılığıyla da deneysel diyabet modelleri oluşturulmaktadır (25-27).

Streptomyces achromogenes tarafından sentezlenen streptozotosin; (STZ, 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose)) neoplastik ve diyabetojenik etkileri olan bir antibiyotik olup, deneysel diyabet modeli oluşturmak için sıklıkla tercih edilen kimyasal bir ajandır. STZ; nitrozüre analogu olmakla birlikte, lipofilik özelliği daha az olan bir maddedir. pH 4-4.5' da stabil olduğu için çözelti, pH'sı 4 olan sitrat tamponu içinde hazırlanmalı ve 20°C'de ışıktan korunarak saklanmalıdır. STZ, pankreas β hücreleri üzerinde toksik etkilidir. Yapısında bir glukoz molekülü bulunur ve bu molekül glukoreseptörlere bağlanarak, β hücrelerinin glukozu yanıtını ortadan kaldırır. Böylece insülin salınımı bloke edilmiş olur. Ayrıca STZ, hücre içinde reaktif karbonyum iyonları oluşturarak, DNA bazlarında alkilasyona neden olur. Böylece, DNA tamir mekanizması etkinleşir ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) depoları boşalarak, β hücrelerinde yetersiz adenozin trifosfat (ATP) sonucu nekroz görülür (27-29). STZ'nin deney hayvanlarında diyabetik etkiyi göstermesi üç fazlı bir biyokimyasal değişim ile gerçekleşir;

1) Geçici hiperglisemi evresi: STZ uygulamasını takiben azalan insülin seviyesinin, karaciğerde ani glikojen yıkımına neden olduğu evredir ve 2-4 saat süren bu fazda, plazmadaki insülin düzeyi düşüktür.

2) Şiddetli hipoglisemi evresi: β hücrelerinin nekrozu ile birlikte, fazla miktarda insülin kana geçer. Kandaki yüksek insülin düzeyi, kan glukoz seviyelerinde azalmaya ve sonuç olarak şiddetli hipoglisemiye neden olur. Bu evre, STZ uygulamasından yaklaşık 6 saat sonra başlar ve ilk 24 saat içindeki hipoglisemiye bağlı ölümler genellikle bu fazda meydana gelir. Deneysel diyabet oluşturulmak için kullanılan STZ'nin, deney hayvanları tok olduğunda enjeksiyonu önerilmektedir. Bunun sebebi; hayvanlar aç olduklarında zaten düşük kan glukoz seviyelerine sahipken, ortalama 6 saat sonra başlayacak şiddetli hipoglisemi sebebiyle, daha fazla denek kaybı yaşanması riskini ortadan kaldırmaktır.

3) Kalıcı hiperglisemi evresi: STZ uygulamasından yaklaşık olarak 10-12 saat sonra meydana gelen evredir. Bu evrede, plazma insülin düzeyleri düşüktür (27, 28).

Diyabetojenik ajanların 12-18 saatlik açlıktan sonra uygulanması, ikinci fazın daha şiddetli seyretmesini tetikleyebilmektedir (26). Faz II'nin şiddetli seyretmesini önlemek için ilk 24 saatte deneklere intraperitoneal (i.p.) şekerli su (%10-20 glukoz solüsyonu vb) takviye edilmesi ve yine ilk 24 saat, içme suyu içine %5 glukoz solüsyonu ilave edilmesi önerilmektedir (26, 30). Ek olarak; diyabetik ketoasidoz ve kilo kaybına bağlı olarak gerçekleşen ölümleri engellemek için, diyabetojenik ajanın uygulanmasını takiben, protamin çinko (31) ya da ultralente insülin (32) ajanlarının günlük 2 IU doz enjeksiyonu tavsiye edilmektedir.

Deney hayvanlarında, kimyasal maddeler kullanılarak oluşturulacak diyabet modellerinde toksik ve diyabetojenik dozlar birbirine çok yakın değerlerde olduğu için, kullanılacak deneğe uygun ideal dozun önceden belirlenmesi oldukça önemlidir. Fare ve sıçan için uygun doz aralıkları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Diyabet modeli oluşturmak için sıklıkla tercih edilen STZ dozları (27)

Deney Hayvanı	Tip I Diyabet (Erişkin)	Tip II Diyabet (Erişkin)
Sıçan	35-85 mg/kg tek doz i.v. 40 mg/kg tek doz i.m.	35 mg/kg tek doz i.p. 2 hafta süreli yağlı diyet
Fare	60-150mg/kg tek doz i.p	40 mg/kg tek doz i.p. 5 hafta süreli yağlı diyet

i.v., intavenoz, i.p., intraperitoneal.

TESTİS EMBRİYOLOJİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Genetik olarak embriyonun cinsiyeti fertilizasyon ile belirlenmiş olmasına rağmen, gonadal farklılaşma 7. haftaya kadar gerçekleşmemektedir. Gonad taslakları, epitel hücrelerinin proliferasyonu ve altında bulunan mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşur. Gelişimin 6. haftasına kadar gonad taslakları içerisinde germ hücreleri bulunmaz. Primordiyal germ hücreleri, epiblasttan köken alır ve 3. haftada vitellus kesesinin allantoise yakın olan arka duvarında belirirler. 4. haftada son barsak mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek, 5. haftanın başında gonad taslaklarına ulaşırlar. 6. haftada genital kabartı içerisine geçerek, orayı işgal etmeye başlarlar. Gonadların gelişebilmesi için; primordiyal germ hücrelerinin, gonad taslaklarına ulaşması gerekmektedir. Aksi halde gonadlar gelişemez. Primordiyal germ hücreleri gonad taslaklarına ulaştıklarında, gonad taslaklarının yüzeyini örten bazı epitel hücreleri, içteki mezenşime doğru proliferasyon olarak, primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar.

Embriyo genetik olarak XY kromozomuna sahipse; Y kromozomunun, X ile homolog olmayan bölgesinde bulunan SRY geni (Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyen bölge; Sex determining Region on chromosome Y) etkisi ile 7. haftada “primitif cinsiyet kordonları-meduller (testis) kordonları” meydana gelir. Daha sonra meduller kordonlar, ince şeritler halinde ağ benzeri bir yapıya dönüşerek “Rete testis”leri oluşturur. Gelişimin ileri evrelerinde, meduller kordonlar ile yüzey epiteli “Tunica albuginea” ile birbirinden ayrılır. Meduller kordonlar; primitif germ hücrelerini ve yüzey epitelinden farklılaşan Sertoli hücrelerini, primitif kordonların arasında bulunan bağ doku ise mezenşim hücrelerinden farklılaşan Leydig hücrelerini içerir. Embriyonal gelişimin 8. haftasında Leydig hücreleri testosteron sentezine başlayarak, genital kanalların ve dış genital organların erkek cinsiyeti yönünde gelişmesine neden olur. Meduller kordonlar puberteye kadar solid halde iken, pubertede lümenleri açılarak seminifer tübülleri oluştururlar. Kanalize olan seminifer tübülleri, rete testise ağızlanarak,

duktuli eferenteslere girerler. Mezonefrik kanallar, eferent duktusların hemen alt kısmından başlayarak, epididimisi meydana getirirler. Daha sonra epididimis, kuyruk kısmından itibaren kalın bir kas tabakası ile çevrelenmiş duktus deferensi oluşturur (33, 34).

Testisler; ekzokrin fonksiyon olarak spermleri, endokrin fonksiyon olarak da testosteron, inhibin ve aktivin gibi hormonları üretirler. Testisler dıştan içe doğru; tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza adı verilen fibröz bir kapsül ile çevrelenmiştir. Kapsülden testis içine doğru ince bir bağ dokusu uzanarak, testisi loblara ve lobüllere ayırır. Seminifer tübülleri de çevreleyen bu bağ dokusuna “interstisyel bağ doku” denir. Bu bağ dokuda; testosteron başta olmak üzere çeşitli androjenleri üreten poligonal şekilli Leydig hücreleri, kan damarları, lenf damarları, sinirler, makrofajlar ve mast hücreleri bulunur. Seminifer tübüllerin etrafında bulunan peritübüler doku, kollajen lifler ile birlikte bu lifleri oluşturan 3-5 tabaka myoid hücreden oluşmaktadır. Myoid hücrelerin ritmik kasılması ile lümende biriken sperm hücrelerinin, boşaltım kanallarına iletimi sağlanmaktadır (35).

Seminifer tübüller; yaklaşık 50 cm uzunluğunda, 150-250 µm çapında olup, peritübüler bağ doku ve seminifer epitelden meydana gelmektedir. Seminifer epitel temel olarak iki tip hücre ya da hücre topluluklarından meydana gelmektedir. Bunlar Sertoli hücreleri ve spermatogonik seri hücreleridir.

Sertoli hücreleri; puberteden sonra bölünme yeteneklerini kaybeden ve spermatogonik seri hücrelerinin korunmasını, desteklenmesini ve metabolize edilmesini sağlayan, uzun apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücreleri birbirleri ile bazolateral bölgelerinden, zonula okludensler ile bağlıdırlar. Bu şekilde seminifer epiteli, bazal ve adluminal kompartmanlara ayırırlar. Sertoli hücreleri bu şekilde, gelişmekte olan spermatogonik hücreleri otoimmün reaksiyonlardan ve çeşitli antijenik unsurlardan korumaktadırlar. Bununla birlikte Sertoli hücreleri, spermiyogenez sonucu oluşan atıkları fagosite ederek, atıkların birikmesini engellemektedir. Sertoli hücreleri; folikül-stimüle edici hormon (FSH) etkisi ile testosteron ve dihidrotestosterona yüksek bağlanma kapasitesi olan androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlerler. Ek olarak Sertoli hücreleri, inhibin salgılayarak, hipotalamus ve hipofiz üzerine negatif geri bildirim yaparken, sentezlediği aktivin ile pozitif geri bildirim yapmaktadır. Bu şekilde hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde, dengeleyici role sahiptirler (35).

Spermatogonik seri hücreleri; spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoadır. Spermatogonyum ile başlayan ve olgun sperm hücresinin oluşmasıyla sonlanan “spermatogenez” süreci boyunca oluşan hücrelerdir (35, 36).

SPERMATOGENEZ

Spermatogenez; erkek üreme ana hücrelerinden, olgun sperm hücrelerinin oluşumu ile sonlanan bir süreçtir. Spermatogenez, hipotalamuz-hipofiz-testis ekseninde bulunan çeşitli gonadotropinlerin ve steroid hormonların kontrolü altındadır.

Spermatogonyumlar, bazal laminanın hemen üzerine yerleşmiş olan diploid hücrelerdir. Sertoli hücreleri tarafından oluşturulmuş olan kan-testis bariyerinin alt kısmında, yani bazal kompartmanda bulunurlar. Spermatogonyumlar, puberte öncesi mitotik aktivite göstererek sayılarını çoğaltırlar. Spermatogonyumların mitotik aktiviteleri, prenatal dönemde başlar ve seminifer tübüllerde belirli bir yoğunluğa ulaşıncaya kadar devam eder. Belirli bir yoğunluğa ulaşan spermatogonyumların, mitotik aktiviteleri geçici olarak durur ve puberteyle birlikte mitotik aktivite tekrardan başlar. Spermatogonyumların mitoz bölünmesi sonucu, ya Tip A spermatogonyum ya da Tip B spermatogonyum oluşur. Tip A spermatogonyum, seminifer tübüllerde “kök hücre rezervi” olarak bulunurken, Tip B spermatogonyumlar mayoz bölünme geçirebilen hücrelerdir. Tip B spermatogonyumlar farklılaşarak, seminifer tübüllerdeki diğer hücrelerden nispeten daha büyük olan, primer spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositler diploid kromozoma (2n) sahip olup, oluşumlarını takiben 1. mayoz bölünmeyi geçirerek, haploid kromozomlu (n) sekonder spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler, oluşumlarından hemen sonra hızlı bir şekilde 2. mayoz bölünmeyi tamamlayıp yine haploid kromozomlu (n) spermatidleri oluşturduğu için, histolojik kesitlerde rastlanması zordur (37). İkinci mayoz bölünme sonucunda oluşan spermatidler, bölünme olmaksızın, sitomorfolojik bir değişim geçirerek, sperm hücresine dönüşürler. Bu dönüşüm olayına spermiyogenez adı verilir ve kabaca 3 fazda incelenebilir;

- **Golgi Fazı:** Spermatidlerde bulunan Golgi aygıtında biriken proakrozomal granüllerin, birleşerek tek bir akrozom vezikülü oluşturması sürecidir. Bu evrede sentriyoller, akrozom vezikülünün karşı kutbuna göç ederek, kamçı aksonemini oluşturmaya başlar.
- **Akrozom Fazı:** Golgi fazında oluşan akrozom vezikülü, hücre çekirdeğinin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılarak “akrozom” adını alır. Akrozomun içeriğinde; hyalüronidaz, asit fosfataz, nöraminidaz gibi hidrolitik enzimler bulunduğu için bu yapı, özelleşmiş bir lizozom gibi tanımlanabilmektedir. Bu enzimlerin fertilizasyon olayında görev yaptığı bilinmektedir. Bu evrede ayrıca; nükleus uzayarak yoğunlaşır, aksonem

lümene doğru uzayarak kamçıyı meydana getirir ve mitokondriler kamçının üst kısmı olan boyun bölgesine yerleşirler.

- **Olgunlaşma Fazı:** Sperm hücresi oluşurken geriye kalan sitoplazmik atıkların, Sertoli hücresi tarafından fagosite edilmesi sürecidir. Bu evrede ayrıca, “spermiasyon” adı verilen ve sperm hücresinin seminifer tübül lümenine atılması olayı gerçekleşir. İnsanda bir spermatogonyum, yaklaşık olarak 74 günde sperm halini almaktadır (37).

DİABETES MELLİTUS VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Diyabetin, erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği fikri, son yıllarda yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Bu çalışmalarda, diyabetin erkek üreme organları ve hormonal sistemde oluşturduğu hasarların, infertilite ile sonuçlanabileceği vurgulanmaktadır (3-5). 2018 yılında yapılan klinik bir çalışmanın sonucu olarak, tüp bebek merkezlerine gelen erkek hastaların infertilite yönünden araştırılmalarında, diyabetin göz önünde bulundurulmasının önemi vurgulanmıştır (38).

Yapılan çalışmalarda diyabetin birçok farklı yolla, erkek üreme potansiyelini azalttığı gösterilmiştir. Erkek bireylerde diyabetin klinik bulguları; retrograd ejakülasyon (39) libido azalması (40) ve erektil fonksiyonda ortaya çıkan problemler iken (41), laboratuvar bulgularının ise hormonal düzensizlikler, DNA hasarları, histopatolojik hasarlar, semen hacmi ve kalitesindeki düşüşe ek olarak, sperm sayı ve hareketliliğinde azalmanın olduğunu belirtilmiştir (3, 42, 43). Spermatogenezin sürekliliği, Sertoli hücrelerinin spermatogenik seri hücrelerini metabolize etmesi ile doğrudan ilişkilidir. Spermatogenik seri hücreleri, glukozu doğrudan metabolize edemezken, Sertoli hücreleri tarafından glukozun laktata dönüştürülmesi gerekmektedir. Dolayısıyla, glukoz ve/veya insülin dalgalanmaları spermatogenik seri hücrelerinin gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (44). Bununla birlikte hipergliseminin, gonadotropin releasing hormon (GnRH) stimülasyonunda bir duyarsızlık oluşturarak, anormal geri bildirimlerin meydana gelmesine neden olduğu rapor edilmiştir (45). Ayrıca yapılan pek çok çalışmada, diyabetin “hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde” değişiklikler meydana getirerek, folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve testosteron düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (42, 46-48).

Hipergliseminin pek çok komplikasyonunun altında yatan nedenlerden birinin, uyarılan reaktif oksijen türevleri (ROS) ve bunların birikimi sonucunda oluşan “oksidatif stres” olduğu bilinmektedir (49). Hücrede biriken ROS’ların, programlı hücre ölümü olan “apoptozis”

mekanizmasını aktive ettiği gibi, sperm hücreleri için de toksik etkiye sahip olduğu, ek olarak insan sperminin, oksidatif strese karşı son derece duyarlı olduğu vurgulanmıştır (50). Ayrıca insülin direncinin gelişmesinde de ROS'ların önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir (51).

Diyabetin önemli histopatolojik hasarlara neden olduğu ve bunun infertiliteyle sonuçlanabileceği yapılan çalışmalarda sıklıkla vurgulanmıştır (5-9). Bu çalışmalarda diyabetin testis dokusunda meydana getirdiği histolojik değişimler;

- Atrofik tübül sayısı ve apoptotik hücre sayısında artış,
- Hücresel dejenerasyon,
- Germinal epitel düzensizliği,
- Bazal membran kalınlığında ve interstisyel alan hacminde artış,
- Vakuolizasyon ve vaskülarizasyonda artış,
- Sperm sayısında azalma,
- Çok nükleuslu dev hücrelerin ortaya çıkması,
- Tübül lümeninde germinal epitele ait hücrelerin görülmesi şeklinde özetlenebilir (5-9).

Tüm bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda; dünyada prevelansının hızla arttığı bilinen diyabetin etkisi ile erkek bireylerdeki fertilité potansiyelinin de hızla azalacağı düşünülebilir. Son yıllarda yapılan çalışmaların, diyabet etkisi ile artış gösteren apoptozis mekanizmasının engellenmesi üzerine yoğunlaştığı ve bu şekilde diyabetin üreme potansiyeli üzerindeki olumsuz etkisinin azaltılmasının hedeflendiği görülmektedir (5-9).

APOPTOZİS

Programlı hücre ölümü olan apoptozis; embriyonik dönemden itibaren yaşam boyu devam eden, organizmadaki sistemlere ait dokuların sürekliliğini sağlayan karmaşık bir süreçtir. Organizmanın gelişiminde mitoz ve apoptozis arasındaki denge oldukça önemlidir (52, 53). Örneğin; karaciğerde yaşam boyunca dejenerasyon ve nekroz görülmesine rağmen büyüklüğünün sabit tutulması, apoptozis ve mitoz arasındaki ilişki ile açıklanabilmektedir. Apoptozis, yaşam boyunca fizyolojik ve patolojik olarak görülebilmektedir. Embriyonun gelişimi esnasında yapışık olan parmakların birbirinden ayrılması fizyolojik apoptozis ile açıklanırken, radyasyon maruziyeti, kemoterapötik ilaçların etkisi, diyabet hastalığı gibi nedenlerle tetiklenen oksidatif stres ve ER stresinin neden olduğu apoptozis, patolojik olarak gerçekleşir (54).

Karmaşık moleküler mekanizmalara sahip olan apoptozisin düzenlenmesinde; intrinsek ve ekstrinsek sinyal yolları rol oynamaktadır (55).

İntrensek (Mitokondriyal) Yol

Bu tip apoptoziste reseptör olan uyaranlar bulunmaz ve bu uyaranlar, sinyaller aracılığıyla hücre içerisinde bulunan bazı hedeflerle etkileşim kurarlar. Bazı büyüme faktörlerinin yokluğu, şiddetli hücre hasarları, radyasyon, toksik maddeler ve bazı virüs kaynaklı enfeksiyonlar, mitokondrideki geçiş porlarının açılmasına ve mitokondride bulunan proapoptotik proteinlerin sitoplazmaya geçmesine neden olabilmektedirler. Bu proapoptotik proteinler (Sitokrom C, apoptozis indükleyici faktör (AIF), kaspaz aktifleştirici deoksiribonükleaz (CAD) ve endonükleaz G), sitoplazmaya geçtiklerinde apoptozis aktive edici faktörlerin etkin olmasını sağlayarak, hücrenin ölümüne neden olurlar (52, 55).

Ekstresek Yol

Apoptozisi, hücre zarında bulunan reseptör-ligand (TNF- α /TNFR1, FasL/FasR, Apo2L/DR4 Apo2L/DR5 ve Apo3L/DR3) etkileşimleriyle başlatılır. Bu sinyal yolunda, tümör nekroz faktör (TNF) reseptör protein ailesinin üyeleri bulunmaktadır. Bu proteinler; sitoplazmada kendilerine ait domainler bulundurur ve bu domainler hücre zarından, hücre sitoplazmasında bulunan kaspaz proteinlerinin aktifleşmesine neden olurlar. Kaspaz proteinleri (özellikle kaspaz 3), hücredeki yapısal proteinlerin parçalanmasına neden olarak hücreyi ölüme götürmektedir (56, 57).

ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Endoplazmik retikulum; ökaryot hücrelerde protein, yağ ve steroid metabolizmasında rol oynayan önemli bir organdır. ER, üzerinde ribozom bulunduran, granüllü [rough endoplasmic reticulum (RER)] ve ribozom bulundurmayan, granülsüz [smooth endoplasmic reticulum (SER)] olarak iki farklı tipte olabilmektedir. RER ve SER'in sayısı, yapısı ve konumu, hücrenin tipine ve fizyolojik özelliğine göre değişebilmektedir. SER, hücrenin Ca⁺² dengesinin sağlanmasına ek olarak, lipid ve karbonhidrat metabolizmasını regüle ederken; üzerinde ribozom taşıyan RER, primer yapıda üretilen ve RER'in sisternasına aktarılan proteinlerin, sekonder ve tersiyer yapılarını düzenler (58). Yeni üretilen bir protein primer yapıda olup, düz polipeptid zincirler halindedir. Bu düz polipeptid zincirler; RER sisternalarında N-glikozilasyon ile hidrofilik özellik kazanırlar. Bununla birlikte, proteinlerin etrafı bir oligosakkarid ile çevrelenerek, diğer proteinlerle ilişkileri engellenmiş olur. Bu olaylar, bazı katlanma enzimleri

ve şaperon proteinleri ile meydana gelir. ER’de bulunan bazı önemli şaperon ve katlanma enzimleri şunlardır:

- Glukoz regüle edici protein-78 (GRP-78)
- Lektin şaperonlar (Kalneksin, kalretikulin)
- Protein disülfid izomeraz ailesine ait oksidoredüktazlar (59).

Eğer protein katlanma işlemi doğru bir şekilde gerçekleştiyse, proteinler Golgi aygıtına transfer edilirler. Eğer proteinler doğru bir şekilde katlanamamışsa, bu proteinler GRP78 gibi şaperonlar ile tanımlanır ve tekrardan katlanma sürecine girerler. Tekrar katlama işlemi de olumsuz sonuçlanırsa proteinler, ER-ilişkili degradasyon mekanizması [endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD)] aracılığı ile ER’den çıkartılırlar (59).

ER stresi, proteinlerde katlanma esnasında meydana gelen hatalar ya da katlanmamış protein birikimi ile oluşmaktadır. ER stresi oluşmuş bir hücre, yeni proteinlerin sentezini azaltarak, ER kapasitesini artırır ya da apoptozis ile belirli ölüm sinyalleri oluşturarak bu stresi sonlandırabilmektedir (15, 16). ER membranında stres algılayıcı üç temel protein bulunmaktadır. Bunlar;

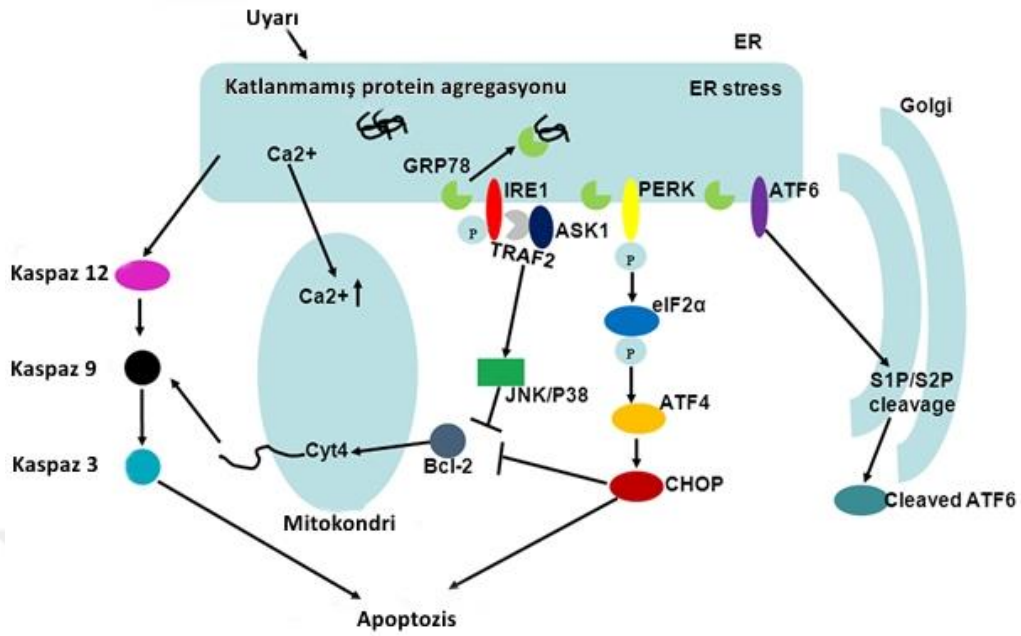
- Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK),
- Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)
- İnositol gerektiren enzim-1 [inositol requiring enzyme-1 (IRE-1)]’dir (17).

Hücre; oluşan ER stresi ile başa çıkmak için, önemli bir yolak olan “protein kinaz RNA (PKR) benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK)” yolağını devreye sokar. PERK, stres altındaki endoplazmik retikuluma yeni proteinlerin girişini engelleyen bir transkripsiyon faktörüdür. PERK fosforilasyonu sonucunda, ökaryotik başlatıcı faktör α [eukaryotic initiation factor 2 α] (eIF2 α) aktive edilir. Aktive olan eIF2 α , ER kapasitesini arttırırken, aynı zamanda “aktive edici transkripsiyon faktörü-4 (ATF-4)” adı verilen proteinlerin sentezini de indükler. ATF-4, ER şaperon proteinlerinin ve katlanmamış protein yanıtı [unfolded protein response (UPR)] genlerinin transkripsiyonunu sağlamaktadır. Aynı zamanda ATF-4, cAMP yanıt elemanına (cAMP response element, CRE) bağlanarak hücresel stres, oksidatif stres ve apoptozisten sorumlu genlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Apoptozisten sorumlu olan bu genlerden en iyi bilineni “CCAAT arttırıcı bağlayıcı protein (C/EBP homolog protein, CHOP)” genidir. CHOP sinyalleri; eIF2 α ’yı defosforile ederek, ER protein yükünün artmasına ve

hücrelerin apoptozise girmelerine neden olmaktadır. ER stresiyle indüklenen apoptozis; transkripsiyon faktörleri (CHOP), Bcl-2 ailesinin üyeleri, c-jun terminal kinase (JNK) ve kaspazlar (kaspaz 3,9 ve 12) aracılığı ile meydana gelmektedir (15-17).

İnsanlarda, ATF6 α ve ATF6 β olmak üzere iki alt tipe bulunabilen ve ER içerisinde GRP-78'e bağlı olan ATF6, tip 2 transmembran proteindir. ER stresi gerçekleştiğinde ATF6, GRP-78'den ayrılarak, Golgi aygıtına geçmektedir. Golgi aygıtına geçen ATF6, orada bulunan proteazlar ile kesilerek, aktive olmaktadır. Kesilen ATF6, bir transkripsiyon faktörü haline gelir ve nükleusa geçerek, apoptozu düzenler. Bununla birlikte ATF6, bazı şaperonların ekspresyonunu arttırmaktadır. Böylece ATF6, ER'de strese neden olan, hatalı katlanmış ve katlanmamış proteinlerin birikimini de azaltabilmektedir (15-17).

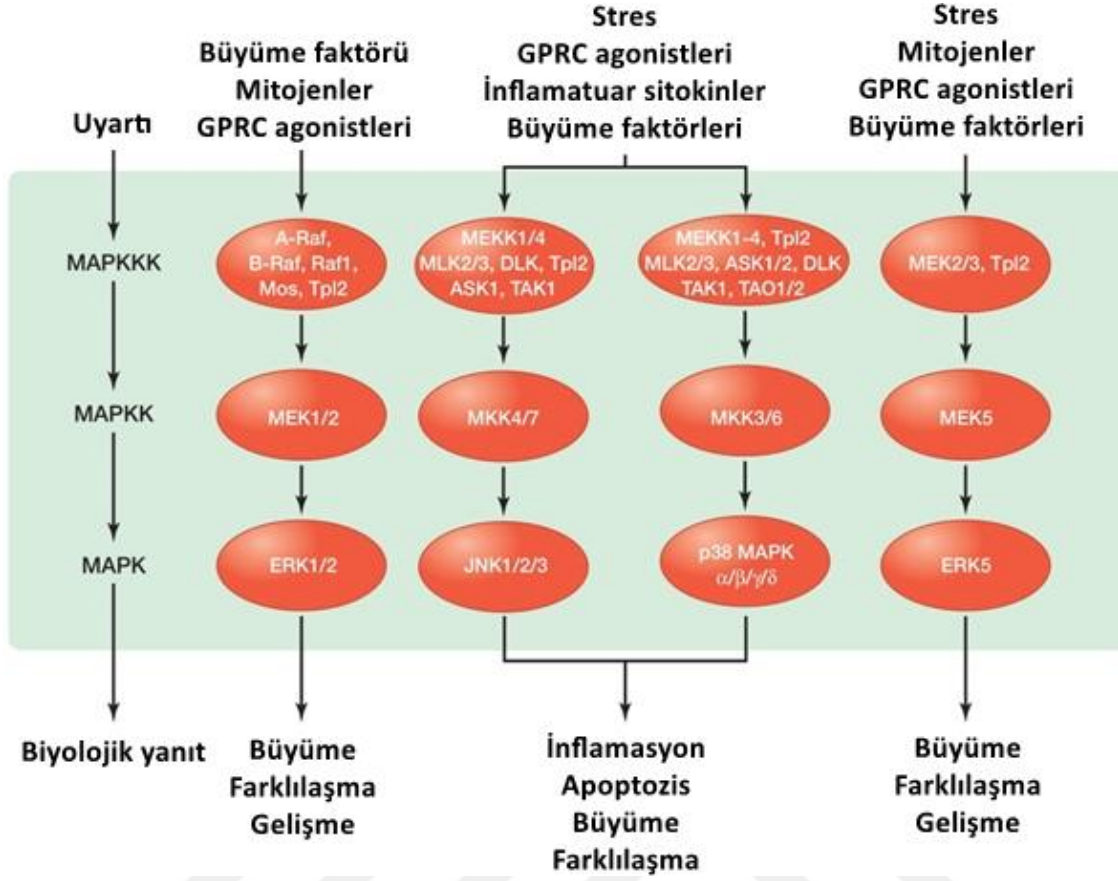
Hücreyi stresten koruyan, endoribonükleaz (RNaz) aktivitesine sahip IRE-1, insanlarda IRE-1 α ve IRE-1 β olmak üzere iki forma sahiptir. ER membranında lokalize olan IRE-1 α ve IRE-1 β , stres sinyallerini aktive ederek, iletirler. IRE-1, hücre stres altında değilken GRP-78 ile birlikte ve inaktiftir. ER stresi sırasında GRP-78, IRE-1'den ayrılır ve IRE-1 dimerize olup, fosforillenerek aktif duruma geçer. Aktifleşen IRE-1, X-box bağlayıcı protein 1 [X-box binding protein 1 (XBP1)]'i keserek, kırılmasına neden olur. Kırılmış XBP1 (XBP1-splice, XBP1s), nükleusa geçerek, ER şaperonlarını ve katlanmaya yardımcı olan enzimleri regüle eder. Ayrıca IRE-1; mRNA degradasyonunu sağlayarak, ER'deki protein yükünü azaltır ve bu şekilde, ER stresinin azalmasına ya da ortadan kaldırılmasına katkı sağlar. IRE-1 α , aynı zamanda tümör nekroz faktör reseptör ilişkili faktör 2 [tumour necrosis factor receptor associated factor 2 (TRAF2)]'ye bağlanarak, JNK yolağını aktive etmektedir. JNK yolağı, kaspaz 12'nin aktivasyonu ve Bcl-2'yi inhibe ederek apoptozise neden olmaktadır (15-17).



Şekil 1. Endoplazmik retikulum stresi (60).

JNK ETKİNLİĞİ

Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler) ailesinin bir üyesi olan JNK; reseptör olmayan serin-treonin kinazların önemli bir alt ailesidir. JNK; hormonlar, ozmotik stres, oksidatif stres, proinflamatuvar sitokinler gibi uyarılara ve hücrel tepkilerde yer alan sinyal iletim yollarına aracılık eder. JNK ayrıca; proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrel olayların düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (61). JNK genlerinin 10 farklı izoform ürettiği bilinmektedir. JNK1 ve JNK2 tüm hücrelerde ifade edilirken, JNK3; beyin, testis, kalp ve pankreas gibi belirli organlara ait hücrelerde ifade edilmektedir. Kısa süreli JNK aktivitesi proliferasyonda etkili iken, JNK'nın uzun süreli aktivasyonu apoptozisi tetiklemektedir (62). MAPK sinyal yolu, hücre içi ya da hücre dışı bir uyarın ile etkinleştirildiğinde, ilk olarak, MAP3K'ler Serin (Ser) / Treonin (Thr) fosforilasyonu ile MAP2K'leri etkinleştirir. Ardından da MAP2K'ler Tironin (Thr) / Tirozin (Tyr) fosforilasyonu ile MAPK aktivasyonlarını başlatır ve böylece etkin bir şekilde hücre dışı ya da hücre içi bir uyarana uygun bir hücrel cevap verilmiş olur. JNK, MAPK / JNK sinyal yolu üzerindeki son protein kinaz olduğu için bu sinyal yolağındaki p38 ve ERK1 / 2 gibi efektör proteinlerden biri olarak kabul edilir (63).

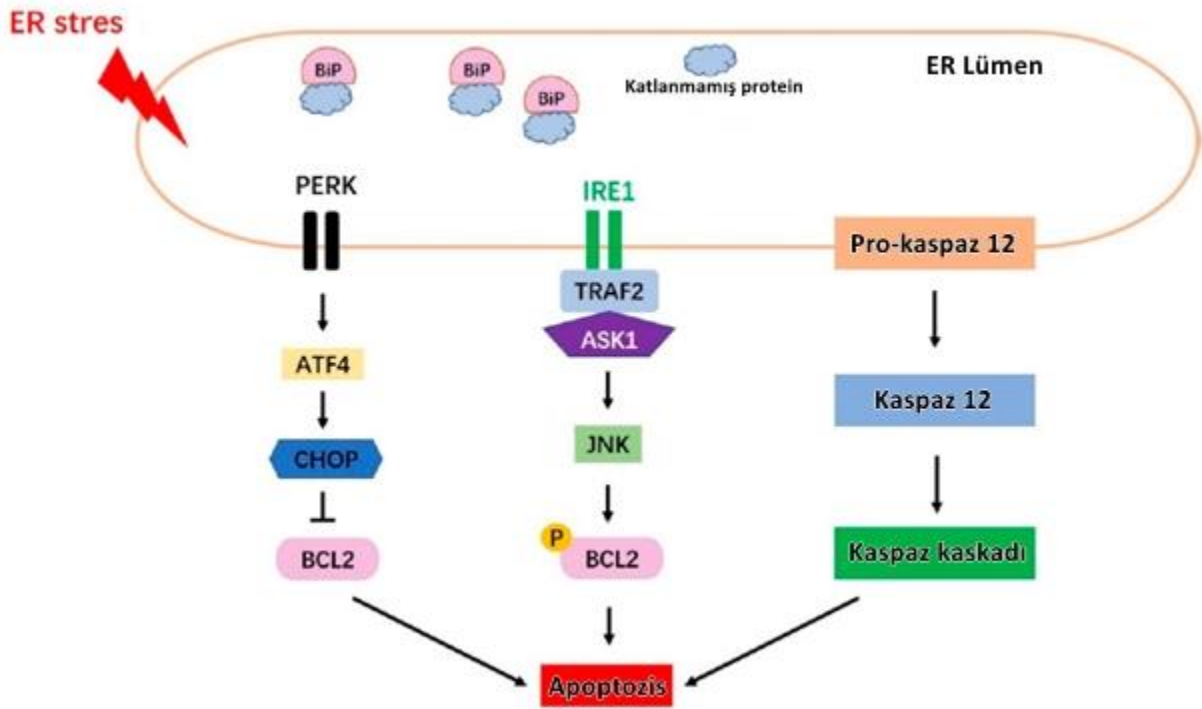


Şekil 2. Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz sinyal yolağı (63).

JNK, intrinsek apoptozis yolunda doğrudan yer almaktadır. JNK'nın oksidatif stres ile aktivasyonu, sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımına neden olduğu ve bunun da, kaspaz aktivasyonu ile sonlandığı bilinmektedir (64). Kronik hiperglisemi ile oluşan oksidatif stresin, diyabete bağlı komplikasyonlara neden olduğu bilinmektedir. Yapılan pek çok çalışmada bu komplikasyonların gelişmesinde MAPK/JNK yolağının rol oynayabileceği gösterilmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kalan retina endotel hücrelerinde, artan oksidatif stres ile birlikte JNK aktivasyonunun arttığı (65, 66), böbreğin glomerüler hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyona neden olarak, diyabetik nefropatinin gelişmesinde rol oynadığı saptanmıştır (67, 68). Damar endotel (69) ve düz kas hücrelerinde (70) JNK aktivasyonunun, proinflamatuar sitokin salınımını tetikleyerek kan damarlarında plak oluşumunu teşvik edebildiği (71), kardiyak miyositlerde indüklenen oksidatif strese bağlı apoptoziste, JNK aktivasyonunun rol oynayabileceği gösterilmiştir (72).

JNK aracılı apoptozis, oksidatif stres ile gerçekleşebildiği gibi, ER stresi ile de tetiklenebilmektedir. Kronik hiperglisemi ile indüklenen oksidatif stres, aşırı kalsiyum salınımı tetikler ve ER homeostazını bozar. Bu şekilde ER stresine neden olarak, apoptotik yolların

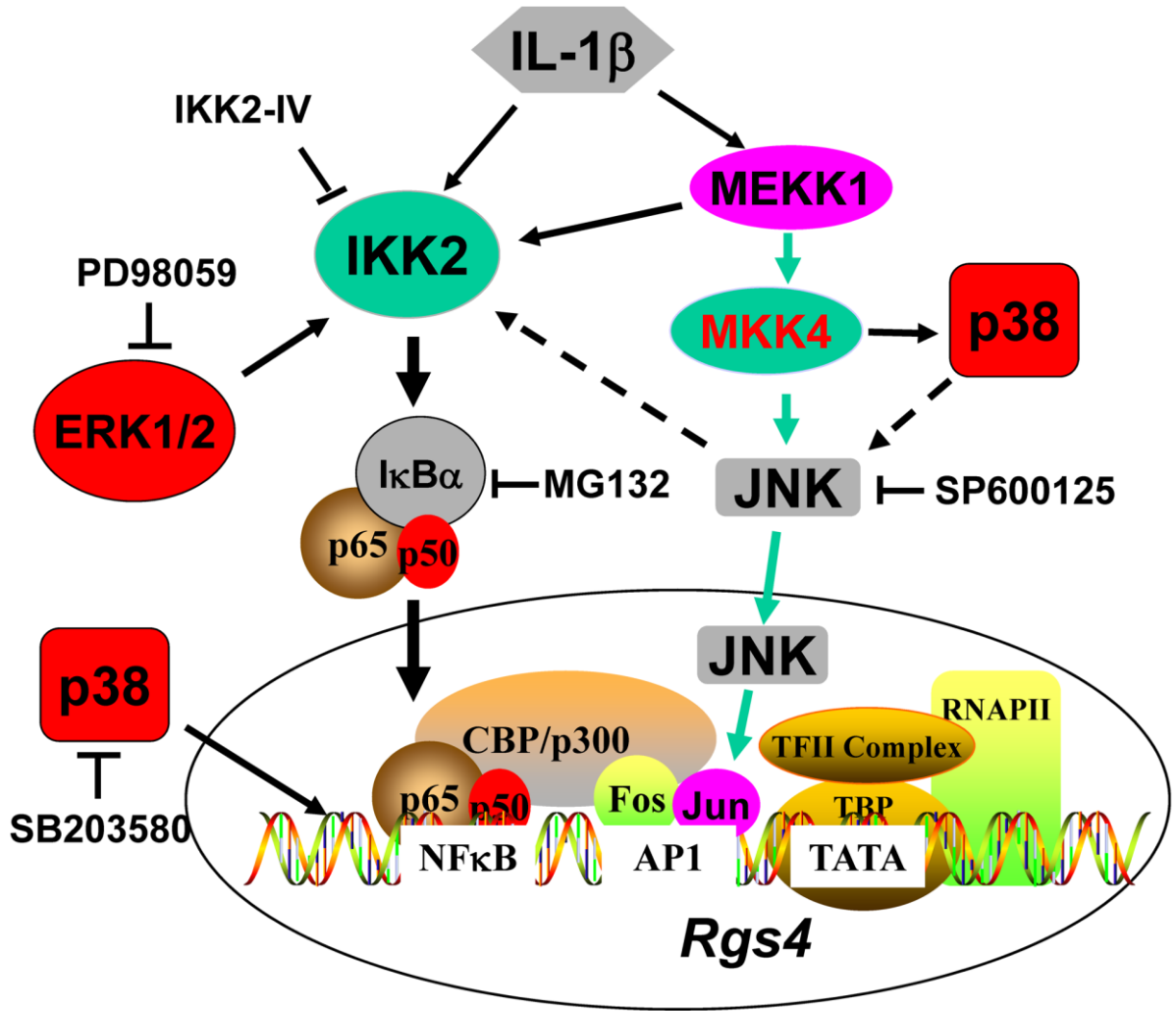
aktive edilmesine neden olur (73). Bununla birlikte; hücrelerde oluşan oksidatif stres, yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesine neden olarak, ER stresinin tetiklenmesini sağlamaktadır. ER stresi ile indüklenen hücre, sorunu çözmek için unfolded protein response (UPR) yolaklarını aktive eder. Eğer sorun çözülemeyecek kadar büyükse ve stres giderilemiyorsa CHOP, JNK ve kaspaz-12 aktivasyonları ile apoptozis indüklenmektedir (17, 74).



Şekil 3. Endoplazmik retikulum stresi ve apoptozis (17).

JNK İNHİBİSYONU

JNK'nın inhibisyonu; JNK genlerinin susturulmasıyla yapılabildiği gibi, CEP-1347, SP600125 veya çeşitli peptit inhibitörleri (aminopirazoller, aminopiridinler, aminopirimidinler, indazoller, piridin karboksamidler, benzotiyen-2-ilamidler ve benzotiazol-asetonitriller) kullanılarak, kimyasal olarak da gerçekleştirilebilmektedir (75). JNK etkinliği ve buna bağlı olarak gelişen pek çok hücreyel olayı araştırmak için JNK inhibitörleri sıklıkla kullanılmaktadır (10-12). Yapı taşını antrapirazolonun oluşturduğu SP600125 (anthra[1,9]pyrazol-6(2H)-one); JNK ile katalitik aktivite gösteren bir maddedir (13, 14). SP600125; JNK'nın ATP bağlanma bölgelerine yüksek afinite göstererek, spesifik ve geri dönüşümlü bir etkileşime girer (76).

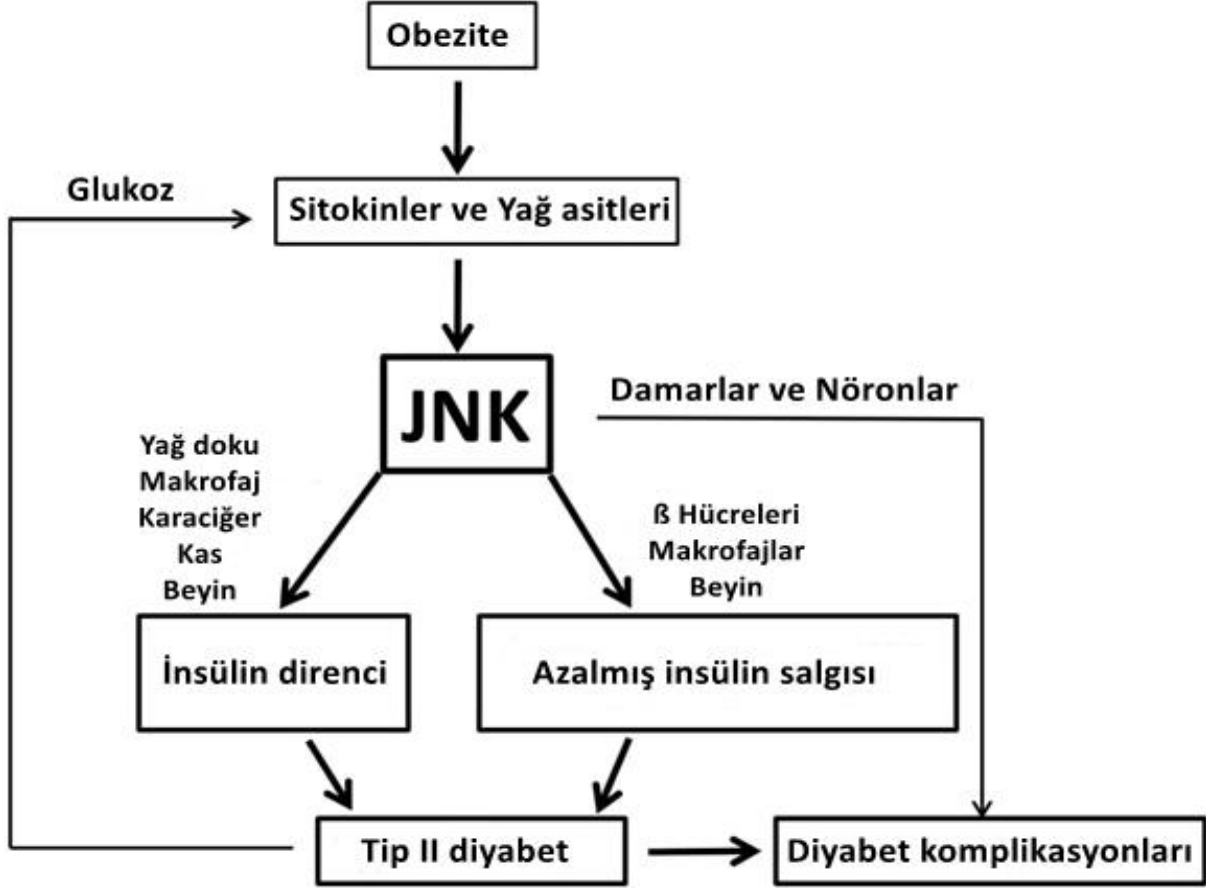


Şekil 4. JNK İnhibisyonu (77)

Artan JNK aktivasyonunun; insülin direnci (78) ve insülin biyosentezi (79) üzerine olumsuz etkiler yaparak tip II diyabetin gelişmesine, inflamatuvar sitokin artışını sağlayarak da β hücrelerinin tahribatına neden olduğu bilinmektedir (80). Tip II diyabetin insülin direnci veya insülin yetersizliği ile oluştuğu, tip I diyabetin ise pankreastaki β hücrelerinin otoimmün yıkımı ile oluştuğu göz önüne alındığında, JNK inhibisyonunun tip II (78, 79) ve tip I (80, 81) diyabetin erken tedavisinde kullanılabileceği düşünülebilir.

Bu nedenle yapılan çalışmalar JNK'nın kimyasal ya da genetik inhibisyonu üzerine yoğunlaşmıştır (78, 79, 81). JNK'nın obezite ve diyabet gibi metabolik hastalıklarda yeni bir terapötik hedef olabileceği yönündeki tahminler gün geçtikçe güçlenmektedir (62, 75, 78, 79, 81) JNK, normal fizyolojik süreçlerde farklılaşma ve hücre çoğalması işlevlerinden sorumlu olabileceği gibi, plazmada aşırı yağ asidi, glukoz ve inflamatuvar sitokinlerin bulunduğu

anormal koşullarda, artan hücre ölümlerine ve hücre sekresyonlarında azalma gibi olumsuz koşulların meydana gelmesine neden olabilmektedir (62, 82).



Şekil 5. Obezite, diyabet ve JNK ilişkisi (62)

Çeşitli patolojilerin engellenmesine yönelik çalışmalarda JNK inhibisyonunun oldukça etkili olabileceği yapılan önceki çalışmalarda görülmüştür. Yüksek yağlı diyet ile beslenen deneklerin hipotalamusunda artan insülin direncine karşı SP600125'in koruyucu etkilerinin olduğu (62), parkinson modelinde apoptozisin baskınlanmasında kullanılabileceği (83), JNK genlerinin susturulması ile diyabetin neden olduğu yüksek kan glukoz düzeylerinin kontrol altına alınabileceğini (84) ve diyabetin neden olduğu kilo kayıplarının JNK inhibisyonu ile önlenebileceği (85) bildirilmiştir. Ek olarak; JNK inhibisyonunun aort duvarındaki histopatolojik değişikliklerin oluşumunu engellendiği (86), diyabetik nefropatideki olumlu etkileri nedeniyle JNK inhibitörlerinin diyabetik nefropatide yeni bir terapötik ajan olabileceği (87), miyokardiyal iskemi reperfüzyon (88) ve sepsis modelinde (89) JNK inhibisyonunun ER stresine karşı koruyucu olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunulan çalışmamız için 2018.03.06 nolu karar ile onay alınmıştır (Ek 1). Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi destek için başvurulmuş ve 2018/162 no'lu proje olarak desteklenmesine karar verilmiştir. Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden, 3 aylık, ağırlıkları 250–350 gr arasında değişen 27 adet *Sprague Dawley* erkek sıçan temin edilmiştir. Biyolojik ve fizyolojik olarak aynı özelliklere sahip olan deneklerimizden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde; kontrol grubu (n=9), diyabet grubu (n=9) ve JNK inhibitörü verilen grup (n=9) olmak üzere 3 farklı grup oluşturulmuştur. 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 streptozotosin (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, yaklaşık 10 dakika içinde deneklere uygulanmıştır. Deneklerimizden;

C grubu: Kontrol grubu, pH'sı 4,2 olan 0,1M'lık sitrat tamponu verilen grup (n=9),

D grubu: Diyabet grubu, tek doz 50 mg/kg STZ (pH' sı 4,2 olan; 0,1M' lık sitrat tamponunda çözümlenerek) verilen grup (n=9),

I grubu: İnhibisyon grubu, tek doz 50 mg/ kg STZ intraperitoneal (i.p.) (pH'sı 4,2 olan; 0,1M' lık sitrat tamponunda çözülmüş) verilerek diyabet oluşturulduktan sonra, JNK inhibitörü

olan SP600125'in zeytinyağında çözülerek, i.p. 15 mg/kg 4 gün boyunca günde 1 kez verildikten sonra, 30. günde sakrifiye edilen grup (n=9) oluşturulmuştur (90).

Deneklerin kan glukoz düzeyleri; deney başlangıcında, STZ verilmesini takiben 2. gün, 15. gün ve sakrifikasyon günü olan 30.günlerde, kuyruk veninden alınan kan örneklerinde, glukometre (IME-DC, Hof, Almanya) ile ölçülmüştür. STZ uygulandıktan sonra, kan glukoz değerleri 250 mg/dl'nin üzerinde olan denekler "diyabetik" olarak kabul edilmiştir (91).

Vücut ağırlıkları deney başlangıcında ve sonunda ölçülmüştür. Tüm deneklerin, planlanan bir aylık deney süresinin sonunda, ketasol (Richterpharma, Viyana, Avusturya) ve basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında, total olarak sağ ve sol testisleri çıkarılmış, ağırlıkları ölçüldükten sonra, ışık mikroskopik, immünohistokimyasal ve western blot çalışmaları için rutin işlemlere tabi tutulmuşlardır.

IŞIK MİKROSKOBİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Testis doku örnekleri, ışık mikroskopik rutin boyamalar ve immünohistokimyasal incelemeler için; %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 hematoksilin+eozin (H-E) boyası uygulanmıştır. Entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirildikten sonra, Olympus BX-51 mikroskopunda 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 farklı alandaki, 10 tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirilmiştir (92).

Seminifer tübüllerde meydana gelen hasarı saptamak için, testis dokusunda 1970 yılından beri kullanılan Johnsen skorlaması, günümüzde de geçerliliğini koruyan bir yöntemdir (93). Johnsen skorlama işlemi; her bir deneğe ait H-E ile boyanmış preparatlarda, Olympus BX51 marka mikroskopun X400'lük büyütmesi kullanılarak, 10 farklı sahada rastgele seçilmiş 10 seminifer tübül ile gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme kriterleri Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Johnsen skoru değerlendirmesi (93)

Skor 1	Seminifer tübüllerde hücre yok
Skor 2	Spermatogenik hücreler yok, yalnızca Sertoli hücreleri var
Skor 3	Sadece spermatogonyumlar var
Skor 4	Spermatid yok, sadece birkaç tane spermatozoid var
Skor 5	Spermatid yok; ancak spermatozoidler var
Skor 6	Sperm yok, az spermatid mevcut
Skor 7	Bol spermatid mevcut; ancak sperm yok
Skor 8	Germinal epitel çok sıralı; ancak lümende 10'dan az sayıda sperm var
Skor 9	Germinal epitelde çok sıralı; ancak düzgün olmayan görünüm mevcut, lümende obliterasyona yol açan hücre dökülmesi var
Skor 10	çok sıralı, bol spermatozoa ve santralde açık lümen içeren tübüller var

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; İnvitrogen Kaliforniya, ABD) kaynatılmıştır. Sonrasında kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için H₂O₂ (Abcam, Cambridge, ABD)'ye maruz bırakılmışlardır. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikorun üretildiği tre uygun bloklama solusyonunda (İnvitrogen) 10 dk. inkübe edilen kesitler, oda sıcaklığında, antikor dile etme solüsyonuyla (İnvitrogen) hazırlanan; tavşan poliklonal kaspaz 3 (1/300 dilüsyonda; Novus Biologicals, ABD), tavşan poliklonal fosfo(f)-JNK (1/100 dilüsyonda; Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD), tavşan poliklonal kaspaz 12 (1/500 dilüsyonda; Merck Millipore) ve tavşan poliklonal CHOP (1/300 dilüsyonda; Novus Biologicals) antikorlarında +4 °C'de bir gece inkübe edilmişlerdir. Primer antikorun üretildiği tre karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (İnvitrogen) 10 dk. oda ısısında tutulmuş ve son olarak HRP-streptavidin (İnvitrogen) ile 10 dk muamele edilmişlerdir. DAB (İnvitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilen zıt boyaması yapılmış ve entellanla kapatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar BX-51 Olympus marka araştırma mikroskopunda incelenerek, fotoğrafları çekilmiştir.

Tüm immünreaktivite değerlendirmeleri; X200 ve X400 objektifler kullanılarak, kesitlerin hangi grup deneğe ait olduğunu bilen ve bilmeyen birer araştırıcı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Kaspaz 3 ve kaspaz 12 immünreaktivite; X200 objektif kullanılarak, her preparattaki 5 farklı alanda bulunan ortalama 1000 seminifer tübül hücresindeki immünpozitif hücre sayılarına göre skorlanmıştır.

f-JNK ve CHOP immünreaktivite değerlendirmeleri; her bir hayvana ait testis kesitinde, rastgele 5 alan seçilerek, X400 büyütme kullanılarak “Histolojik skorlama” (HSCORE) yöntemi ile değerlendirilmiştir. HSCORE, kesitlerde immünoreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi (Pi) 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 $HSCORE = \sum P_i (i+1)$, (i; yoğunluk skoru, Pi; hücre yüzdesi) formülü ile hesaplanmıştır.

Kaspaz 3 ve f-JNK immünohistokimya skor sonuçları haricindeki, tüm diğer immünreaktivite sonuçlarımız, bulgular kısmında sadece fotoğraf olarak verilmiştir. Buna ek olarak western blot sonuçlarımız, β aktin bant dansite değerleri ile normalize edildikten sonra, elde edilen yoğunluk grafikleriyle desteklenmiştir.

Western Blot Protokolü

Testis doku örnekleri, alındıktan sonra tartılmış ve elde edilen dokuların ağırlıkları kayıt edilmiştir. Örnekler ağırlıklarına uygun miktarda, proteaz ve fosfataz inhibitör içeren doku ekstraksiyon tamponu (RIPA Lysis Buffer, ChemCruz, 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, 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) yürütülen örnekler, iBlot 2 Gel Transfer cihazı (Life Technologies Inc) kullanılarak nitrocelülöz membrana (İnvitrogen) transfer edildikten sonra, membran iBind™ Flex Western Device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak, tavşan poliklonal kaspaz-12 (1:1000 dilüsyonda, Abcam), tavşan poliklonal CHOP (1:500 dilüsyonda, Novus Biologicals) ve tavşan poliklonal

β aktin (1:10000 dilüsyonda, Novus Biological) antikorları ile 2 saat inkübe edilmiştir. Tüm antikorlar, iBind Flex solution kit (Thermo Fisher Scientific) içinde hazır bulunan yıkama solüsyonu ile dilüe edilmiştir. Sonrasında membranlar, kit içindeki yıkama solüsyonunda 3 kez 5'er dk yıkanarak, görüntü alma aşaması için hazır hale getirilmiştir. Kemiluminesans (SuperSignal West Pico Plus, Thermo Scientific) ile 5 dk muamele edilen membranların, TÛTAGEM'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 ve her membranda yer alan örnekler β aktin antikoruyla muamale edilerek normalize edilmiştir.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan hizmet alınmış (SPSS 20.0 programı Lisans no: 10240642) ve değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. Gruplar arası karşılaştırmalarda $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Tüm deneklerin, kan-glukoz değerleri, eşleştirilmiş t testi ile değerlendirilmiştir. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gruplar arasındaki vücut ağırlıkları, testis ağırlıkları, seminifer tübül çapı ve immünohistokimyasal veriler karşılaştırılmıştır.

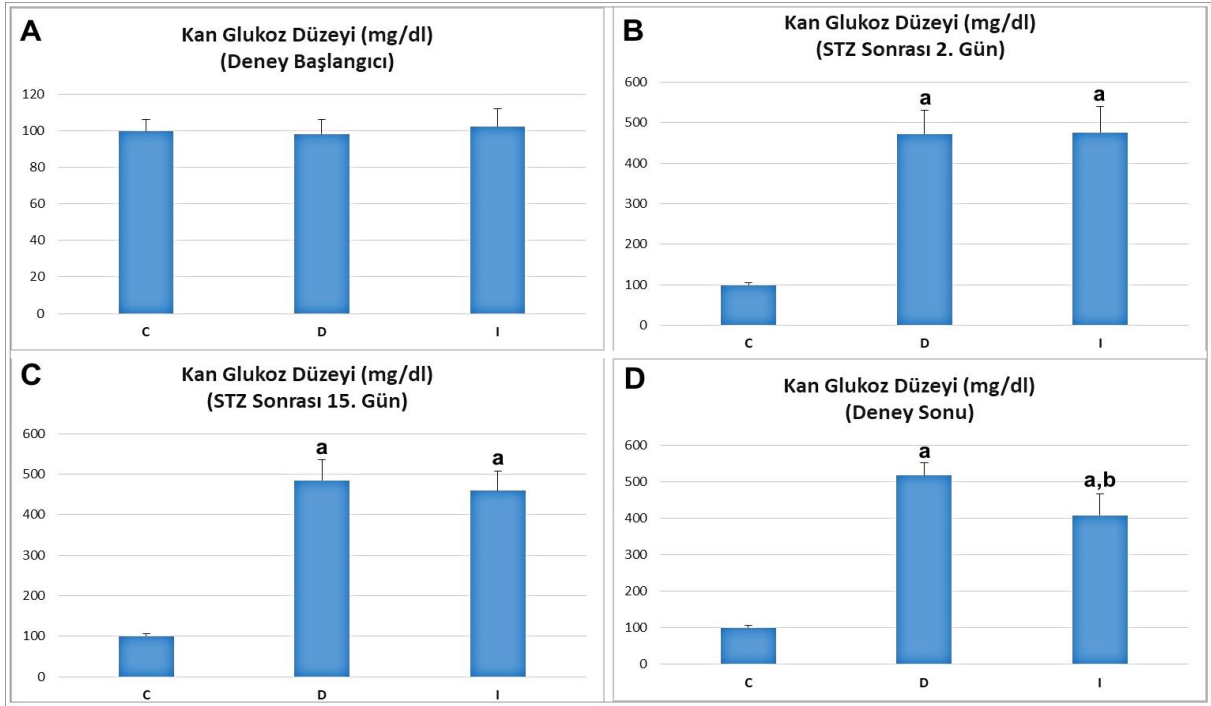
Western blot ile çalıştığımız kaspaz 12 ve CHOP değişkenlerinin karşılaştırılması ve Johnsen skor verileri, dağılım özellikleri dikkate alınarak "Tek yönlü varyans analizi"yle değerlendirilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark bulunduğunda ise bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığını bulmak için; varyanslar homojen ise Tukey testi, homojen değilse Tamhane çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

BULGULAR

KAN GLUKOZ DÜZEYİ VE AĞIRLIK BULGULARI

Tüm grupların kan glukoz düzeyleri; STZ uygulamasından 1 gün önce, STZ ile diyabet oluşturulduktan 2 gün sonra ve takip eden her 15 günde bir ölçülmüştür. Vücut ağırlıkları, deneyin başlangıcında ve deney süresi boyunca her hafta kayıt edilmiştir. Sağ ve sol testisler ise sakrifikasyon esnasında alınıp, diseksiyon işlemi uygulandıktan sonra tartılmıştır.

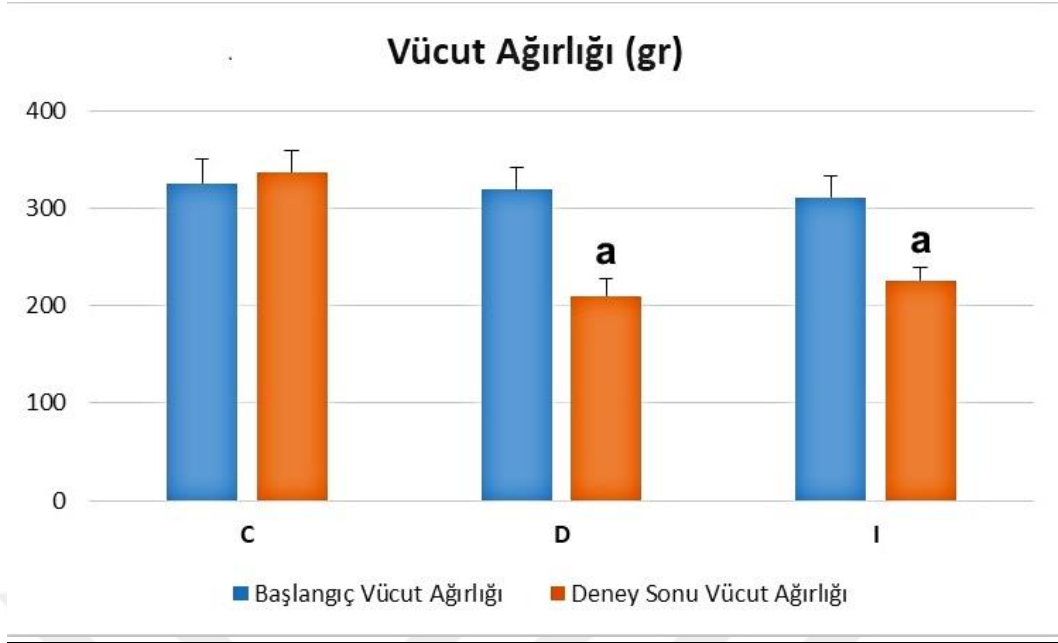
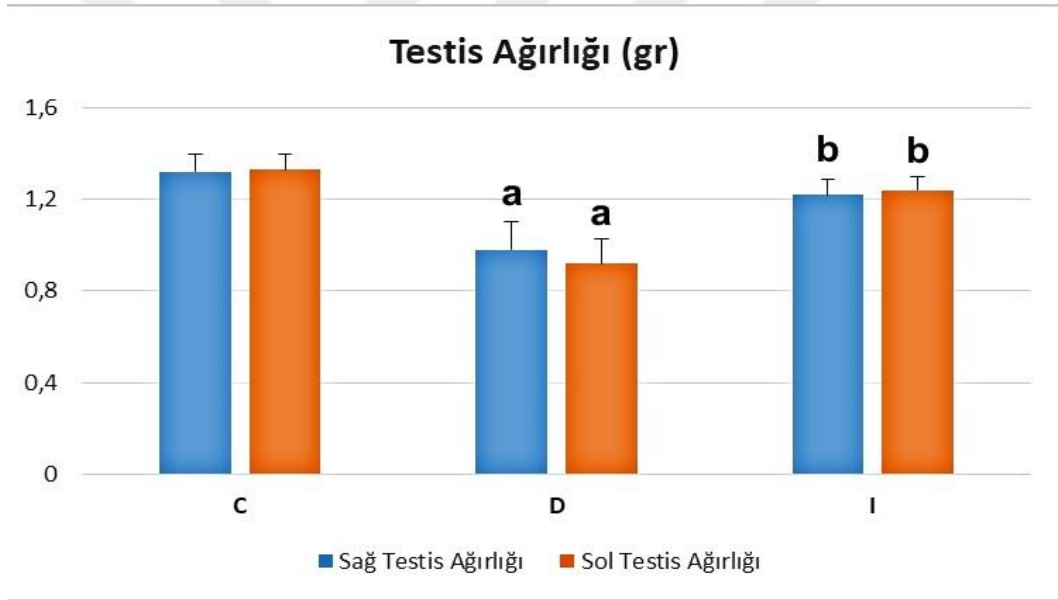
STZ uygulamasından önce ölçülen kan glukoz değerlerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulunmamıştır (C ile D arasında $P=0.912$; C ile I arasında $P= 0.776$; D ile I arasında $P=0.527$; Şekil 6A). Diyabet-D ve diyabet oluşturulduktan sonra JNK inhibitörü verilen I gruplarında; STZ uygulamasından 2 gün sonra ölçülen kan glukoz değerlerinin, deneysel diyabetin oluşturulduğunu kanıtlar şekilde 250 mg/dl üzerinde olduğu ve C grubuna göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($P<0.05$; Şekil 6B). Ayrıca, STZ uygulamasını takip eden 15. gün ve sakrifikasyondan hemen önce ölçülen kan glukoz değerleri D ve I gruplarında, C grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.05$; Şekil 6C ve 6D). Bununla birlikte, JNK inhibisyonu uygulanan I grubu deney sonu kan glukoz değerlerinin, D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$; Şekil 6D).



Şekil 6. Deney süresince ölçülen kan glukoz değerleri grafiği. A. Deney başlangıcı kan glukoz değerleri, B. STZ sonrası 2.gündeki kan glukoz değerleri, C. 15. gün kan glukoz değerleri, D. Deney sonu kan glukoz değerleri. ^a: C grubu ile karşılaştırıldığında, ^b: D grubu ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Deney öncesinde gruplarda yer alacak denekler belirlenirken, ağırlıkları birbirine yakın olan denekler gruplara eşit şekilde dağıtılmıştır. Sakrifikasyondan hemen önce grupların vücut ağırlıkları ölçülüp kıyaslandığında; D ve I gruplarında deneklerin vücut ağırlıklarının, deney süresince C grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir (P<0.001; Şekil 7A). D ve I grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılığın oluşmadığı saptanmıştır (P=0.170, Şekil 7A). Ancak, herhangi bir tedavi almayan D grubunda (319 ± 23'ten 210 ± 18.2 grama düşüş), JNK inhibitörü verilen I grubuna (311 ± 22.1'den 226 ± 13.5 grama düşüş) göre daha fazla kilo kaybı olduğu belirlenmiştir (Şekil 7A).

Deneklerin sakrifikasyonundan sonra alınan sağ ve sol testis ağırlıkları ölçüldüğünde ise D grubunda, C grubuna göre anlamlı derecede azalmanın (P<0.001; Şekil 7B) meydana geldiği görülürken; I grubuna ait sağ ve sol testis ağırlık değerlerinin, C grubu değerlerine oldukça yakın olduğu görülmüş ve aralarında bir fark saptanmamıştır (sağ testis P=0.103, sol testis P=0.975; Şekil 7B). Bununla birlikte, I grubuna ait sağ ve sol testis ağırlıkları değerleri, D grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır (ikisi de P<0.001; Şekil 7B).

A**B**

Şekil 7. Başlangıç/deney sonu vücut ağırlıkları ve sağ / sol testis ağırlık grafikleri. A. Başlangıç ve deney sonu vücut ağırlıkları, B. Sağ ve sol testis ağırlıkları. ^a: C grubu ile karşılaştırıldığında, ^b: D grubu ile karşılaştırıldığında, P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

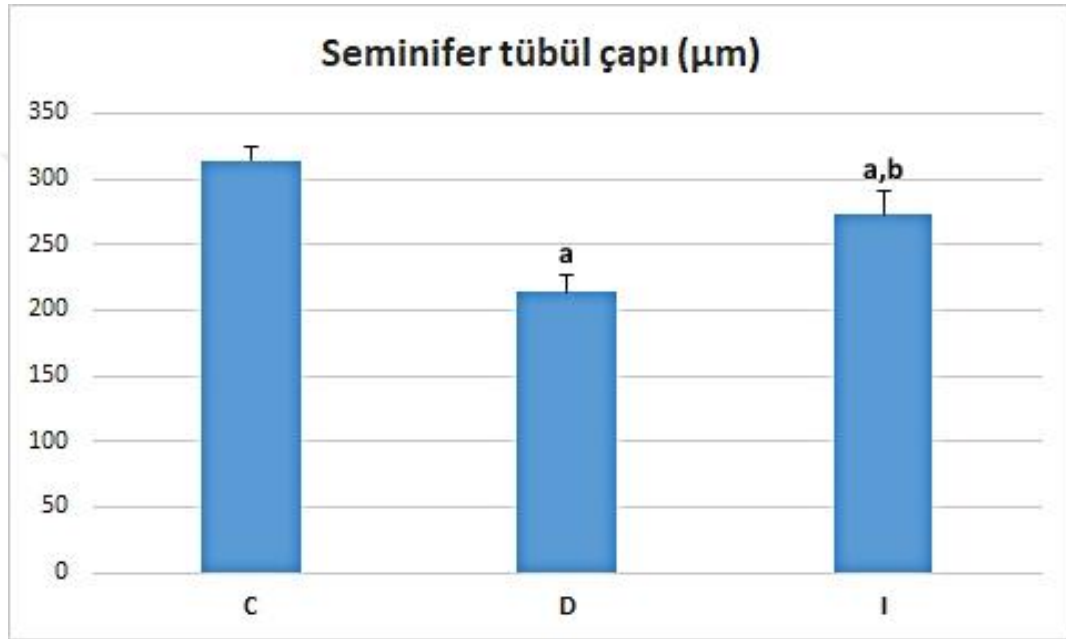
MORFOMETRİK BULGULAR

Tüm deney gruplarımızın testis doku örneklerinden alınan 5µm kalınlığındaki kesitlere, H-E boyası uygulandıktan sonra elde edilen preparatlarda, seminifer tübül çapı ölçümü yapılmıştır. Bu işlem; oküler mikrometre yardımıyla 10 farklı alanda, X200'lük büyütmede, yuvarlak veya yuvarlağa yakın rastgele seçilmiş, her preparatta 10 seminifer tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirilmiştir (94, 95).

K ve D grubu deneklerinin seminifer tübül çap ölçümleri karşılaştırıldığında; D grubu değerleri (214 ± 12.5), K grubu değerlerine (314 ± 11.3) göre istatistiksel anlamlılıkla azalmıştır ($P < 0.001$; Şekil 8).

I grubuna ait seminifer tübül çap değerlerinin ortalamaları (272.5 ± 18.6), C grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.001$; Şekil 8).

Ancak seminifer tübül çap değerleri arasındaki en önemli bulgumuz; I grubu seminifer tübül çap ortalamalarının, D grubuna göre istatistiksel anlamlılıkla yüksek olmasıdır ($P < 0.001$; Şekil 8).



Şekil 8. Gruplara ait seminifer tübül çapı grafiği ^a: C grubu ile karşılaştırıldığında, ^b: D grubu ile karşılaştırıldığında $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

MORFOLOJİK BULGULAR

Işık Mikroskopik Bulgular

C grubuna ait ışık mikroskopik bulgular: C grubuna ait deneklerden alınan ve H-E ile boyanan testis doku örneklerinde normal histolojik yapı izlenmiştir (Şekil 9A ve 9B). Seminifer tübüllerde germinal seri epitel hücreleri düzgün dizilim gösterirken, interstisyel alanda normal yapıda bağ dokusu ve hücreleri, kan damarları ve kan damarları etrafında poligonal şekilli ve eozinofilik boyanan Leydig hücreleri gözlemlenmiştir (Şekil 9A ve 9B).

Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar bazal membran üzerine yerleşmiş, spermatosit-I'ler diğer hücrelere oranla daha büyük nükleusları ile kolaylıkla ayırt edilmektedir. Spermatosit-II'ler mayoz bölünme esnasında oluşup, kısa sürede spermatidlere dönüştüklerinden dolayı, bu hücreleri

seminifer túbüllerde ayırt etmek oldukça güçtür. Spermatidlerin yuvarlak ve uzamış tipleri ile lümene yakın olarak konumlanırken, sperm hücreleri lümeninde izlenmektedir (Şekil 9A ve 9B). Bu grubun Johnsen skor değerlerinin ortalaması 9.6 ± 0.26 'dır.

D grubuna ait ışık mikroskopik bulgular: D grubu seminifer túbül çaplarının, C grubuna göre anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8). Bununla birlikte; seminifer túbüllerde şekil bozuklukları, bazal membranlarda ondülasyonlar, hücre kaybı, vakuolizasyonlar, túbül lümeninde dökülmüş germinal hücrelerin varlığı, germinal epitelde organizasyon bozukluğu ve túbüllerin etrafını saran bağ dokuda yer yer kalınlaşmalar da dikkati çekmiştir (Şekil 9). Seminifer túbüllerdeki şekil değişimlerinin; spermatogenik seri hücrelerinin diziliminde bozulma, hücrelerdeki sitoplazma kayıpları, organizasyon bozuklukları neticesinde ortaya çıktığı düşüncesindeyiz.

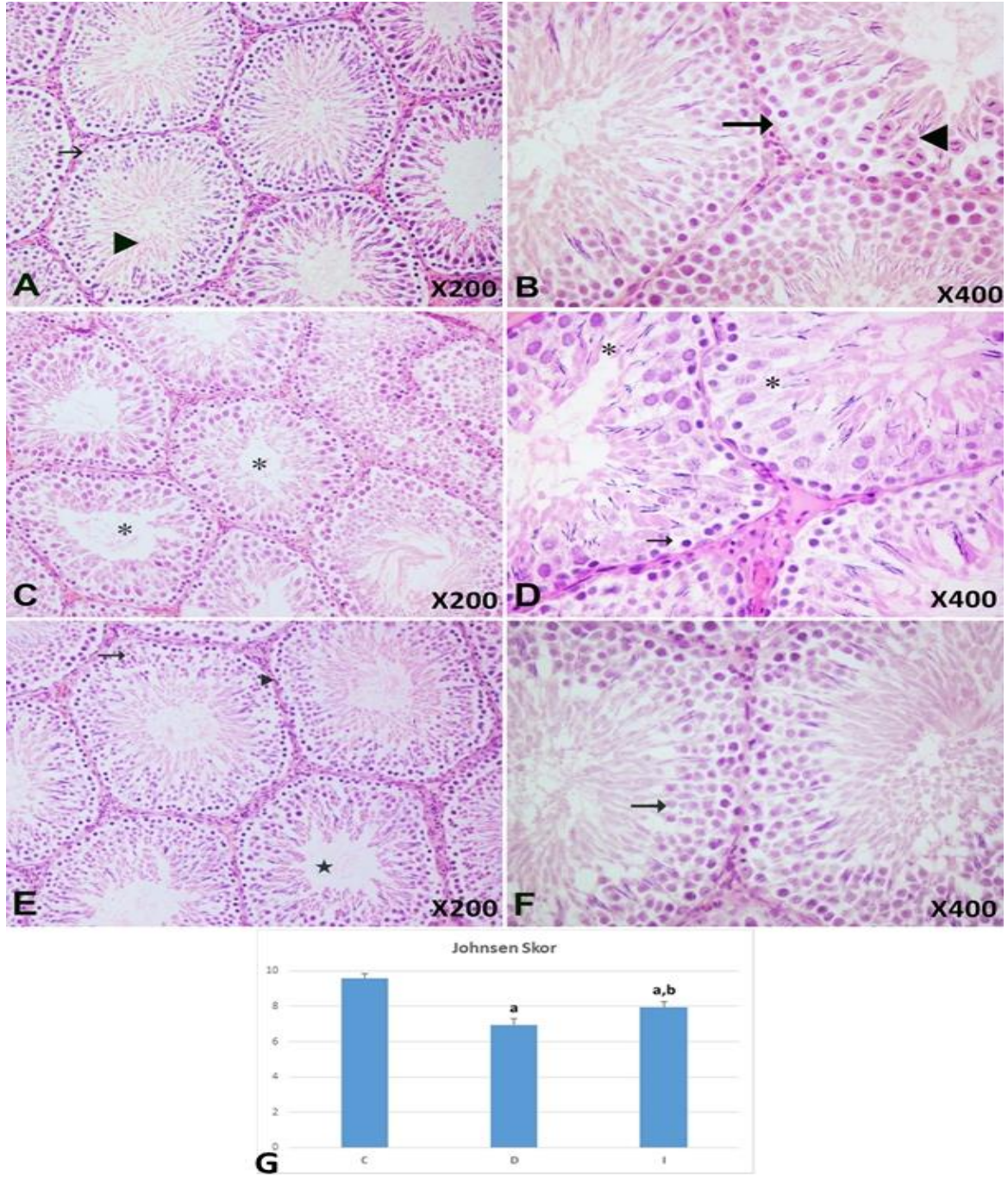
Diyabet grubunda yer alan deneklerin testis dokularının, H-E ile boyadığımız preparatlarında seminifer túbüller genel olarak değerlendirildiğinde; tüm spermatogenik seri hücrelerini (spermatogonyum, spermatosit-I, spermatid ve sperm) içeren túbüllerin yanı sıra, sadece spermatogonyum ve spermatosit-I'ler ile Sertoli hücrelerinden oluşan seminifer túbüller de izlenmiştir (Şekil 9C ve 9D). Sertoli ve spermatogenik hücrelerin dejenerasyonu sebebiyle, germinal epitelde yer yer geniş vakuollerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir.

Seminifer túbül bazal membranlarında izlenen ondülasyonların da túbül epitel hücrelerinde izlenen bu dejenerasyonlar sebebiyle meydana geldiği düşüncesindeyiz (Şekil 9C ve 9D). D grubu Johnsen skorunun (6.96 ± 0.35), C (9.6 ± 0.26) ve I (7.96 ± 0.28) gruplarına göre anlamlı olarak düşük olması (ikisi de $P < 0.001$; Şekil 9G) bulgularımızla örtüşmektedir.

I grubuna ait ışık mikroskopik bulgular: Diyabet oluşturulduktan hemen sonra JNK inhibisyonu uygulanan bu grupta; seminifer túbül çaplarının, D grubuna kıyasla çok daha normal sayılabilecek düzeyde (Şekil 8) olması, kullandığımız JNK inhibitörünün etkin ve dozunun da yeterli olmasının göstergesi olabilir.

D grubunda görülen pek çok histopatolojik değişimin (seminifer túbüllerde şekil bozuklukları, bazal membranlarda ondülasyonlar, hücre kayıpları, sitoplazmik vakuolizasyonlar, túbül lümeninde dökülmüş germinal hücrelerin varlığı, germinal epitelde organizasyon bozukluğu), I grubunda daha az izlendiği ve JNK inhibisyonunun testis dokusuna ait histopatolojileri önemli ölçüde koruduğu görülmektedir (Şekil 9E ve 9F).

I grubu Johnsen skorunun; D grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek ($P < 0.001$; Şekil G), C grubuna göre ise anlamlı bir şekilde düşük olması histopatolojik ($P < 0.001$; Şekil 9G) bulgularımızla örtüşmektedir.



Şekil 9. A. C grubuna ait seminifer tübüllerde, bazal membran (→), germinal epitele ait hücreler ve tübül lümeninde sperm hücreleri görülmektedir (▶). B. C grubunda seminifer tübüller (→) ve spermatogenik seriye ait hücreler izlenmektedir (▶). C. D grubu seminifer tübül lümeninde dökülmüş hücreler (*) dikkat çekmektedir. D. D grubunda bazı seminifer tübüllerde; hüresel vakuolizasyonlar (→), atrofik hücreler dikkat çekmektedir (*). E. I grubuna ait bu kesitte, seminifer tübül bazal membranı (▶), germinal epitele ait hücreler (→) görülmektedir. F. I grubuna ait bu mikrografta; spermatogenezin düzenli olduğu görülmektedir (→). G. Johnsen skor grafiği. ^a: C grubu ile karşılaştırıldığında, ^b: D grubu ile karşılaştırıldığında P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

İmmünohistokimya ve Western Blot Bulguları

İmmünreaktivite değerlendirmeleri, kesitlerin hangi grup deneğe ait olduğunu bilen ve bilmeyen iki farklı araştırmacının katılımıyla gerçekleştirilmiştir.

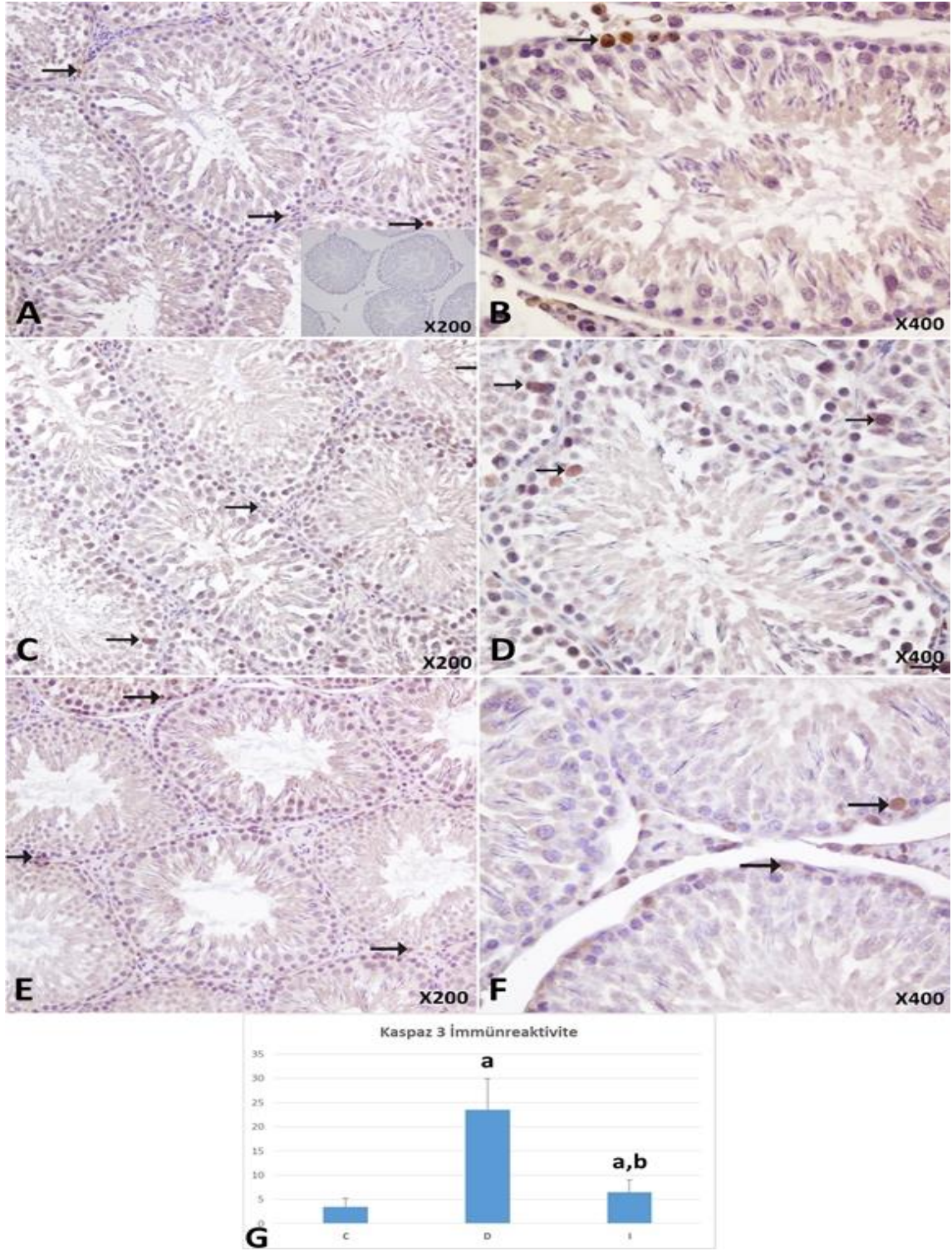
Kaspaz 3 ve kaspaz 12 immünreaktivite; X200 objektif kullanılarak, hazırlanan preparatların 5 değişik alanında bulunan, yaklaşık 1000 spermatogenik seri hücresinde immünreaktivite görülen hücre sayılarına göre skorlanmıştır. f-JNK ve CHOP immünreaktivite değerlendirmeleri ise her bir hayvana ait testis kesitinde, rastgele 5 alan seçilerek, X400 büyütme kullanılarak “Histolojik skorlama” (HSCORE) yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Kaspaz 3 ve f-JNK ifadeleri sadece immünohistokimya, kaspaz 12 ve CHOP ifadeleri ise hem immünohistokimya hem de western blot yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Kaspaz 3 bulguları: İmmünohistokimya ile nükleer ve sitoplazmik olan kaspaz 3, C grubu seminifer tübüllerinde az sayıda spermatogonyum, spermatosit-I ve Leydig hücrelerinde immünpozitif reaktivite göstermiştir (Şekil 10A ve 10B).

Tüm gruplarda bulunan deneklere ait testis dokularında uygulanan immünohistokimyasal çalışmalarda kaspaz 3 ifadesinin, C grubuna göre D grubu (Şekil 10C ve 10D) ve I gruplarında (Şekil 10E ve 10F) istatistiksel anlamlılıkla fazla olduğu (sırasıyla; $P < 0.001$, $P = 0.021$; Şekil 10G) saptanmıştır.

D grubu kaspaz 3 immünreaktivite değerleriyle karşılaştırıldığında, I grubunda tespit edilen azalmanın ($P < 0.001$; Şekil 10G) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Diyabetik testis dokusunda oldukça etkin olduğu ileri sürülen JNK protein inhibitörünün kullanıldığı I grubu deneklerinde, tespit edilen kaspaz 3 immünreaktivite azalması önemli bir bulgudur.



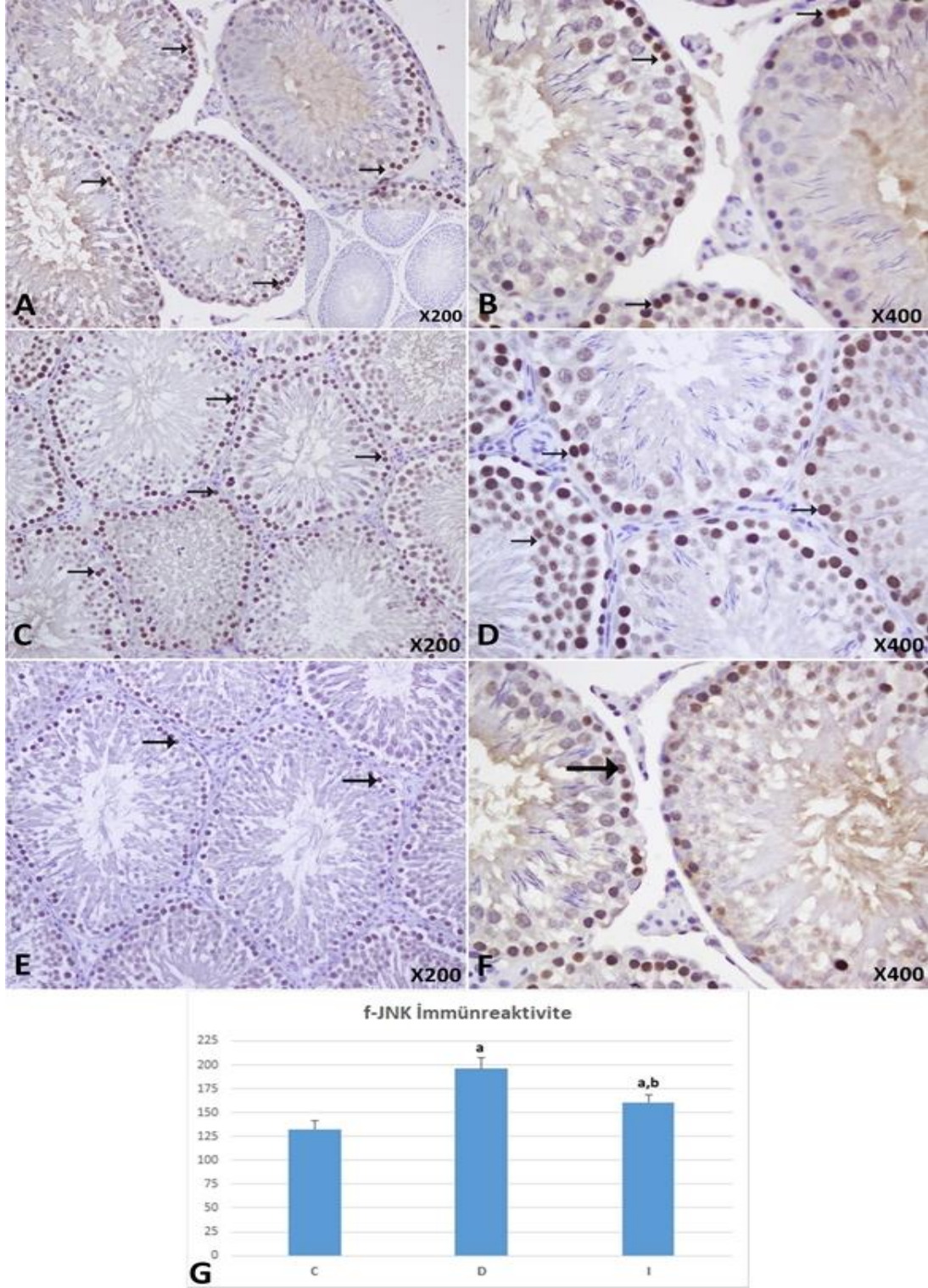
Şekil 10. A ve B'de bulunan mikrograflarda, C grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi görülmektedir (→), içsel: Negatif kontrol. C ve D'de D grubuna ait seminifer tübüllerde, çok sayıda immünpozitif hücre görülmektedir (→). E ve F ise I grubunda bulunan az sayıda kaspaz 3 reaktivitesi veren hücreler izlenmektedir (→). Kaspaz 3 ve hematoksilin zıt boyaması. G.Kaspaz 3 immünreaktivite grafiği. ^a: C grubu ile karşılaştırıldığında, ^b: D grubu ile karşılaştırıldığında P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

f-JNK immünreaktivite bulguları: Tüm grupların f-JNK immünreaktiviteyi incelendiğinde; testis dokusu seminifer tübüllerinde, hücresel lokalizasyonu nükleer olan immünpozitif hücreler izlenmiştir (Şekil 11). C grubunda, bazı spermatogonyum ve spermatozoid-I'lerde hafif ve orta dereceli immünreaktivite gözlemlenmiştir (Şekil 11A ve 11B).

D grubunda ise spermatogonyumlar ve spermatozoid-I'lerin bir kısmında yoğun, bir kısmında hafif derecede immünreaktivite izlenmiştir (Şekil 11C ve 11D). D grubunun f-JNK HSCORE değerlerinin (195.8 ± 11.5), C grubu değerlerinden (132.5 ± 9.35) oldukça yüksek ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$, Şekil 11G). Bunun yanı sıra, Sertoli hücrelerinde de kontrol grubuna göre daha fazla f-JNK immünreaktivite bulunmaktadır (Şekil 11B ve 11D).

JNK inhibitörü SP600125 verilen I grubunda; bazı hücrelerde orta derecede f-JNK immünreaktivite gözlenirken, bazılarında ise f-JNK immünreaktivitenin oldukça düşük olduğu izlenmiştir. Spermatogonyumlarda genellikle hafif ve orta derecede reaktivite bulunurken; spermatozoid-I'lerde farklı şiddetlerde f-JNK immünreaktivite gözlemlenmiştir. Sertoli hücrelerinde ise hafif derecede bir immünpozitiflik görülmektedir (Şekil 11E ve 11F).

I grubundaki testis doku örneklerinin seminifer tübül duvarlarında bulunan hücrelerin f-JNK HSCORE değerleri (160.8 ± 7.3), C grubu değerlerinden daha yüksektir ($P < 0.001$, Şekil 11G). D grubu değerleri ile kıyaslandığında ise I grubu f- JNK HSCORE değerlerinin belirgin olarak azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.001$, Şekil 11G).



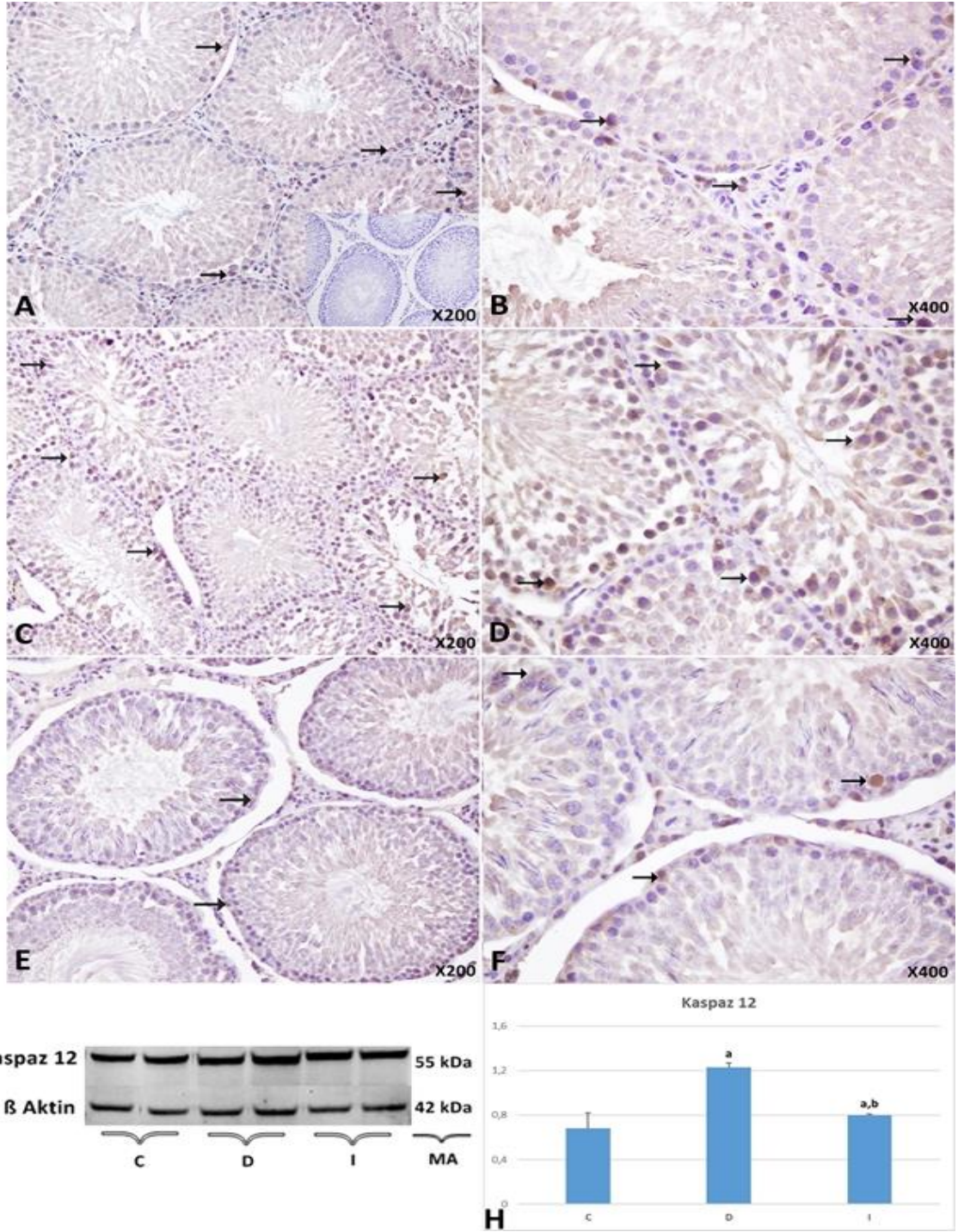
Şekil 11. A ve B mikrograflarında, C grubuna ait f-JNK immünreaktivitesi görülmektedir (→), içsel: Negatif kontrol. C ve D. D grubuna ait seminifer tübüllerde, çok sayıda immünpozitif hücre izlenmektedir (→). E ve F. I grubunda, f-JNK immünreaktivitesi gösteren hücreler (→). Hematoksilen zit boyaması. G. f-JNK immünreaktivite grafiği. ^a: C grubu ile karşılaştırıldığında, ^b: D grubu ile karşılaştırıldığında P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Kaspaz 12 immünreaktivite bulguları: C ve I grubuna ait seminifer tübüllerin germinal epitelinde ve Sertoli hücrelerinde hücresel lokalizasyonu sitoplazmik olan az sayıda immünpozitif hücre görülürken (Şekil 12), D grubu seminifer tübüllerinde yer alan spermatogonyum, spermatosit-1, spermatid ve Sertoli hücrelerinde, çok sayıda immünpozitif hücre tespit edilmiştir (Şekil 12).

Endoplazmik retikulum stresinde önemli bir protein olan kaspaz 12 proteininin; D grubundaki immünpozitif hücre sayısı (126 ± 15.6), C grubuna (18.5 ± 3.7) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($P < 0.001$; Şekil 12A-D). Bununla birlikte, I grubuna ait seminifer tübüllerdeki immünpozitif hücre sayısının (24 ± 7.5), D grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı saptanmıştır ($P < 0.001$; Şekil 12E ve 12F). Buna ek olarak, I grubu ile C grubu kıyaslandığında ise I grubundaki immün pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($P = 0.022$; Şekil 12).

Western blot tekniği uygulanan C, D ve I grubu testis dokularında, kaspaz 12 protein ifadesi değerleri karşılaştırıldığında; D grubu (1.23 ± 0.04) ve I grubu (0.80 ± 0.01) değerlerinin, C grubu değerlerine (0.68 ± 0.14) göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (ikisi de $P = 0.002$; Şekil 12G ve 12H). I grubu kaspaz 12 ifadesi, D grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($P = 0.002$; Şekil 12).

Elde ettiğimiz veriler, immünohistokimya ve western blot kaspaz 12 analiz sonuçlarımızın birbiriyle uyumlu olduğunu göstermektedir.



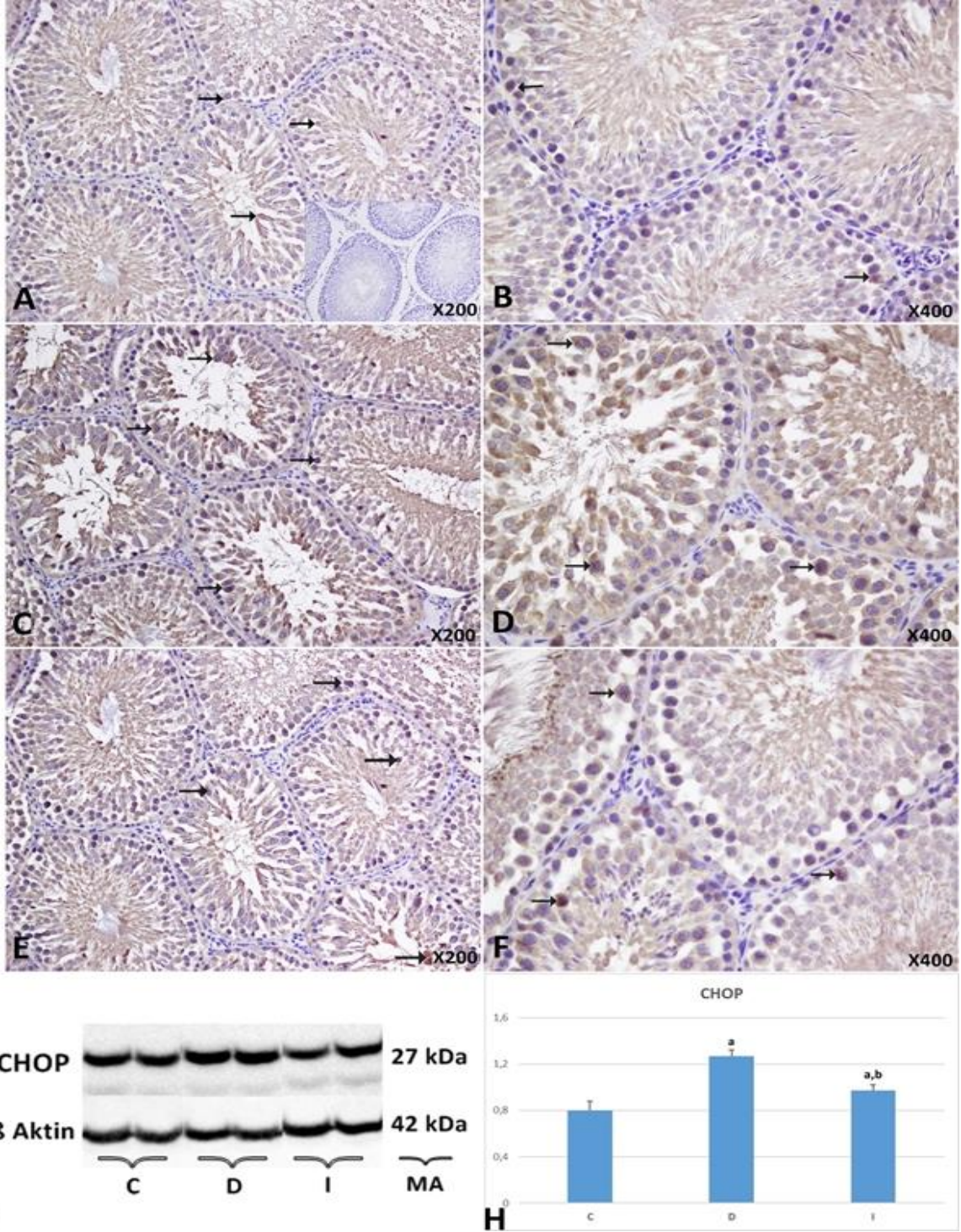
Şekil 12. Kaspaz 12 immünreaktivite ve western blot sonuçlarını içeren bu şekilde; A ve B. C grubu, immünpozitif hücreler oklarla (→) işaretlenmiştir. içsel; Negatif kontrol. C ve D. D grubunda çok sayıda immünpozitif hücre oklarla (→) gösterilmiştir. E ve F. I grubu; seminifer tübüllerdeki immünpozitif hücreler oklarla (→) belirtilmiştir. Kaspaz 12 ve hematoksinen zıt boyaması. G. Kaspaz 12 western blot bant profili. Moleküler ağırlık (MA). H. Kaspaz 12 western blot grafiğini içermektedir. ^a: C ile karşılaştırıldığında, ^b: D ile karşılaştırıldığında elde edilen, anlamlı olan değerler grafiklerde belirtilmiştir.

CHOP immünreaktivite bulguları: C grubu testis dokusu seminifer tübüllerinde, spermatogonyum, spermatosit I ve spermatid hücrelerinde, hücresel lokalizasyonu sitoplazmik olan, az sayıda immünpozitif hücre izlenmiştir (Şekil 13A ve 13B).

D grubu (207.5 ± 9.35) ve I grubu (172.5 ± 6.9) testis dokularındaki CHOP HSCORE değerlerinin, C grubuna (112.5 ± 10.8) göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($P < 0.001$; Şekil 13). Bununla birlikte I grubu CHOP HSCORE değerinin, D grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($P < 0.001$; Şekil 13C-F). D ve I grubu testis kesitlerinde immünpozitif hücreler çoğunlukla; spermatosit I, spermatid ve az sayıda spermatogonyumlarda izlenmiştir (Şekil 13C-F).

Western blot tekniği uygulanan C, D ve I grubu testis dokularında, CHOP protein ifadesi değerleri karşılaştırıldığında; D grubu (1.27 ± 0.05) ve I grubu (0.97 ± 0.05) değerlerinin, C grubu değerlerine (0.80 ± 0.08) göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir ($P = 0.002$; Şekil 13G ve 13H). I grubu CHOP ifadesi, D grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($P = 0.002$; Şekil 13).

Elde ettiğimiz verilere göre immünohistokimya ve western blot analiz sonuçlarımız birbiriyle uyumludur ve CHOP ifadesinin diyabetik testis dokularında arttığı açıkça görülmektedir. Ancak JNK inhibisyonu uygulandığında, ER stresinin önemli bir göstergesi olan CHOP protein ifadesinin azaldığı saptanmıştır.



Şekil 13. CHOP immünreaktivite ve western blot sonuçlarını içeren bu şekilde; A ve B. C grubu, immünpozitif hücreler oklarla (→) işaretlenmiştir. içsel; Negatif kontrol. C ve D. D grubundaki çok sayıda immünpozitif reaksiyon veren hücreler oklarla (→) gösterilmiştir. E ve F. I grubu; seminifer tübüllerdeki CHOP pozitif hücreler oklarla (→) belirtilmiştir. CHOP ve hematoxilen zıt boyaması. G. CHOP western blot bant profili. Moleküler ağırlık (MA). H. CHOP western blot grafiğini içermektedir. ^a: C ile karşılaştırıldığında, ^b: D ile karşılaştırıldığında elde edilen, anlamlı olan değerler grafikte belirtilmiştir.

TARTIŞMA

Günümüzde diyabet; nefropati, nöropati, retinopati, kardiyovasküler hastalıklar gibi komplikasyonları bulunan önemli bir sistemik hastalıktır (1, 5, 18, 22, 96). Bununla birlikte iyi bir tedavi sürecinde olmayan ya da diyabet teşhisi almamış kişilerde, erkek infertilitesine neden olan önemli hastalıklardan biri olarak da gösterilmektedir (97-100). Diyabet ve erkek infertilitesi arasındaki ilişki, henüz aydınlatılamamış pek çok moleküler mekanizması bulunan ve tüm yönleriyle araştırılması gereken önemli bir konudur. Diyabet ve erkek infertilitesi üzerine yapılan son çalışmalarda kan glukoz homeostazını düzenleyici özelliği olan, antioksidan içeriği yüksek doğal ürünlere ilgi artmış olsa da (101-103), hastalığın moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve bu moleküler yollarda önemli roller oynayan çeşitli proteinlere ait inhibitör ajanların kullanılmasıyla da etkin tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır (86, 87, 104-106). Diyabetin neden olduğu hiperglisemi nedeniyle ortaya çıkan akut ve kronik komplikasyonların önlenmesi açısından, ilaç tedavileri ve bu tedavilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Diyabetik erkek bireylerde; libido azalması, retrograd ejakülasyon, erektil disfonksiyon, hipogonadizm, testiküler hacimde azalma, prostat glandüler hacimde artış ve ürogenital sistemdeki mikrobiyal aktivitede artış olduğu gösterilmiştir (97, 99, 100, 107-110). Bunlarla birlikte; sperm sayısı ve hareketliliğinde azalma, hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde değişiklikler ve testosteron seviyesinde düşüş de sıklıkla karşılaşılan sorunlardandır (103, 110-113). Tüm bu problemlerin altında yatan en önemli problemlerden biri, diyabet ile oluşan hipergliseminin tetiklediği oksidatif stresin, apoptozis mekanizmasını indüklemesidir.

Diyabetik erkek bireylerde ortaya çıkan kötü klinik tablonun iyileştirilmesinde, kan glukoz homeostazının sağlanması kilit rol oynamaktadır. Pankreas β hücrelerinin tahrip olması, insülin sekresyonunda meydana gelen azalma ya da insülin direncinin gelişmesi nedenlerine bağlı olarak oluşan kan glukoz seviyelerindeki artış, yapılan çalışmalarda çeşitli ajanların kullanılmasıyla kontrol altına alınmaya çalışılmıştır (101-103). Çünkü kronik hiperglisemi sebebiyle ROS üretiminde artış ve antioksidan savunmada yetersizlikler meydana gelmektedir. ROS etkisiyle, sperm nükleer ve/veya mitokondriyal DNA'sının parçalandığı, bunun da bireylerin üreme potansiyelleri için risk oluşturduğu bilinmektedir (6, 96, 103, 114-116).

Diyabet ile indüklenen oksidatif stresin, JNK aktivasyonunu arttırdığı yapılan önceki çalışmalarda bildirilmiştir (14, 65, 66, 117). JNK aktivasyonunun arttığı β hücrelerinde; insülin sekresyonunun azaldığı ve buna ek olarak, insülinin etki edeceği hücrelerde insülin direncinin geliştiği önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (14, 82, 118). Yaptığımız çalışmada kan glukoz değerlerinin; diyabet grubuna göre, JNK inhibisyonu uyguladığımız I grubunda azalmış olmasının, azalan JNK aktivitesi kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Han ve arkadaşlarının (119) 2012 yılında yayınladıkları çalışmalarında, makrofaj hücrelerine spesifik olarak JNK genlerini susturdukları ve ardından da yüksek yağlı diyetle besledikleri deneklerde hipergliseminin gelişmediğini gözlemlemişlerdir. Singh ve arkadaşlarının (84) JNK genlerini susturduktan sonra yüksek yağlı diyet uyguladıkları bir diğer çalışmada, deneklerin kan glukoz değerlerinin JNK etkisi olmadığında kontrol altında tutulabildiğini bildirmişlerdir. Tüm bu çalışmalar, diyabet ile JNK arasında önemli bir ilişkinin olabileceğini düşündürmektedir.

Diyabetik deneklerde oluşan vücut ağırlık kayıpları, yapılan bir çok çalışmada gözlemlenmiştir (9, 77, 94, 117, 120). Bu çalışmalara paralel olarak; yaptığımız çalışmada da diyabet grubunda vücut ağırlık kayıplarının olduğu tespit edilmiştir. I grubunda, D grubuna kıyasla belirlenen vücut ağırlık artışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Ijaz ve arkadaşları (85) 2009 yılında yaptıkları çalışmada; diyabetik deneklerde JNK inhibisyonunun, vücut ağırlıklarındaki azalmayı etkilemediğini göstermişlerdir. Lim ve arkadaşlarının (121) 2011 yılında yaptıkları çalışmada da JNK inhibisyonunun, diyabetin neden olduğu vücut ağırlık kaybını önlemediği bildirilmiştir. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, çalışmamızda gözlemlediğimiz I grubundaki ağırlık kayıplarının, D grubuna göre daha az olması, JNK inhibitörlerinin antidiyabetik etkisi ile açıklanabilmektedir. Bu bulgularımız, JNK inhibitörlerinin farklı doz ve sürelerde uygulandığında, diyabetin sebep olduğu vücut ağırlık kayıplarını ortadan kaldıracabileceğini akla getirmektedir.

Diyabet ile birlikte vücut ağırlıklarının yanı sıra, testis ağırlıklarında da azalma olduğu pek çok çalışmada ileri sürülmüştür (91, 122-126). I grubu deneklerimizde tespit ettiğimiz testis ağırlık kayıplarının, D grubu deneklerden daha az olmasını; JNK inhibisyonu sebebiyle, diyabetik testislerde

görülen histopatolojik değişimlerin ve patolojik apoptozisin daha az olmasıyla açıklayabiliriz. JNK inhibisyonunun diyabetik böbrek dokusundaki ağırlık kaybına etkisini araştırmak isteyen Ijaz ve arkadaşlarının (85) 2009 yılında yaptıkları bir in vivo çalışmada; diyabet grubu deneklerin böbrek dokusunda meydana gelen ağırlık kaybının, JNK inhibisyonu uygulanan grupta yaşanmadığı ileri sürülmüştür.

Diyabetik testis doku kesitlerimizde histopatolojik olarak; seminifer tübüllerde şekil bozuklukları, bazal membranlarda ondülasyonlar, gelişimini tamamlayamadan tübül lümenine dökülen hücreler, hücrel vakuolizasyonlar, tübül lümeninde daralmalar, germinal epitelde organizasyon bozukluğu ve tübüllerin etrafını saran bağ dokuda yer yer kalınlaşmalar gözlenmiştir. Karşılaştığımız bu histopatolojik bulgular, daha önce yapılmış pek çok çalışma ile paralellik göstermektedir (9, 50, 94, 117, 120, 126-129). Çalışmamızda I grubu deneklere ait kesitlerde, yukarıda bahsedilen testis dokusuna ait histopatolojik değişimlerin büyük ölçüde azaldığı, JNK inhibisyonunun seminifer tübül çapı ve Johnsen skor sonuçlarına da olumlu yönde etki ettiği görülmüştür. Çeşitli dokular üzerine yapılan bazı çalışmalarda, diyabetin neden olduğu histopatolojik değişikliklerin JNK inhibisyonu ile engellendiği bildirilmiştir. Liu ve ark. (86)'nın 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada STZ ile indüklenmiş diyabet modelinde, JNK inhibisyonunun; aort duvarındaki oluşması kuvvetle muhtemel histopatolojik değişikliklerin oluşumunun engellendiği rapor edilmiştir. JNK inhibisyonunun diyabetik nefropati üzerindeki etkilerini araştıran Pan ve ark. (87) 2013 yılında yayınladıkları çalışmalarında JNK inhibisyonuyla, diyabetik böbrek dokusunda ortaya çıkan pek çok histopatolojik değişikliği önlediğini ve JNK inhibitörlerinin, diyabetik nefropati için yeni bir terapötik ajan olabileceğini bildirmişlerdir.

Diyabetin sebep olduğu testiküler disfonksiyon ile apoptozisin yakın ilişkili olduğu ve oksidatif stresin, apoptozisi indüklediği önceki çalışmalarda bildirilmiştir (91, 112, 117, 130). Apoptozisin belirlenmesinde kaspaz 3'ün immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi sıklıkla kullanılmaktadır. Proteolitik özelliği olan kaspaz 3'ün hücrelerdeki aktivasyonu ile hücreye ait pek çok yapısal proteinin parçalanması ve bunun sonucu olarak da apoptozisin geliştiği bilinmektedir (108, 120, 130-133). Koh (130)'un 2007 yılında, Faid ve ark. (134)'nın ise 2015 yılında yaptıkları çalışmada, diyabetin kaspaz 3 aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmamızda D grubundaki kaspaz 3 immünreaktivitesinin anlamlı bir şekilde artmış olması, diyabetik testis dokusu için beklediğimiz bir bulgudur. Bununla birlikte, JNK inhibisyonu uyguladığımız I grubunda, D grubuna göre kaspaz 3 aktivasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Yaptığımız literatür araştırmamızda, JNK inhibisyonunun diyabetik testis dokusundaki kaspaz 3 immünreaktivitesini ne ölçüde etkilediğini ortaya koyan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak farklı diyabetik dokularda JNK inhibisyonunun kaspaz 3 immünreaktivitesindeki etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Pan

ve ark. (135) 2014 yılında STZ ile diyabet modeli oluşturdukları çalışmada, diyabetin neden olduğu kardiyak hasara karşı JNK inhibisyonunun koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, diyabet sebebiyle artan kaspaz 3 aktivitesinin, JNK inhibisyonu ile önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Chen ve ark. (136) ise 2016 yılında diyabete ek olarak iskemi reperfüzyon modeli oluşturdukları çalışmada, myokardial dokularda SP600125 ile yapılan JNK inhibisyonunun, kaspaz 3 ifadesini azalttığını ve apoptozise karşı koruyucu bir ajan olabileceğini rapor etmişlerdir.

Diyabet ile artan oksidatif stresin, JNK aracılı apoptozisten sorumlu olduğu bilinmektedir. Artan oksidatif stres sonucu mitokondriden sitoplazmaya geçen sitokrom C, kaspaz aktivasyonlarını arttırarak apoptozisi indükler (64). JNK ve apoptozis arasındaki ilişkiye değinen önceki çalışmalarda, artan oksidatif strese bağlı olarak gelişen apoptoziste f-JNK ifadesinin arttığı bildirilmiştir (62, 64, 73, 117, 130). STZ ile diyabet modeli oluşturduğumuz bu çalışmada, diyabete bağlı olarak JNK aktivasyonunda gözlemlediğimiz artış, önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir (73, 130). STZ ile diyabet oluşturduktan hemen sonra SP600125 ile JNK inhibisyonu oluşturduğumuz I grubunda ise, f-JNK aktivasyonunun D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Liu ve ark. (86) 2014 yılında diyabetik deneklerde meydana gelen aort doku hasarına karşı, JNK inhibisyonunun koruyucu etkilerini araştırdıkları bir çalışmada; diyabetik aort dokularında artan f-JNK aktivitesinin, JNK inhibisyonuyla engellenerek aorttaki patolojik değişikliklerin azaldığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Pan ve ark. (87) 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, diyabetik böbrek hasarında JNK'nın etkilerinin hücre adhezyon molekülleri üzerinden araştırmışlar ve JNK inhibisyonu gerçekleştirdiklerinde, diyabetik renal patolojik bulguların azaldığını tespit etmişlerdir. Bu sebeple, JNK inhibisyonunun diyabetik nefropati tedavisi için bir umut olabileceğini rapor etmişlerdir.

Diyabetin indüklediği oksidatif stresin, ER stresine neden olduğu ve apoptozis sinyallerinin düzenlenmesinde etkili yolların birinin de ER stresi olduğu bilinmektedir (15, 16). ER stresi, proteinlerde yanlış katlanmalar ya da katlanmamış protein birikimi ile oluşmaktadır. ER stresi oluşmuş bir hücre; yeni proteinlerin sentezini azaltarak, ER kapasitesini arttırır ya da apoptozis ile belirli ölüm sinyalleri oluşturarak, bu stresi sonlandırabilmektedir (15, 16). CHOP, JNK ve kaspazlar (kaspaz 3, 9 ve 12), ER stresine meydana gelen apoptoziste etkili olan proteinlerdir (15, 17, 74).

Diyabetik testis dokusunda gelişen ER stresi ile birlikte, kaspaz 12 ifadesinin arttığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (73, 131, 137, 138). Çalışmamızda; immünohistokimya ve western blot tekniğiyle, önceki çalışmalara paralel olarak, kaspaz 12 protein ifadesinin diyabetik testis dokusunda arttığı tespit edilmiştir. Literatürde diyabetik testis dokularında, JNK inhibitörü kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışma bulunmamaktadır. JNK inhibisyonunun ER stresine karşı etkilerini araştırmak isteyen Zhang ve ark. (88) 2017 yılında yayınladıkları çalışmalarında,

miyokardiyal iskemi reperfüzyon modeli ile oluşturdukları ER stresinde, JNK inhibisyonunun, kaspaz 12 aktivasyonunu azalttığını tespit etmişlerdir. Dokular ve deneysel çalışma farklı olsa da, çalışmamızda I grubunda azaldığını tespit ettiğimiz kaspaz 12 ifadesinden yola çıkarak, JNK inhibisyonunun ER stresine karşı etkili bir hedef olabileceği düşünülebilir.

ER stresine bağlı olarak ortaya çıkan apoptozisten sorumlu olan genlerden biri de, CHOP'tur. Aktive olan CHOP, eIF2 α 'yı defosforile ederek, ER'de daha fazla proteinin oluşmasına neden olarak, hücrelerin apoptozise girmelerini sağlamaktadır. Diyabetik dokularda yapılan çalışmalarda, CHOP ifadesinin diyabet etkisi ile arttığı bildirilmiştir (131, 137-141). ER stresindeki önemli belirteçlerden olan CHOP ifadelerini immünohistokimya ve western blot teknikleri ile araştırdığımız çalışmamızda, diyabetik testis dokularında CHOP ifadesinin arttığı görülmüştür. Çalışmamızda, diyabetik testis dokularındaki ER stresi ve bu stres sonucunda oluşan apoptozisin önlenmesinde etkili olabileceğini düşündüğümüz JNK inhibitörünün (SP600125), I grubu deneklerimizde CHOP ifadesini anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Diyabet dışında, farklı deneysel modellerle ER stresi oluşturularak, CHOP ifadelerine JNK inhibisyonunun etkileri araştırılmıştır. Zhang ve ark. (88) 2017 yılında yayınladıkları çalışmalarında miyokardiyal iskemi reperfüzyon modeli ile oluşturdukları ER stresinde, JNK inhibisyonu ile CHOP aktivasyonunun azaldığını saptamışlardır. Bir diğer çalışmada Lou ve ark. (89) sepsis modeli ile oluşturdukları ER stresi üzerinde SP600125 etkilerini araştırdıkları çalışmada; ER stresi ile artan CHOP ifadesinin, JNK inhibisyonu ile azaldığını bildirmişlerdir. ER stresinde önemli bir biyo-belirteç olan CHOP ifadesinin, JNK inhibisyonu etkisi ile önemli ölçüde azalmış olması, ER stresi üzerinde JNK inhibisyonunun oldukça etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, JNK inhibitörü SP600125'in diyabetik testis dokusunda oluşan ER stresi üzerindeki etkisini araştırdık. JNK inhibitörünün uygulanması, deneklerdeki diyabete bağlı olarak oluşan testiküler hasarı engelleyerek, testisin histolojik yapısı ve ER stresine bağlı apoptozisin gelişmesini önemli ölçüde durdurmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar JNK aktivasyonunun artması ile çeşitli hastalıkların gelişmesi arasında bir korelasyon olduğu ve JNK inhibitörlerinin hastalıkların önlenmesinde etkin olabileceği vurgulanmaktadır. Bu anlamda, yaptığımız literatür taramasına göre, ilk kez diyabetik testis dokusunda oluşan ER stresinin indüklediği apoptozise karşı JNK inhibitörünün kullanıldığı; kaspaz 3, f-JNK, kaspaz 12 ve CHOP ifadelerinin değerlendirildiği bu çalışmanın, literatüre önemli katkı yapacağı düşüncesindeyiz.

SONUÇLAR

Patolojik apoptozis, diyabetik erkek infertilitesinin oluşmasında önemli bir role sahiptir. MAPK'lar ailesinin, stresle aktive olan üyelerinden JNK'nın inhibe edilmesiyle, apoptozise neden olan ER stres proteinlerinin ifadesindeki değişikliklerinin aydınlatılmasını amaçladığımız bu çalışmada; *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçanlardan, C-Kontrol grubu, pH'sı 4,2 olan 0,1M'lik sitrat tamponu verilen grup (n=9). D-tek doz 50 mg/kg streptozotosin uygulanan diyabet grubu (n=9) ve I-İnhibisyon grubu (n=9): streptozotosinle diyabet oluşturulduktan sonra, JNK inhibitörü SP600125'in 15 mg/kg 4 gün süresince verildiği, üç grup oluşturulmuştur. Deneyin 30. gününde sakrifiye edilen tüm deneklerimizden elde ettiğimiz materyallerle yapılan çalışmalar sonucunda, elde edilen bulgular özetlenecek olursa;

- 1- D grubunda yükselmiş olan kan glukoz düzeylerinin I grubu deneklerde istatistiksel anlamlılıkla azaldığı (P=0.003),
- 2- I grubu deneklerinin vücut ağırlıklarının, D grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (P=0.170); testis ağırlıklarının ise I grubunda, D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunduğu (P<0.001),
- 3- H-E ile boyanmış preparatlara uygulanan Johnsen skor sonuçlarımıza göre; D grubunda bulunan histopatolojik bulguların, I grubunda önemli ölçüde ortadan kalktığı (P<0.001),
- 4- Seminifer tübül çapı ölçümlerinin I grubunda, D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu (P<0.001),
- 5- Kaspaz 3 immünreaktivitesinin I grubunda, D grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede azaldığı (P<0.001),
- 6- İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilen f-JNK HSCORE sonuçlarının; I grubunda, D grubuna göre istatistiksel anlamlılıkla azaldığı (P<0.001),

- 7- Kaspaz 12 ifadesinin; hem immünreaktivite ($P<0.001$) hem de western blot ($P=0.002$) sonuçlarına göre I grubu testis dokusunda, D grubuna kıyasla istatistiksel olarak düştüğü,
- 8- İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilen CHOP HSCORE ($P<0.001$) ve western blot ($P<0.001$) sonuçlarının; I grubunda, D grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular; diyabetik testis dokusundaki ER stresinde, JNK'nın önemli bir hedef olabileceği ve JNK inhibisyonunun diyabetik testiküler hasarların önlenmesi için yeni bir terapötik ajan olabileceği kanısındayız.



ÖZET

Diyabetin neden olduğu testiküler hasarın altında yatan mekanizmalar günümüzde halen tam olarak anlaşılamamıştır. Hiperglisemi ile indüklenen oksidatif stres, aşırı kalsiyum salınımını tetikler ve ER homeostazını bozar. Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ile oluşan ER stresi JNK, CHOP ve kaspazlar (3,9 ve 12) aracılığı ile apoptotik yolların aktive edilmesine neden olur.

JNK; proliferasyon, apoptozis ve inflamatuvar yanıt oluşturan; kanser, fibrozis, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, obezite ve diyabet gibi hastalıklarda önemli rol oynayan önemli bir moleküldür. JNK inhibitörlerinden biri olan SP600125, JNK'nın patolojik etkilerinin ortadan kaldırılması amacıyla, sıklıkla tercih edilmektedir.

Çalışmamızda; 3 aylık, 27 adet *Sprague Dawley* erkek sıçan 3 gruba ayrılmıştır; C grubu: Kontrol grubu, pH'sı 4,2 olan 0,1M'lik sitrat tamponu verilen grup (n=9), D grubu: Diyabet grubu, tek doz 50 mg/kg STZ verilen grup (n=9), I grubu: İnhibisyon grubu, tek doz 50 mg/kg STZ intraperitoneal (i.p.) verilerek diyabet oluşturulduktan sonra, JNK inhibitörü olan SP600125'in i.p. 15 mg/kg 4 gün boyunca günde 1 kez verildikten sonra 30. günde sakrifiye edilen grup (n=9).

D grubu testis dokusunda artan kan glukoz düzeylerinin I grubunda azaldığı, D grubunda azalan vücut ve testis ağırlıkları, seminifer tübül çapı ve Johnsen skor değerlerinin I grubunda arttığı, kaspaz 3, f-JNK, kaspaz 12 ve CHOP değerlerinin D grubuna kıyasla I grubunda azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, JNK inhibitörünün diyabetik testis dokusunda oluşan ER stresi üzerindeki etkili olduğu, diyabete bağlı olarak oluşan testiküler hasarı engelleyerek, testisin histolojik yapısı ve ER stresine bağlı apoptozisin gelişmesini önemli ölçüde durdurmuştur.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, testis, ER stresi, apoptozis, JNK inhibisyonu

EFFECTS OF JNK INHIBITION ON THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN DIABETIC TESTIS TISSUE

SUMMARY

The mechanisms underlying testicular damage caused by diabetes still have not understood today. Oxidative stress induced by hyperglycemia triggers excessive calcium release and deterioration ER homeostasis. ER stress caused by the accumulation of unfolded or misfolded proteins activates apoptotic pathways by activation of JNK, CHOP and caspases (3,9 and 12).

JNK is an important molecule that plays an important role in diseases such as cancer, fibrosis, inflammation, neurodegenerative diseases, obesity and diabetes. SP600125, one of the JNK inhibitors, is often preferred to eliminate the pathological effects of JNK.

In our study; animals divided into 3 groups; C: Control group, with 0.1M citrate buffer with pH 4.2 (n = 9), D: Diabetes group, with a single dose of 50 mg / kg STZ (n = 9), I: Inhibition group, after administration of a single dose of 50 mg / kg STZ intraperitoneal (ip), SP600125 15 mg / kg given once a day for 4 days (n = 9).

It was determined that blood glucose level decreased in group I compared to group D, body and testicular weights, seminiferous tubule diameter and Johnsen score values increased in group I compared to group D. Caspase 3, phospho (p)-JNK, caspase 12 and CHOP values decreased in group I compared to group D.

As a result, JNK inhibitor is effective on ER stress in diabetic testicular tissue. significantly improved testicular damage caused by diabetes and the development of ER stress-induced apoptosis.

Keywords: Diabetes, testis, ER stress, apoptosis, JNK inhibition

KAYNAKLAR

1. WHO. Global Reports. 2016.
2. IDF. IDF Atlas 9th Edition. 2019.
3. Khosravi Z, Sedaghat R, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Diosgenin ameliorates testicular damage in streptozotocin-diabetic rats through attenuation of apoptosis, oxidative stress, and inflammation. *Int Immunopharmacol* 2019;7037-46.
4. Aziz NM, Kamel MY, Mohamed MS, Ahmed SM. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects of zinc supplementation in testes of rats with experimentally induced diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab* 2018;43(10):1010-8.
5. Omolaoye TS, Skosana BT, du Plessis SS. Diabetes mellitus- induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. *Acta Histochem* 2018;120(2):103-9.
6. Omar SS, Aly RG, Badae NM. Vitamin E improves testicular damage in streptozocin-induced diabetic rats, via increasing vascular endothelial growth factor and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Andrologia* 2018;50(3).
7. Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Mohamed M. Down-regulation of steroidogenesis-related genes and its accompanying fertility decline in streptozotocin-induced diabetic male rats: ameliorative effect of metformin. *Andrology* 2019;7(1):110-23.
8. El-Behery EI, El-Naseery NI, El-Ghazali HM, Elewa YHA, Mahdy EAA, El-Hady E, et al. The efficacy of chronic zinc oxide nanoparticles using on testicular damage in the streptozotocin-induced diabetic rat model. *Acta Histochem* 2019;121(1):84-93.
9. Ersoy O, Kizilay G. Effects of fucoidan on diabetic rat testicular tissue. *Biotech Histochem* 2018;93(4):277-85.
10. Wang Q, Yuan X, Li B, Sun D, Liu J, Liu T, et al. Roles of SP600125 in expression of JNK, RANKL and OPG in cultured dental follicle cells. *Mol Biol Rep* 2019;46(3):3073-81.

11. He Z, Chen X, Fu M, Tang J, Li X, Cao H, et al. Inhibition of fowl adenovirus serotype 4 replication in Leghorn male hepatoma cells by SP600125 via blocking JNK MAPK pathway. *Vet Microbiol* 2019;22845-52.
12. Wu J, Liu S, Wang Z, Ma S, Meng H, Hu J. Calcitonin gene-related peptide promotes proliferation and inhibits apoptosis in endothelial progenitor cells via inhibiting MAPK signaling. *Proteome Sci* 2018;1618.
13. Bogoyevitch MA, Arthur PG. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JunK no more? *Biochim Biophys Acta* 2008;1784(1):76-93.
14. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, et al. SP600125, an anthranyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(24):13681-6.
15. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006;7(9):880-5.
16. Köse Ö, Erkekoğlu P, Özyurt B, Gümüşel BK. Endoplazmik retikülüm stresi ve obezite ilişkisine genel bir bakış. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi* 2017;6(2):77-93.
17. Lin T, Lee JE, Kang JW, Shin HY, Lee JB, Jin DI. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Unfolded Protein Response (UPR) in Mammalian Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. *Int J Mol Sci* 2019;20(2).
18. https://www.turkdiaborg/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019pdf 24.06.2020 tarihinde erişildi.
19. Maahs DM WN, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. . Epidemiology of type 1 diabetes. . *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(3)481-97.
20. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care* 2019;42(Suppl 1):S13-S28.
21. Wenzlau JM, Hutton JC. Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2013;13(5):608-15.
22. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J* 2012;27(4):269-73.
23. Swinnen SG, Hoekstra JB, DeVries JH. Insulin therapy for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32 Suppl 2S253-9.
24. 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.
25. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 2009;23(2):245-58.

26. İrer SV, Alper G. Deneysel diyabet modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2004;2(3):127-36.
27. Kurçer Z, Karaoğlu D. Deneysel Diyabet Modellerinde Alloksan ve Streptozotosin Kullanımı. *Turkish Journal of Endocrinology & Metabolism* 2012;16(2).
28. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Derg* 2007;17(4):231-6.
29. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50(6):537-46.
30. Albayrak A, Uyanik MH, Odabasoglu F, Halici Z, Uyanik A, Bayir Y, et al. The effects of diabetes and/or polymicrobial sepsis on the status of antioxidant enzymes and pro-inflammatory cytokines on heart, liver, and lung of ovariectomized rats. *J Surg Res* 2011;169(1):67-75.
31. Raju J, Gupta D, Rao AR, Yadava PK, Baquer NZ. Trigonellafoenum graecum (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes. *Mol Cell Biochem* 2001;224(1-2):45-51.
32. Daniel C, Schaub K, Amann K, Lawler J, Hugo C. Thrombospondin-1 is an endogenous activator of TGF- β in experimental diabetic nephropathy in vivo. *Diabetes* 2007;56(12):2982-9.
33. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F (Editorler). İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi; 2009. s. 175-8.
34. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Editor). Ankara: Palme Yayıncılık; 2011. s. 246-51.
35. Ovalle WK, Nahirney PC. Erkek üreme sistemi (çeviri: S. Solakoğlu, M. Gültomruk). Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Editörler). Netter temel histoloji. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri;2009.s.378.
36. Ross MH, Pawlina W. Erkek üreme sistemi (çeviri: N. Demir). Baykal B (Editör). İlişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji. Ankara: Palme Yayınları;2014.s.787-8.
37. Kierszenbaum AL. Spermatogenez (çeviri: Çiler Çelik Ö, Gökhan A). Ramazan D (Editör). Histoloji ve hücre biyolojisi. Ankara: Palme Yayınları 2014.s.531-50.
38. Niederberger C. Re: Risk of Diabetes According to Male Factor Infertility: A Register-Based Cohort Study. *J Urol* 2018;199(2):330.
39. Kam J, Tsang VH, Chalasani V. Retrograde Ejaculation: A Rare Presenting Symptom of Type 1 Diabetes Mellitus. *Urol Case Rep* 2017;109-10.

40. Rice D, Brannigan RE, Campbell RK, Fine S, Jack L, Jr., Nelson JB, et al. Men's health, low testosterone, and diabetes: individualized treatment and a multidisciplinary approach. *Diabetes Educ* 2008;34 Suppl 597S-112S; quiz 3S-4S.
41. Wessells H, Penson DF, Cleary P, Rutledge BN, Lachin JM, McVary KT, et al. Effect of intensive glycemic therapy on erectile function in men with type 1 diabetes. *J Urol* 2011;185(5):1828-34.
42. Ebokaiwe AP, Ijomone OM, Osawe SO, Chukwu CJ, Ejike C, Zhang G, et al. Alteration in sperm characteristics, endocrine balance and redox status in rats rendered diabetic by streptozotocin treatment: attenuating role of *Loranthus micranthus*. *Redox Rep* 2018;23(1):194-205.
43. Johnson A, Cheng SC, Tsou D, Kong ZL. Attenuation of reproductive dysfunction in diabetic male rats with timber cultured *Antrodia cinnamomea* ethanol extract. *Biomed Pharmacother* 2019;112108684.
44. Riera MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorraga SB. Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297(4):E907-14.
45. Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Human Reproduction* 2002;17(10):2673-7.
46. Nazmy WH, Elbassuoni EA, Ali FF, Rifaai RA. Proinsulin C-peptide as an alternative or combined treatment with insulin for management of testicular dysfunction and fertility impairments in streptozotocin-induced type 1 diabetic male rats. *Journal of cellular physiology* 2019;234(6):9351-7.
47. Popoola B, Ashefor O, Akanni O, Adaramoye O. Biochemical, Hormonal and Histological Changes in Prostate of Wistar Rats Following Long Term Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus. *Niger J Physiol Sci* 2017;32(1):75-84.
48. Shi GJ, Zheng J, Wu J, Qiao HQ, Chang Q, Niu Y, et al. Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on male sexual dysfunction and fertility impairments by activating hypothalamic pituitary gonadal axis in streptozotocin-induced type-1 diabetic male mice. *Endocr J* 2017;64(9):907-22.
49. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79(4):829-43.
50. Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R, Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology* 2006;66(9):2056-67.
51. Wang X, Gu C, He W, Ye X, Chen H, Zhang X, et al. Glucose oxidase induces insulin resistance via influencing multiple targets in vitro and in vivo: The central role of oxidative stress. *Biochimie* 2012;94(8):1705-17.

52. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019;43(6):582-92.
53. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
54. Dinçer GÇ, Oğuz K. Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2016;5(1):86-108.
55. Bahar E, Kim J-Y, Yoon H. Chemotherapy resistance explained through endoplasmic reticulum stress-dependent signaling. *Cancers* 2019;11(3):338.
56. Grzanka R, Damasiewicz-Bodzek A, Kasperska-Zajac A. Tumor necrosis factor-alpha and Fas/Fas ligand signaling pathways in chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2019;1515.
57. Li J, Chen F, Chen Y, Wang Z. Mitochondrial- and Fas-L-mediated pathways involved in quineestrol induced spermatogenic apoptosis in adult rat testes. *Toxicol Mech Methods* 2014;24(9):609-15.
58. Gorlach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(9-10):1391-418.
59. Nishikawa S, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem* 2005;137(5):551-5.
60. Shi J, Jiang Q, Ding X, Xu W, Wang DW, Chen M. The ER stress-mediated mitochondrial apoptotic pathway and MAPKs modulate tachypacing-induced apoptosis in HL-1 atrial myocytes. *PLoS One* 2015;10(2):e0117567.
61. Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, Sasaki K. Novel functions of death-associated protein kinases through mitogen-activated protein kinase-related signals. *International journal of molecular sciences* 2018;19(10):3031.
62. Yung JHM, Giacca A. Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Obesity and Type 2 Diabetes. *Cells* 2020;9(3).
63. Morrison D. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011254. 2012.
64. Grynberg K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ. The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis. *Front Physiol* 2017;8829.
65. Zhou J, Deo BK, Hosoya K, Terasaki T, Obrosova IG, Brosius FC, 3rd, et al. Increased JNK phosphorylation and oxidative stress in response to increased glucose flux through increased GLUT1 expression in rat retinal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(9):3403-10.
66. Hein TW, Xu W, Xu X, Kuo L. Acute and Chronic Hyperglycemia Elicit JIP1/JNK-Mediated Endothelial Vasodilator Dysfunction of Retinal Arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(10):4333-40.

67. Sheng J, Li H, Dai Q, Lu C, Xu M, Zhang J, et al. DUSP1 recuses diabetic nephropathy via repressing JNK-Mff-mitochondrial fission pathways. *J Cell Physiol* 2019;234(3):3043-57.
68. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, et al. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. *Diabetes* 2008;57(2):460-9.
69. Amini N, Boyle JJ, Moers B, Warboys CM, Malik TH, Zakkar M, et al. Requirement of JNK1 for endothelial cell injury in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2014;235(2):613-8.
70. Nishio H, Matsui K, Tsuji H, Tamura A, Suzuki K. Immunohistochemical study of the phosphorylated and activated form of c-Jun NH2-terminal kinase in human aorta. *Histochem J* 2001;33(3):167-71.
71. Razani B, Chakravarthy MV, Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37(3):603-21, viii.
72. Hreniuk D, Garay M, Gaarde W, Monia BP, McKay RA, Cioffi CL. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 2001;59(4):867-74.
73. Rashid K, Sil PC. Curcumin ameliorates testicular damage in diabetic rats by suppressing cellular stress-mediated mitochondria and endoplasmic reticulum-dependent apoptotic death. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(1):70-82.
74. Karna KK, Shin YS, Choi BR, Kim HK, Park JK. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response in Male Reproductive Physiology and Pathology: A Review. *World J Mens Health* 2019.
75. Cicenias J. JNK inhibitors: is there a future? *MAP Kinase* 2015;4(1).
76. Mili D, Abid K, Rjiba I, Kenani A. Effect of SP600125 on the mitotic spindle in HeLa Cells, leading to mitotic arrest, endoreduplication and apoptosis. *Mol Cytogenet* 2016;986.
77. Zhang Y, Li F, Liu S, Wang H, Mahavadi S, Murthy KS, et al. MEKK1-MKK4-JNK-AP1 pathway negatively regulates Rgs4 expression in colonic smooth muscle cells. *PLoS One* 2012;7(4):e35646.
78. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002;420(6913):333-6.
79. Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem* 2002;277(33):30010-8.
80. Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Aabenhus Andersen N, Serup P, Dragsbaek Madsen O, et al. The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2000;49(9):1468-76.

81. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, et al. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* 2004;10(10):1128-32.
82. Lanuza-Masdeu J, Arevalo MI, Vila C, Barbera A, Gomis R, Caelles C. In vivo JNK activation in pancreatic beta-cells leads to glucose intolerance caused by insulin resistance in pancreas. *Diabetes* 2013;62(7):2308-17.
83. Wilhelm M, Xu Z, Kukekov NV, Gire S, Greene LA. Proapoptotic Nix activates the JNK pathway by interacting with POSH and mediates death in a Parkinson disease model. *J Biol Chem* 2007;282(2):1288-95.
84. Singh R, Wang Y, Xiang Y, Tanaka KE, Gaarde WA, Czaja MJ. Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology* 2009;49(1):87-96.
85. Ijaz A, Tejada T, Catanuto P, Xia X, Elliot SJ, Lenz O, et al. Inhibition of C-jun N-terminal kinase improves insulin sensitivity but worsens albuminuria in experimental diabetes. *Kidney Int* 2009;75(4):381-8.
86. Liu Y, Wang Y, Miao X, Zhou S, Tan Y, Liang G, et al. Inhibition of JNK by compound C66 prevents pathological changes of the aorta in STZ-induced diabetes. *J Cell Mol Med* 2014;18(6):1203-12.
87. Pan Y, Zhang X, Wang Y, Cai L, Ren L, Tang L, et al. Targeting JNK by a new curcumin analog to inhibit NF- κ B-mediated expression of cell adhesion molecules attenuates renal macrophage infiltration and injury in diabetic mice. *PLoS One* 2013;8(11):e79084.
88. Zhang C, Tang Y, Li Y, Xie L, Zhuang W, Liu J, et al. Unfolded protein response plays a critical role in heart damage after myocardial ischemia/reperfusion in rats. *PLoS One* 2017;12(6):e0179042.
89. Lou L, Hu D, Chen S, Wang S, Xu Y, Huang Y, et al. Protective role of JNK inhibitor SP600125 in sepsis-induced acute lung injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;12(2):528-38.
90. Bulut G, Kurdoglu Z, Donmez YB, Kurdoglu M, Erten R. Effects of JNK inhibitor on inflammation and fibrosis in the ovary tissue of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(8):8774-85.
91. Kushwaha S, Jena GB. Enalapril reduces germ cell toxicity in streptozotocin-induced diabetic rat: investigation on possible mechanisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012;385(2):111-24.
92. Topcu-Tarladacalisir Y, Kanter M, Uzal MC. Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. *Arch Toxicol* 2009;83(8):735-46.
93. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1(1):2-25.

94. 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.
95. Franca LR, Suescun MO, Miranda JR, 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.
96. 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.
97. 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.
98. Malavige LS, Jayaratne SD, Kathriarachchi ST, Sivayogan S, Ranasinghe P, Levy JC. Erectile dysfunction is a strong predictor of poor quality of life in men with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2014;31(6):699-706.
99. Mikhailichenko VV, Tiktinskii OL, Sil'nitskii PA, Vorokhobina NV, Aleksandrov VP. [The pathogenesis of sexual disorders in men with diabetes mellitus]. *Urol Nefrol (Mosk)* 1993(2):47-50.
100. Salama N. Sexual dysfunctions as self-reported by diabetic-type-2 men: An andrology clinic-based study in Alexandria, Egypt. *American Journal of Medical and Biological Research* 2013;1(3):50-7.
101. Kim KJ, Yoon KY, Lee BY. Low molecular weight fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses inflammation by promoting the inhibition of mitogen-activated protein kinases and oxidative stress in RAW264.7 cells. *Fitoterapia* 2012;83(8):1628-35.
102. Lee MW, Kwon JE, Lee YJ, Jeong YJ, Kim I, Cho YM, et al. *Prunus mume* leaf extract lowers blood glucose level in diabetic mice. *Pharm Biol* 2016;54(10):2135-40.
103. Roy S, Metya SK, Rahaman N, Sannigrahi S, Ahmed F. Ferulic acid in the treatment of post-diabetes testicular damage: relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of TGF-beta1, IL-1beta and Akt signalling. *Cell Biochem Funct* 2014;32(1):115-24.
104. Nakamura T, Arduini A, Baccaro B, Furuhashi M, Hotamisligil GS. Small-molecule inhibitors of PKR improve glucose homeostasis in obese diabetic mice. *Diabetes* 2014;63(2):526-34.
105. Hein TW, Xu X, Ren Y, Xu W, Tsai SH, Thengchaisri N, et al. Requisite roles of LOX-1, JNK, and arginase in diabetes-induced endothelial vasodilator dysfunction of porcine coronary arterioles. *J Mol Cell Cardiol* 2019;13182-90.
106. Bigagli E, Luceri C, Dicembrini I, Tatti L, Scavone F, Giovannelli L, et al. Effect of Dipeptidyl-Peptidase 4 Inhibitors on Circulating Oxidative Stress Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Antioxidants (Basel)* 2020;9(3).

107. Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev* 2014;10(3):147-57.
108. 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. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020;1866(1):165577.
109. Malavige LS, Jayaratne SD, Kathriarachchi ST, Sivayogan S, Fernando DJ, Levy JC. Erectile dysfunction among men with diabetes is strongly associated with premature ejaculation and reduced libido. *J Sex Med* 2008;5(9):2125-34.
110. Adedara IA, Fasina OB, Ayeni MF, Ajayi OM, Farombi EO. Protocatechuic acid ameliorates neurobehavioral deficits via suppression of oxidative damage, inflammation, caspase-3 and acetylcholinesterase activities in diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2019;125:170-81.
111. 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.
112. Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl* 2004;25(5):706-19.
113. Costanzo PR, Suarez SM, Scaglia HE, Zylbersztein C, Litwak LE, Knoblovits P. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in eugonadal men with type 2 diabetes mellitus. *Andrology* 2014;2(1):117-24.
114. Long L, Qiu H, Cai B, Chen N, Lu X, Zheng S, et al. Hyperglycemia induced testicular damage in type 2 diabetes mellitus rats exhibiting microcirculation impairments associated with vascular endothelial growth factor decreased via PI3K/Akt pathway. *Oncotarget* 2018;9(4):5321-36.
115. Qadiri A, Mirzaei Babil F, Hamidian G, Zavvari Oskuye Z, Ahmadi M, Oghbaei H, et al. Administration of troxerutin improves testicular function and structure in type-1 diabetic adult rats by reduction of apoptosis. *Avicenna J Phytomed* 2019;9(4):374-85.
116. Roy VK, Chenkual L, Gurusubramanian G. Protection of testis through antioxidant action of *Mallotus roxburghianus* in alloxan-induced diabetic rat model. *J Ethnopharmacol* 2015;176:268-80.
117. Donmez YB, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Acta Cir Bras* 2014;29(10):644-50.
118. Andreozzi F, D'Alessandris C, Federici M, Laratta E, Del Guerra S, Del Prato S, et al. Activation of the hexosamine pathway leads to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 and impairs the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin insulin biosynthetic pathway in RIN pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2004;145(6):2845-57.

119. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* 2013;339(6116):218-22.
120. Bayram S, Kizilay G, Topcu-Tarlacalisir Y. Evaluation of the Fas/FasL signaling pathway in diabetic rat testis. *Biotech Histochem* 2016;91(3):204-11.
121. Lim AK, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Young MJ, Bennett BL, et al. Evaluation of JNK blockade as an early intervention treatment for type 1 diabetic nephropathy in hypertensive rats. *Am J Nephrol* 2011;34(4):337-46.
122. 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.
123. Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol* 2007;23(4):578-87.
124. 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.
125. Skibba M, Zhang C, Jiang X, Xin Y, Cai L. Preventive effect of non-mitogenic acidic fibroblast growth factor on diabetes-induced testicular cell death. *Reprod Toxicol* 2014;49:136-44.
126. 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.
127. 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.
128. Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. Deneysel diyabetin sıçan testislerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2002;22(2):173-8.
129. Altay B, Cetinkalp S, Doganavsargil 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 Suppl 2828-31.
130. 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.
131. Jiang X, Bai Y, Zhang Z, Xin Y, Cai L. Protection by sulforaphane from type 1 diabetes-induced testicular apoptosis is associated with the up-regulation of Nrf2 expression and function. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;279(2):198-210.
132. Khavarimehr M, Nejati V, Razi M, Najafi G. Ameliorative effect of omega-3 on spermatogenesis, testicular antioxidant status and preimplantation embryo development in

- streptozotocin-induced diabetes in rats. *International urology and nephrology* 2017;49(9):1545-60.
133. Zhang FQ, Lu W, Yuan WX, Li X. Regulation of c-Jun N-Terminal Protein Kinase (JNK) Pathway in Apoptosis of Endothelial Outgrowth Cells Induced by Asymmetric Dimethylarginine. *Med Sci Monit* 2017;232535-42.
 134. Faid I, Al-Hussaini H, Kilarkaje N. Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-Jun N-terminal kinase signaling in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;289(3):482-94.
 135. Pan Y, Wang Y, Zhao Y, Peng K, Li W, Wang Y, et al. Inhibition of JNK phosphorylation by a novel curcumin analog prevents high glucose-induced inflammation and apoptosis in cardiomyocytes and the development of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2014;63(10):3497-511.
 136. Chen Q, Xu T, Li D, Pan D, Wu P, Luo Y, et al. JNK/PI3K/Akt signaling pathway is involved in myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats: effects of salvianolic acid A intervention. *Am J Transl Res* 2016;8(6):2534-48.
 137. Jiang X, Zhang C, Xin Y, Huang Z, Tan Y, Huang Y, et al. Protective effect of FGF21 on type 1 diabetes-induced testicular apoptotic cell death probably via both mitochondrial- and endoplasmic reticulum stress-dependent pathways in the mouse model. *Toxicol Lett* 2013;219(1):65-76.
 138. Shi W, Guo Z, Ji Y, Feng J. The protective effect of recombinant globular adiponectin on testis by modulating autophagy, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2020;879:173132.
 139. 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;12464-80.
 140. Du Z, Xu S, Hu S, Yang H, Zhou Z, Sidhu K, et al. Melatonin attenuates detrimental effects of diabetes on the niche of mouse spermatogonial stem cells by maintaining Leydig cells. *Cell Death Dis* 2018;9(10):968.
 141. Zhao YT, Qi YW, Hu CY, Chen SH, Liu Y. Advanced glycation end products inhibit testosterone secretion by rat Leydig cells by inducing oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Int J Mol Med* 2016;38(2):659-65.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller	No
Şekil 1. Endoplazmik retikulum stresini gösteren şekil	15
Şekil 2. Mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz sinyal yolağını gösteren şekil	16
Şekil 3. Endoplazmik retikulum stresi ve apoptozisi gösteren şekil	17
Şekil 4. JNK inhibisyonunu gösteren şekil	18
Şekil 5. Obezite, diyabet ve JNK ilişkisini gösteren şekil.....	19
Şekil 6. Kan glukoz değerlerini gösteren şekil.....	26
Şekil 7. Vücut ve testis ağırlığını gösteren şekil	27
Şekil 8. Seminifer tübül çaplarını gösteren şekil.....	28
Şekil 9. Gruplara ait H-E bulguları ve Johnsen skor sonuçlarını gösteren şekil	30
Şekil 10. Gruplara ait kaspaz 3 bulgularını gösteren şekil	32
Şekil 11. Gruplara ait f-JNK bulgularını gösteren şekil	34
Şekil 12. Gruplara ait kaspaz 12 bulgularını gösteren şekil	36
Şekil 13. Gruplara ait CHOP bulgularını gösteren şekil	38

TABLolar LİSTESİ

Tablolar	No
Tablo 1. Diyabet modeli oluşturmak için sıklıkla tercih edilen STZ dozları.....	7
Tablo 2. Johnsen skoru değerlendirmesi.....	22

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Siirt'in Baykan ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğretimini İstanbul'da tamamladıktan sonra, 2007 yılında başladığı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2015 yılında mezun oldu. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 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: 2018/03

Karar Tarihi: 30.03.2018

Karar No: 2018.03.06

Hayvan Sayısı ve Cinsi: 40 adet sıçan

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Gülnur Kızılay ÖZFİDAN'ın yaptığı, Uzm. Biol. Şinasi BAYRAM'ın Doktora tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2018/13 protokol nolu "JNK İnhibisyonunun Diyabetik Testis Dokularındaki Endoplazmik Retikulum Stresini Etkisi" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi 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

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

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

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

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

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

Ayhan YILMAZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır