



T. C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN
DİABETES MELLİTUSUN SEBEP OLDUĞU TESTİKÜLER
OKSİDATİF HASARA KARŞI HİDROKSİTİROSOLÜN
KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Bio. Defne Rana OĞUZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Meryem ÇAM

Düzce, 2020



T. C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN
DİABETES MELLİTUSUN SEBEP OLDUĞU TESTİKÜLER
OKSİDATİF HASARA KARŞI HİDROKSİTİROSOLÜN
KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Bio. Defne Rana OĞUZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Meryem ÇAM

Düzce, 2020

Form:6

KABUL VE ONAY

Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Sıçanlarda Streptozotosin ile İndüklenen Diabetes Mellitusun Sebep Olduğu Testiküler Oksidatif Hasara
Karşı Hidroksitirozolün Koruyucu Rolünün Araştırılması”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 24/01/2020

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Meryem ÇAM
Düzce Üniversitesi
Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR
Düzce Üniversitesi
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Tülin FIRAT
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Üye



Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 20/02/2020 tarih ve 2020/34 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Adnan ÖZÇETİN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarih

İmza

Defne Rana OĞUZ



ÖZET

SIÇANLARDA STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİABETES MELLİTUSUN SEBEP OLDUĞU TESTİKÜLER OKSİDATİF HASARA KARŞI HİDROKSİTİROZOLÜN KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Defne Rana OĞUZ

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embrioloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Prof. Dr. Meryem ÇAM

Ocak 2020, 104 sayfa

Diabetes Mellitus, insülin yetmezliğine veya direncine bağlı olarak gelişen, organ ve işlev kayıplarına yol açabilen, yüksek morbidite ve mortalite hızı, yüksek tedavi harcamaları ve iş gücü kaybı nedeni ile topluma sosyoekonomik yük getiren metabolik bir hastalıktır. Hidroksitirozol zeytin bitkisinde yaygın olarak bulunan güçlü bir doğal serbest radikal baskılayıcısıdır. Yapılmış olan bu çalışma ile Diabetes Mellitus'un sıçan testisleri ve bazı biyokimyasal parametreler üzerine olası olumsuz etkilerine karşı hidroksitirozolün koruyucu rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Deneyde, Kontrol, Hidroksitirozol, Streptozotosin, Hidroksitirozol + Streptozotosin olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Diyabet modeli oluşturmak için tek doz 55 mg/ kg/ i.p. streptozotosin uygulaması yapıldı. STZ enjeksiyonundan 42 saat sonra kan glukoz değerleri ölçülerek 250 mg/ dL ve üstü olan ratlar diyabet olarak kabul edildi. STZ + HT ve HT grubuna 30 gün boyunca 10 mg/ kg/ i.p. HT uygulaması yapıldı. Sıçanların deney öncesi ve deney sonu vücut ağırlıkları, açlık kan şekerleri ölçülüp karşılaştırıldı. Testosteron düzeyleri ölçülmek üzere kan örnekleri toplandı. Testisler çıkarılıp ağırlıkları kaydedildi ve Testis Ağırlık İndeksi hesaplandı. Testislerde mikroskopik ve morfolojik incelemeler yapıldı. Sperm parametrelerinin analizi için epididimisten spermatozoa aspire edilerek spermiyogram yapıldı. Deney sonunda; Hidroksitirozol verilen gruplarda diyabetle birlikte artan açlık kan şekerinin azaldığı görüldü. Histolojik incelemelerde, Diyabet grubunda düzensiz şekilli seminifer tübüller, germ hücre tabakalarında azalma, apoptotik hücreler ve rezidüel cisimcikler saptandı. STZ + HT grubunda ise morfolojik düzelmeler görüldü. İmmünohistokimyasal incelemelerde, Diyabet grubunda kontrol grubuna göre Nrf2 ekspresyonunda bir artış olduğu gözlenirken tedavi grubunda ekspresyonunun STZ grubuna kıyasla daha az olduğu belirlendi. Hidroksitirozolün T1DM artan kan şekerini azalttığı, testiste oluşan hasara karşı koruyucu etki gösterdiği ve Nrf2 ekspresyonunu azalttığı gözlemlendi.

Anahtar sözcükler: Diyabet, Hidroksitirozol, Kısırlık, Nrf2, Testis

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE ROLE OF HYDROXYTIROSOL AGAINST TESTICULAR OXIDATIVE INJURY DUE TO DIABETES MELLITUS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN IN RATS

Defne Rana OĞUZ

Master's Thesis, Department of Histology and Embryology

Supervisor Prof. Dr. Meryem ÇAM

January 2020, 104 pages

Diabetes Mellitus is a metabolic disease caused by insufficiency or resistance of insulin, which may lead to organ and function losses, high morbidity and mortality rate, high treatment expenditures and labor loss due to the society. Hydroxytyrosol is a powerful natural free radical suppressor commonly found in olive plants. The aim of this study was to investigate the protective role of hydroxytyrosol against possible adverse effects of Diabetes Mellitus on rat testes and some biochemical parameters. In the experiment, 4 groups were formed as Control, Hydroxytyrosol, Streptozotocin, Hydroxytyrosol + Streptozotocin. A single dose of 55 mg / kg / i.p. streptozotocin was applied. Blood glucose values were measured 42 hours after STZ injection and rats with 250 mg / dL and above were accepted as diabetes. STZ + HT and HT group 10 mg / kg / i.p. HT was applied for 30 days. The rats' body weights, fasting blood sugars before and after the experiment were measured and compared. Blood samples were collected to measure testosterone levels. Testes were removed and their weights were recorded and Testis Weight Index was calculated. Microscopic and morphological examinations were performed in the testes. For the analysis of sperm parameters, spermiogram was performed by aspirating spermatozoa from epididymis. At the end of the experiment; It was seen that fasting blood sugar decreased with diabetes in groups treated with hydroxytyrosol. Histologic examination revealed irregularly shaped seminiferous tubules, decreased germ cell layers, apoptotic cells and residual bodies in the diabetes group. Morphological improvements were seen in STZ + HT group. Immunohistochemical examinations showed an increase in Nrf2 expression in the Diabetes group compared to the control group, whereas the expression in the treatment group was less than in the STZ group. It was observed that hydroxytyrosol reduced T1DM increased blood sugar, had protective effect against testicular damage and decreased Nrf2 expression.

Keywords: Diabetes Mellitus, Hydroxytyrosol, Infertility, Nrf2, Testes

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji bölümünde almış olduğum Yüksek Lisans eğitimim süresince, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım başta tez danışmanım ve aynı zamanda Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Meryem ÇAM hocama ve hem akademik hem de insani yönüyle kısa sürede bana çok şey katan Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU hocama ve diğer saygıdeğer hocam; Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan Karaçor'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitim sürecimi daha eğlenceli hale getiren ve beraber başladığımız bu süreçte karşımıza çıkan zorlukları birlikte aştığımız, hayatımda önemli bir yer tutan bölüm arkadaşlarım, Nurhilal Elciyar, Semiha Türe ve Nurcan Şahan'a geçen güzel günlerden dolayı çok teşekkür ederim.

Bu projeyi finansal olarak destekleyen Düzce Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: 2019.04.01.906) teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve güler yüzüyle her aşamada yardımcı olmaya çalışan Ali GÖK hocama teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayarak her zaman arkamda olan annem Ayşe KAHRAMAN'a, sabır ve sevgisiyle desteğini hissettiren ikinci annem Emine OĞUZ'a, dokuz yılı aşkın bir süredir nazımı sözümü çeken eşim Selim Erkan OĞUZ'a ve bu çalışmayı yaparken desteğini benden hiç esirgemeyen kızım Miray Betül OĞUZ'a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Defne Rana OĞUZ

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Anatomisi	3
2.2. Testis Embriyolojisi	5
2.3. Testis Histolojisi.....	7
2.3.1. Sertoli hücreleri.....	9
2.3.2. Spermatojenik seri hücreleri (Germ hücreleri)	10
2.3.3. Üreme sisteminin düzenlenmesi	16
2.3.4. Genital kanallar	18
2.4. Testis Fizyolojisi	21
2.5. Diabetes Mellitus (DM)	24
2.5.1. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması	26
2.5.2. İnsülin	28
2.5.3. Diabetes mellitus ve erkek infertilitesi	32
2.5.4. Serbest radikaller	33
2.5.5. Diabetes mellitus'a bağlı oksidatif stres	35
2.5.6. Testis ve diabetes mellitus	36
2.5.7. Testis ve oksidatif stres	38
2.5.8. Deneysel diyabet modelleri	40
2.5.9. Streptozotosin (STZ).....	41
2.5.10. Nükleer faktör erythroid 2 (NFE2)- düzenleyici faktör 2 (Nrf2).....	43
2.5.11. Nrf2 ve oksidatif stres	45
2.5.12. Nrf2 ve diyabet	46
2.6. Hidroksitirosol (HT).....	46
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	53
3.1. Deney Hayvanları.....	53

3.2.	Deney Grupları.....	53
3.3.	Diyabet Oluşturma Modeli.....	55
3.4.	Hidrositirozolün Hazırlanması	55
3.5.	Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı	56
3.6.	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)	56
3.7.	Sitrat Tamponu.....	56
3.8.	İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulaması.....	56
3.9.	Işık Mikroskopik İncelemeleri	56
3.9.1.	Hematoksilen-Eozin boyaması	57
3.9.2.	Gomori Trikrom boyaması	58
3.9.3.	PAS boyama	59
3.9.4.	Semen analizi (Spermiyogram)	60
3.10.	İmmünohistokimyasal İncelemeler	61
3.10.1.	Nrf2 İmmün işaretleme	61
3.11.	Biyokimyasal İncelemeler.....	62
3.11.1.	Testosteron seviyesinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi.....	62
3.12.	İstatistiksel Analiz.....	65
4.	BULGULAR	66
4.1.	Vücut Ağırlıkları ve Su Tüketimi Parametresi.....	66
4.2.	Kan Şekeri Düzeyi Sonuçları	68
4.3.	Üreme Organı Ağırlıkları	69
4.4.	Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) Analizi.....	70
4.5.	Spermatolojik Parametreler.....	71
4.6.	Morfolojik Bulgular	72
4.6.1.	Histolojik bulgular	72
4.6.2.	İmmünohistokimyasal bulgular	79
4.6.3.	Biyokimyasal bulgular	82
5.	TARTIşMA VE SONUÇLAR	83
6.	KAYNAKLAR	90
	Dizin Kaynakları	105
7.	EKLER	106
7.1.	EK-1	106
ÖZGEÇMİş	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Testisin erkek üreme sistemindeki anatomik görünümü.	4
Şekil 2 Testisin sagittal kesitinin gösterimi.	5
Şekil 3 Spermiogenezin farklı evreleri ve olgun bir sperm yapısı	16
Şekil 4 Erkek üremenin pozitif ve negatif geri bildirimle düzenlenmesi	18
Şekil 5 İnsülin biyosentezi, işleme ve depolamanın hücre içi yolları	29
Şekil 6 Glikozun insülin sekresyonunu uyardığı hücre içi mekanizmalar..	31
Şekil 7 İnsan sperm hücresinin şematik gösterimi..	32
Şekil 8 Keap1 – Nrf2 sistemi ile pankreatik β hücresi koruması.	45
Şekil 9 Hidroksitirozolün iç ve dış metabolizması arasındaki karşılaştırma.....	48
Şekil 10 Hidroksitirozol'ün olası etkileri.	52
Şekil 11 Deney hayvanlarının sakrifiye edilmesi ve sonrasındaki doku takipinden kesitler.....	54
Şekil 12 Semen Analizi aşamaları	60
Şekil 13 ELİSA plakalarında meydana gelen renk değişimi.	64
Şekil 14 Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü.	72
Şekil 15 HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü.	73
Şekil 16 STZ grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü	73
Şekil 17 STZ-HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü.....	74
Şekil 18 Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü.	74
Şekil 19 HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü	75
Şekil 20 STZ grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü	75
Şekil 21 STZ+HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü.....	76
Şekil 22 Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü	76
Şekil 23 HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü	77
Şekil 24 STZ grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü	77
Şekil 25 STZ+HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü.....	78
Şekil 26 Gruplara ait sperm görüntüleri	79
Şekil 27 Tüm gruplara ait testis, Nrf2 immün işaretleme.....	80

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1 Diyabetik rat modeli, deney grupları, maddeler ve veriliş yolları	55
Tablo 2 Deneyin 1, 3, 7, 14, 21, 28 ve 30. günlerinde tartılan deneklerin vücut ağırlıkları.....	66
Tablo 3 Deney süresince ölçülen glukoz seviyeleri.....	68
Tablo 4 Deney gruplarının testis ağırlıkları	70
Tablo 5 Testis Ağırlık İndeksi.....	71
Tablo 6 Toplam Sperm sayıları.....	71
Tablo 7 Hareketli Sperm Sayıları.....	71



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1 Deneyin başındaki ve sonundaki vücut ağırlıkları	67
Grafik 2 Deney süresi boyunca tüketilen su miktarları	67
Grafik 3 Her bir grubun deney süresince kendi içinde karşılaştırılması	69
Grafik 4 Her bir grubun deney süresince kendi içinde karşılaştırılması	69
Grafik 5 Grupların testis ağırlıkları	70
Grafik 6 Grupların TAI değerleri	70
Grafik 7 Grupların sperm sayılarına ait grafik	71
Grafik 8 Testis Ölçümleri	82



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADA	:	Amerikan Diyabet Birliği
ADP	:	Adenozin difosfat
AP1	:	Aktive edici protein 1
ARE	:	Antioksidan tepki elemanı
AMH	:	Anti Mülleriyan Hormon
ABP	:	Androjen Bağlayıcı Protein
Ad	:	Tip A koyu spermatogonium
Ap	:	Tip A açık spermatogonium
bzip	:	basic-region leucine zipper
Ca²⁺	:	Kalsiyum
CAT	:	Katalaz
cDNA	:	Komplementer (tamamlayıcı) DNA
Cl	:	Klor
CLA-1	:	Lipoprotein reseptör proteini
cm	:	Santimetre
CNC	:	cap'n'collar
CO	:	Karbon monoksitin
dH₂O	:	Distile su
DHT	:	Dihidrotestosteron
dL	:	Desilitre
DM	:	Diabetes Mellitus
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
DOPET	:	3,4- dihydroxyphenylethanol
DÜHAM	:	Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi
EFSA	:	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu

ER	:	Endoplazmik retikulum
EVOO	:	Sızma zeytinyağı
FPG	:	Açlık Plazma Glukozu
FRA	:	Fruktozamin
FSH	:	Folikül Stimulan Hormon
GDNF	:	Glial hücre kökenli nörotrofik faktör
GDM	:	Gestasyonel Diabetes Mellitus
GLUT	:	Glukoz taşıyıcı
GLUT1	:	Glukoz taşıyıcı 1
GLUT2	:	Glukoz taşıyıcı 2
GLUT3	:	Glukoz taşıyıcı 3
GLUT5	:	Glukoz taşıyıcı 5
GPxs	:	Glutasyon-peroksidaz
GR	:	Glutasyon redüktaz
GSH	:	Glutasyon
GSTπ	:	Glutasyon S- Transferaz
H⁺	:	Hidrojen
HCO₃⁻	:	Bikarbonat
hCG	:	Humon Koryonik Gonodotropin
HE	:	Hematoksilen- Eozin
HLA	:	İnsan lökosit antijeni
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
HO-1	:	Hemeoksigenaz- 1
HT	:	Hidroksitirozol
IGFI	:	İnsülin benzeri faktör- 1
IUPAC	:	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Sistemi Birliği

IRS	:	İnsülin reseptör substratları
IVF	:	İn vitro fertilizasyon
IHC	:	İmmünohistokimya
ip	:	İntraperitoneal
K_{ATP}	:	ATP'ye duyarlı potasyum kanalı
kDa	:	Kilodalton
Keap1	:	Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1
L	:	Litre
LA	:	Langerhans adası
LDL	:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	:	Luteinizan Hormon
LPO	:	Lipit Peroksidasyonu
Maf	:	Muskulonörotik Fibrosarkom
MafF, MafG, MafK	:	Maf proteinleri
mg	:	Miligram
Mg	:	Magnezyum
mL	:	Mililitre
mmol	:	Milimol
MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
Na⁺	:	Sodyum
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotidi
Nad(P)H	:	Nikotinamid Adenin Dinükleik Fosfat
Nad(P)H NQO1	:	Nad(P)H Kinon Dehidrogenaz-1
NadH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleosid
Neh	:	Nrf2- ECH homologisi
NF- E2	:	Nükleer faktör eritroid 2

NF-kB	:	Nükleer faktör Kabba B
NO	:	Nitrik Oksit
Nrf2	:	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör
O₂⁻	:	Süperoksit
OH-	:	Hidroksil Radikali
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
OS	:	Oksidatif stres
PARP	:	Poli (ADP- riboz) polimeraz
PAS	:	Periodic Acid Schiff
Prdx	:	Peroksiredoksinler
ROO	:	Peroksil
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
RNS	:	Reaktif nitrojen türleri
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
RS	:	Reaktif tür
SCF	:	Stem hücre faktörü
SF-1	:	Steroidogenik faktör- 1
SF	:	Serum fizyolojik
sMAF	:	Küçük muskuloonörotik fibrosarkom
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri
SR	:	Serbest radikal
SRY	:	Sex Deteminig Factor
STZ	:	Streptozotosin
T1DM	:	Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	:	Tip 2 Diabetes Mellitus

TAİ	:	Testis Ağırlık İndeksi
TDF	:	Testis Determinig Factor
U	:	Ünite
VOO	:	Naturel birinci zeytinyağı
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
WT 1	:	Wilms Tümörü- 1
µm	:	Mikrometre
α	:	Alfa
β	:	Beta
~	:	Yaklaşık olarak

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM), yetersiz insülin sekresyonu veya insülin direncine bağlı olarak oluşan hiperglisemi ile ortaya çıkar¹. Kan glikoz düzeyindeki kronik artış ile karakterize edilen Diabetes Mellitus (DM), dünyadaki milyonlarca kişiyi etkileyen yaygın bir metabolik hastalıktır. Bu hastalık tip I ve tip II olarak sınıflandırılır². Tip I DM (T1DM)'de gözlenen ana patolojik etkiler, pankreasta Langerhans adacıklarındaki insülin üreten β hücrelerinin kaybını ve ardından insülin eksikliğini içerir³. İkinci ve daha yaygın bir kategori olan tip II DM (T2DM), insülin etkisine direnç ve yetersiz insülin üretimi ile karakterize edilir. Tip I DM çoğunlukla çocuklarda ve ergenlerde en yaygın diyabet tipi olmasına rağmen, tip II DM (T2DM), yetişkinlerde daha yaygındır⁴.

Erkeklerde ise, artmış oksidatif strese bağlı olarak testislerde, germ hücrelerinde apoptozisde artış meydana gelmekte ve testiküler fonksiyon bozuklukları ortaya çıkmaktadır⁵. Diabetes Mellitus (DM), hiperlipidemi ve inflamasyonu, reaktif oksijen veya nitrojen türlerinin (ROS veya RNS) oluşumunu uyarır. Bu türlerin ekstrasenerasyonu veya yetersiz endojen antioksidan savunmaları, organlarda oksidatif strese neden olur. Bu nedenle, ekstra ROS ve / veya RNS oluşumunu önlemek veya endojen antioksidanları arttırmak, DM ile ilişkili erkek infertilitesi dahil olmak üzere diyabetik komplikasyonların önlenmesinde önemli olacaktır. Bununla birlikte, hayvan deneylerinde ve klinik çalışmalarda, bir veya birkaç antioksidanın ekzojen takviyesi, insan diyabetik komplikasyonları üzerinde önemli bir terapötik etki gösterememiştir. Bu nedenle, endojen antioksidanların düzenlenmesi üzerine kurulacak bir strateji, diyabetik komplikasyonları önlemek için daha etkili bir yaklaşım olabilir⁶. Bununla beraber günümüzde biyolojik sistemlerde serbest radikallerin patolojik sonuçlarının azaltılması için, antioksidan besinlerin kullanımına giderek artan bir ilgi vardır.

Antioksidan aktiviteye sahip bitki kaynaklı geniş bir bileşik sınıfı, meyve ve sebzelerde, şarap, çay, çikolata, kakao ürünlerinden ortaya çıkan fenollerle temsil edilmektedir⁶. Bu fenollerden biride hidrokstitirosoldür. HT, zeytin ve zeytinyağında bulunan, oleuropeinin başlıca parçalanma ürünü olan doğal - güçlü fenolik bir antioksidandır. Hidrokstitrosol antioksidan rolünü, serbest radikalleri doğrudan yakalayarak ya da antioksidan enzimleri aktive eden bir dizi tepkime aracılığıyla onları parçalayarak ortaya koymaktadır⁷.

Antioksidan yanıtın bir "ana düzenleyicisi" olarak karşımıza çıkan Nrf2, faz II metabolik ve antioksidan enzimler de dahil olmak üzere çok çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen ve dolayısıyla oksidatif stres aracılı bozuklukların önlenmesinde önemli rol oynayan bir protein olarak kabul edilir⁸. Daha önce yapılan çalışmalarla çeşitli dokularda hidroksitirosolün Nrf2 ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir⁹ ancak DM'ye maruz kalmış sıçanlara hidroksitirosol uygulaması sonrası testisdeki, kan testosteron seviyesi, doku düzeyinde Nrf2 ekspresyonu değişimi ve sperm sayısı, sperm morfolojisi araştırılmayı bekleyen orijinal bir konudur.



2. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi; spermatogenezin devamı için gerekli olan testosteronu salgılayan, testis ile spermin depolanması ve taşınmasından sorumlu olan genital kanallar, aksesuar genital bezler ve penisten oluşur^{10,11}.

2.1. Testis Anotomisi

Testis, vücut boşluğu dışındaki scrotum içinde yer alan, erkek üreme hücrelerinin (spermium) yapıldığı elips şekilli bir çift organdır. Testisin bu konumu spermatogenez için gerekli olan düşük ısıya imkan verir¹². Testisler, skrotum içinde funiculus spermaticusla (spermatik kordon) asılı halde bulunurlar. Funiculus spermaticus; vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içerir¹². Her biri yaklaşık 4 x 3 cm büyüklüğünde, 3 cm çapında ve 10 - 15 gr ağırlığında olan testislerden sağ taraftaki sola göre genellikle 1 cm. daha yukarıdadır^{13,14}. Testisin 2 / 3 olan anterolateral bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür¹³. Testislerin bir üst ve bir alt ucu (extremitas superior ve extremitas inferior) vardır¹⁴. Üst ucu öne ve dışa, alt ucu ise arkaya ve içe doğru bakar¹³. Ön ve arka kenar (margines anterior ve margines posterior) tam olarak ayırt edilemez ve bu yüzden net olarak belirlenemeyen bir medial ve bir lateral (facies medialis ve facies lateralis) yüze sahiptir¹⁴. Testislerin üst ucunda appendix testis adı verilen küçük, yassı bir yapı görülür. Bu yapı Paramesonephric kanalın üst ucunun kalıntısıdır¹³.

Testisler fetal hayatta abdominal boşluk içinde bulunur. Doğumdan önce canalis inguinalisden geçerek scrotuma iner¹⁵. Bu iniş sırasında beraberlerinde karın ön duvarında bulunan kan damarlarını, lenf damarlarını, otonomik sinirleri ve tunika vaginalis olarak isimlendirilen periton uzantısını da sürüklerler¹¹. Tunika vaginalis testis yapısının lamina visceralis ve lamina parietalis olmak üzere iki yaprağı vardır. İki yaprak arasında potansiyel bir boşluk olan cavum scrotide çok az miktarda seröz bir sıvı bulunur. Bu sıvı testislerin scrotum içerisinde kolayca hareket etmelerini sağlar¹⁶.

Tunica vaginalis testisin iç tarafında da, testisleri saran iki tabaka daha vardır. Bunlar tunica albuginea ve tunica vasculosadır¹³.

Tunica albuginea, testisi kalın bir bağ dokusu tabakası olarak çevreler¹³ ve testisin posterior yüzünde kalınlaşıp içeriye doğru girerek mediastinum testisi meydana getirir¹⁶.

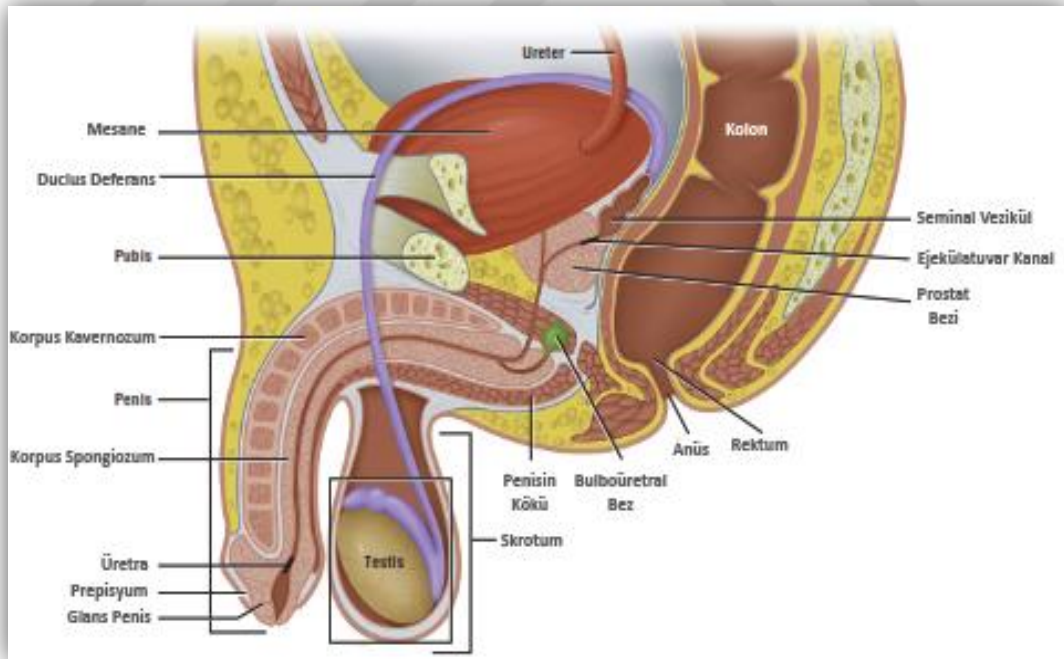
Tunica vasculosa, testiküler kapsülün damar ağından oluşan ve gevşek bağ dokusu yapısındaki iç tabakadır¹³.

Testiküler arter: Abdominal aortanın dalı olan testiküler arter testise girdiğinde sağ ve sol olmak üzere iki dala ayrılır¹³.

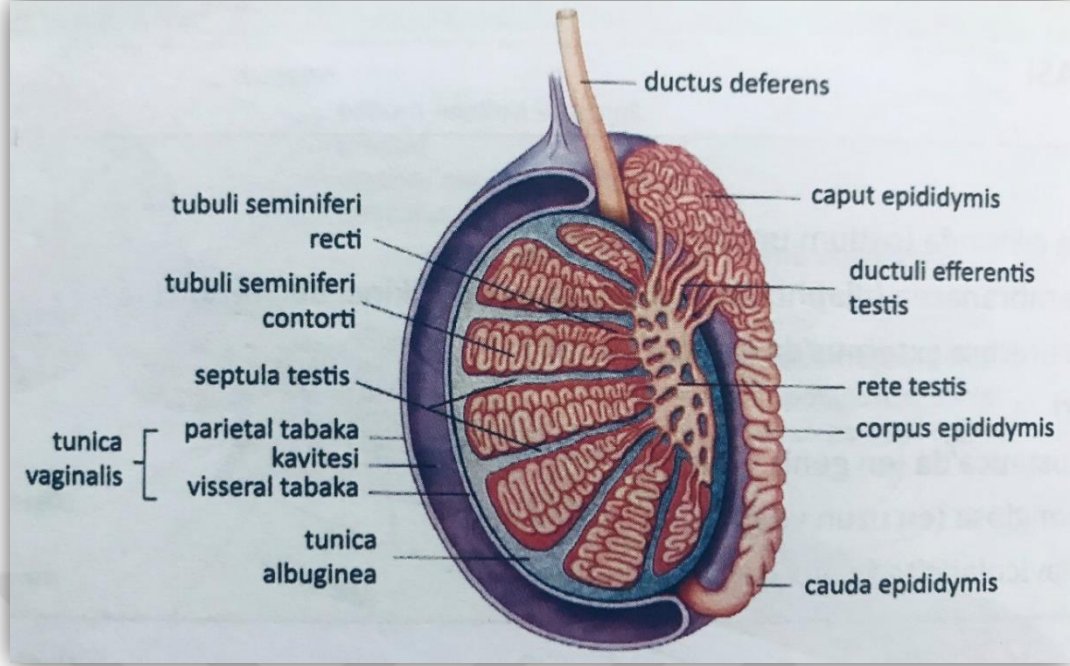
Testiküler venler: Testislerin posteriorundan çıkan küçük venler birleşerek venöz ağ meydana getirirler. Bu ağa plexus pampiniformis adı verilir. Plexus pampiniformis, funiculus spermaticus içinde yukarı doğru uzanır ve inguinal kanaldan geçerek abdomene ulaşır. Abdomen içinde bu venler birleşerek testiküler veni oluşturur. Sağ testiküler ven, renal venin hemen altından vena cava inferior'a açılırken; sol testiküler ven sol renal vene açılır¹³.

Testis sinirleri: Medulla spinalisin 10 - 11. torakal segmentlerinden kaynaklanan simpatik lifler, damarların çevresindeki plexuslar aracılığı ile gelir¹⁷.

Testis Lenfatikleri: Yüzeyel lenf damarları tunika vaginalis testisin altında, derin lenf damarları testis ve epididimisin içinde yer alır. Bu damarlar funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna geçer, sonuçta nodi aortici laterales ve nodi preaorticiye açılır¹³.



Şekil 1 Testisin erkek üreme sistemindeki anatomik görünümü²⁶



Şekil 2 Testisin sagittal kesitinin gösterimi³⁶

2.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun kromozomal cinsiyeti, yumurtayı dölleyen sperm çeşidi tarafından dölleme sırasında belirlense de, intrauterin 7. haftaya kadar gonadlar henüz erkeğe veya dişiye ait morfolojik karaktere sahip değildir¹⁸. Genital sistem erken dönemde her iki cinsiyette de benzerdir, bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıcı, cinsel gelişimin farklanmamış evresi olarak adlandırılır¹⁹.

Gonadlar (testisler ve overler); mezodermal epitel (arka abdominal duvarı kaplayan mezotel), mezenkim (mezotelin altındaki embriyonik bağ dokusu) ve primordial (ilkel) germ hücreleri olmak üzere üç embriyonal kaynaktan gelmektedir²⁰.

Gonadal gelişimin ilk aşamaları 5. haftada mezonefrozun medialinde sölomik epitelin çoğalması ve embriyonik bağ dokusunun yoğunlaşmasıyla ortaya çıkar. Oluşan bu yapıya genital kabartı denir²⁰. İntrauterin 6. haftaya kadar gonadal kabartılar içinde germ hücreleri görülmez. 6. haftada ilkel cinsiyet hücreleri alttaki mezenkime girer ve primer cinsiyet kordonlarına ulaşır²¹. Genital kabartıdaki epitel hücreleri hemen altlarındaki mezenkim içerisine doğru hızla büyürler ve düzensiz primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar. Bu kordonların birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir. Fetal gelişimin 7. haftasına kadar, her iki cinsiyet için genel tek bir gonad tipi vardır. Buna farklanmamış gonad denir. Farklanmamış gonadda korteks ve medulla

bulunur. Dişi embriyoda, farklılanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşır ve medullası geriler. Erkek embriyoda ise, medulla testisi oluşturur, korteks geriler ve dejenere olur^{20,21}.

Testisin gelişimi, Y kromozomunun kısa kolundaki cinsiyet belirleyici bölge (sex determining region on Y chromosom, SRY) üzerindeki gen tarafından kodlanan ve testis belirleyici faktör (testis determinig factor, TDF) olarak adlandırılan bir gen ile kontrol edilir^{12,21}. Testis gelişiminde en temel rolü oynayan SRY, bir transkripsiyon faktörüdür²¹. SRY geni otozomal 9, 11, 17 ve 19 kromozomlarının aktivasyon zincirini ve X kromozomu üzerindeki bazı gen sekanslarını kontrol eden bir ana anahtar olarak görev yapar. SRY geniyle hemen hemen aynı anda eksprese edilen başka bazı genler de vardır. Bunlar; WT1 geni, Sox-9 geni, SF-1 geni, DAX-1 geni'dir¹¹.

Testis belirleyici faktör (TDF), primer seks kordonlarını uyararak, onların seminiferöz kordonlara farklılanmasını sağlar. Seminiferöz kordonlar, farklılanmamış gonad medullasına doğru uzar, burada dallanarak birbirileriyle anastomoz yaparlar ve böylece ağı görünümdeki rete testis oluşur. 12. haftada gonad taslaklarının dışında kalın bir fibröz kapsül olan Tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur ve kordonlar seminifer tübüllere ve düz tübüllere (tubuli recti) farklılanırlar²².

Ergenliğe kadar lümenleri olmayan testis kordonları, ergenlikten itibaren kanalize olmaya başlar ve seminifer tübülleri oluşturur. Seminifer tübül duvarında 2 tip hücre yer alır:

- Destek hücreleri olan Sertoli hücreleri, testisin mezodermal epitelinden gelişir. Bu hücreler fetal testiste seminifer tübüllerin büyük bir kısmını oluşturur.
- Spermatogonia, spermilerin kök hücreleri olan bu hücreler primordiyal germ hücrelerinden farklılanırlar²⁰.

Gelişimin devamında ise kanalize olan seminifer tübüller rete testis tübülleriyle birleşir ve duktuli efferentesleri oluşturan, 15 - 20 adet mezonefrik tübüllerle devam eder. Daha sonra duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlantırlar^{20,21}.

Seminifer tübüllerin arasında bulunan intermedier mezenşimden Leydig hücreleri gelişir ve bu hücreler 8. haftadan itibaren testosteron üretmeye başlarlar. Testosteron üretimi, intrauterin gelişimin 8 ile 12. haftaları arasındaki dönemde, en yüksek miktarlara ulaşan plasental human koryonik gonadotropin (hCG) tarafından uyarılır²⁰. Leydig hücreleri

işlevlerini intrauterin 18. haftaya kadar devam ettirirler. Testosteron sentezinde azalma ile birlikte gerilerler, prepubertal döneme kadar sessiz kalırlar²¹.

Fetal gonadların işlev görmeye başlamasından önce, erkek ve dişi embriyoların ikisinde de iki çift genital kanal bulunmaktadır. Bunlar Wolff (mezonefrik) kanalları ve Müller (paramezonefrik) kanallarıdır. Wolff, erkek üreme sisteminin gelişmesinde önemli rol üstlenirken, Müller dişi üreme sisteminin gelişmesinde rol oynar. Erkekde Wolffian duktus kalmaya devam ederken Müllerian duktus geriler. İki kanal sisteminden hangisinin gelişeceği fetal testisin varlığı veya yokluğuna bağlıdır²¹. Fetal testisler testosteronun yanı sıra, antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibe edici madde (MIS) olarak bilinen bir glikoprotein üretir. Üretilen müllerian inhibitör madde Müller kanal sisteminin gerilemesine neden olur. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan AMH'nin salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra seviyesi azalır. Antimüllerian hormon yoksunluğunda, Müller (paramezonefrik) kanalları varlığını sürdürür ve dişi genital sistemi gelişir²⁰.

Testosteron, Wolff kanallarının, epididim, vaz deferens, ejakülatör kanallar ve seminal veziküllere farklılaşmasını sağlar. Daha sonra testosteron, hedef dokulardaki hücrelerin içine girip ya öylece kalır ya da 5α redüktaz enzimiyle dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. DHT etkisi altında bir penis oluşur ve labioskrotal şişkinlikler skrotumu yapmak üzere kaynaşır. Testisler testosteronun kontrolüyle 26. haftada karın arka duvarından ayrılarak gubernakulum ve prosessus vaginalis rehberliğinde skrotuma inerler^{11,22,24}.

2.3. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler (vezikula seminalis, prostat bezi ve bulboüretal bezler) ve penisten oluşur. Bu sistem spermatozoa, testosteron ve seminal plazma üretiminden sorumludur. Seminal plazma, boşaltım kanalındaki spermi hem besler hem de taşır. Spermatozoa ile seminal plazma, penis yoluyla dışarı bırakılan semeni oluşturur²⁴.

Testisler embriyonik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen ekzokrin ve endokrin özelliğe sahip birleşik tübüler bezlerdir^{12,23}. Testisin ekzokrin ürünü, spermatozoonlar ve testis sıvısı, endokrin ürünü ise Leydig hücreleri tarafından sentezlenen steroid yapılı testosterondur²⁵.

Skrotum içinde yer alan testisler, dıştan üç tabakalı kalın bir kapsül ile sarılmıştır. Testiküler kapsülün dış tabakası tunika vajinalis, orta tabakası tunika albuginea ve iç tabakası tunika vaskuloza olarak isimlendirilir. Tek katlı mezotelyal hücrelerden oluşan tunika vajinalis genellikle preparatlarda izlenmez. Kapsülün en kalın ve belirgin tabakası, yoğun bir fibroelastik bağ dokusu olan tunika albugineadır¹⁰. Kapsülün iç kısmı olan tunika vaskuloza ise kan damarları içeren gevşek bir bağ dokusudur¹². Testiküler kapsülün görevi; periyodik kontraksiyonlar yaparak testisin hacmini düzenlemek ve duktus sistemine masaj etkisi yaparak, spermiumların dışa doğru hareketinde yardımcı olmaktır²³.

Testisin posterior yüzeyi boyunca kalınlaşan Tunika albugineaya mediastinum testis denilmektedir²⁶. Bu kısım kan, lenf damarlarının ve sinirlerin testise giriş çıkış yaptığı bölgedir²⁴. Mediastinum testisten bezin içine uzanan radier seyirli fibröz septumlar testisi testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 - 300 piramidal lobüle ayırır. Lobüllerin her biri, sayısı 1 - 4 arasında değişen, aşırı kıvrımlı yapıda olan seminifer tübülleri içerir^{24,27}. İnsanda toplam 800 - 1200 adet, seminifer tübül bulunur²⁸. Tübüllerin arasında gevşek bağ dokusu (interstisyum bezin) stroması bulunur²³. İnterstisyel doku, bol miktarda makrofaj, kan ve lenf damarı, sinirler ve steroid hormon sentezleyen Leydig hücrelerini içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testis androjenlerini salgılar²⁸. Lobülün apeksine doğru her bir seminifer tübülün lümeni daralır ve düz tübüller (tübüli rekti) adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete testis, 10 - 20 adet duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanarak testisten gelen testiküler sıvı ve spermatozoayı duktus epididimise iletir^{12,27,28}.

Çok tabakalı kübik epitel özelliği gösteren seminiferöz tübül epiteli; bölünme özelliği olmayan Sertoli hücreleri ve bölünme özelliği olan spermatojenik seri hücreleri (spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler) olmak üzere 2 temel hücre grubuna sahiptir¹¹. Seminiferöz tübül epitelinin üzerinde yerleşik olduğu bazal lamina, yaşlandıkça yoğunluğu artar ve kalınlaşır. İç kısımda ise yassı epitele benzer düz kas özelliği gösteren miyoid hücreler bulunur²³. Miyoid hücreler henüz hareket yeteneği kazanmamış olan spermlerin rete testise ilerlemesini sağlayan ritmik kasılma hareketlerinden sorumludur¹².

2.3.1. Sertoli hücreleri

Destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da adlandırılırlar ve birçok etkene karşı dayanıklıdırlar (ısı, x-ışını, enfeksiyon, kötü beslenme)²³. Her bir Sertoli hücresi yaklaşık 30 - 50 germ hücresine desteklik vermektedir. Bu hücreler, puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipidir ancak puberteden sonra postmitotiktirler ve epitelin yaklaşık % 10'unu oluştururlar. İleri yaşlardaki bireylerde spermatogenik hücre serisinin oranı düşer, sertoli hücreleri tekrar esas hücre tipi haline gelir. Işık mikroskopunda incelendiğinde; sertoli hücresinin apikal ve lateral hücre membranları düzensiz hücre sınırları şeklinde görülür. Bu düzensiz sınırlar ile spermatogenik hücrelerin arasındaki boşlukları doldurarak onları çevreleyen, bazal membrandan tübül lümenine kadar uzanan prizmatik ya da üçgenimsi hücrelerdir. Sertoli hücreleri bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar granüler endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozom, büyük, bazale yerleşmiş oluklu bir çekirdeğe ve belirgin bir çekirdekçiğe sahiptirler. Komşu Sertoli hücreleri birbirleriyle spermatogonyumlar seviyesinde zonula okludens bağlantıları oluştururlar. Bu sıkı bağlantılar seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartman olmak üzere iki bölmeye ayırır. Spermatogonyumlar, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları olan spermatositleri ve spermatidleri, kandan gelen toksik bileşiklerden ve otoimmün reaksiyonlardan koruyan bir kan-testis bariyerini meydana getirirler. Sertoli hücrelerinin diğer özelleşmiş bağlantı tipleri ise; geçit bağlantıları (gap junctionlar), Sertoli hücreleri ile erken spermatojenik hücrelerinin arasındaki desmozom benzeri bağlantılar ve bazalde hemidesmozomlardır. Ayrıca insanlarda bazal sitoplazmada karakteristik inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcher kristalleri) bulunur. Kimyasal kompozisyon ve fonksiyonu bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda bu kristallerde lipoprotein reseptör proteini (CLA-1) birikimi saptanmıştır. Bu bulgular, inklüzyon cisimciklerinin lipid transportu ve Sertoli hücreleri tarafından kullanımıyla ilişkili olduğunu göstermektedir^{10-12,23}.

Sertoli hücrelerinin başlıca fonksiyonları;

- Spermatogenetik hücrelere fiziksel dayanak sağlar²⁹.
- Spermatojenik hücrelere gerekli metabolit, steroid ve besin sağlar²⁹.

- Dış ortamdan seminifer tübüllere bazı maddelerin geçişini önler (kan-testis bariyeri)²⁹.
- Spermiyasyon sırasında aktin aracılı kontraksiyonlarla spermatidlerin seminiferöz tübül lümenine salınımını kolaylaştırır¹¹.
- Seminifer tübül lümenine proteinlerden, fruktozdan ve iyonlardan zengin bir sıvı sekresyonu yapar^{10,26}.
- Folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarısıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler^{10,11,27}. ABP testosterona bağlanır ve seminifer tübüller içinde yüksek konsantrasyonlara ulaşarak spermatogoniyanın spermatozoaya dönüşümünü destekler; ancak ABP aynı zamanda östrojenede bağlanarak spermatogenezini inhibe de edebilir²⁴.
- Spermiyogenez süresince oluşan rezidual (artık) cisimcikleri fagosite eder^{10,26,27}.
- Anterior hipofizden salınan FSH inhibisyonunu sağlayan inhibini sentezler^{10,11,26,27}.
- Anti-Müllerian hormon salgılayarak embriyoda Müller kanalının regresyonunu sağlar²⁹.
- Stem hücre faktörü (SCF), glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF) gibi glikoprotein yapısında büyüme veya parakrin faktörler sentezler^{11,27}.
- Plazminojeni, aktif proteolitik plazmine dönüştüren plazminojen aktivatör, transferrin (demir taşıyıcı protein) ve seruloplazmin (bakır taşıyıcı protein) sentezler¹¹.

2.3.2. Spermatogenik seri hücreleri (Germ hücreleri)

Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinde, puberte ile birlikte belirli sayıda bölünmelerden sonra farklılaşarak spermatozoonları oluştururlar ve 4 - 8 tabakadan meydana gelirler. Bu hücreler, testisin erken gelişim evresinde yolk kesesinden kaynaklanan ve gonadal kabartılarda kolonize olan primordiyal germ hücrelerinden gelişirler. Spermatogenik hücreler spermatogenez süresince, komşu Sertoli hücreleri arasında, bazalden lümeneye doğru ilerleyerek gelişim gösterirler. Gelişim sırası, bazal membrana en yakın olan spermatogonyumlar (tip A- tip B), lümeneye doğru primer

spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve lümende spermiyumlar şeklindedir^{11,29}.

Spermatogenez, testiste meydana gelen ve spermatogonyumların spermi oluşturma süreci olarak bilinen ve 64 - 72 gün süren olaylar serisidir^{11,30}. İnsanda günlük sperm yapımı 4.2 milyon civarında olup diğer türlere göre daha azdır²⁸. Spermatogenez süreci hormonal kontrol altındadır, hipotalamik GnRH ergenlikten kısa bir süre önce hipofiz bezini etkisi altına alarak pitüiter gonadotropinlerin artmasına neden olur, bu artışla beraber testis eksenini boyunca nöroendokrin aktivite gerçekleşir. Spermatogenez süreci üç farklı fazda incelenmektedir: Spermatogonyal faz (proliferasyon), spermatosit fazı (mayoz) ve spermatid fazı (spermiyogenez). Spermatositogenez olarak da bilinen spermatogonyal fazda spermatogonyal kök hücreler mitoz bölünme ile kendi yerlerini alacak hücreleri ve primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyum topluluğunu meydana getirirler. Spermatosit fazında, primer spermatositler ardı ardına iki kez mayotik bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarlarının her hücrede yarıya düşürülmesiyle haploid hücre olan spermatidleri oluştururlar. Spermatid fazı, spermatidlerin farklılaşarak hareketli spermatozoonlara (sperm) dönüşme sürecidir¹¹.

Spermatogonyumlar, bazal laminanın hemen üstünde yer alan yaklaşık 12 µm çapında olan küçük diploid germ hücreleridir. Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantıların altında yerleştiklerinden dolayı kan-testis bariyerinin dışında kalırlar²⁷. Ergenlik çağında testosteronun etkisiyle spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme ile çoğalmaya başlayarak nükleer görünümde farklılıkları olan 3 yeni tip hücre grubu oluştururlar¹¹. Bu hücre tiplerinin spermatogonyumla kıyaslandığında daha büyük oldukları görülür²³.

1. Tip A koyu spermatogonyum (Ad): Spermatogenik serinin stem hücre grubu olduğu düşünülen bu hücreler ya kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ve Ad hücre tipini oluşturur ya da devam eden mitotik bölünmeler sonucu Ap hücre tipini meydana getirirler. Heterokromatik ve yoğun bazofilik görünen oval çekirdeğe sahiptirler¹¹.

2. Tip A açık spermatogonyum (Ap): Soluk boyanan ökromatik oval bir çekirdeğe, küresel mitokondriye, küçük bir golgi kompleksine ve çok sayıda serbest ribozoma

sahiptir. Ard arda mitotik bölünmeler geçirerek ya aynı tipte daha fazla hücre ya da tip B spermatogoniayı oluştururlar^{11,24}.

3. Tip B spermatogonyum: Tip A açık spermatogonyumların birkaç mitotik bölünmesiyle oluşan sferikal şekilli çekirdeğe sahip hücrelerdir. Çekirdek merkezi yerleşimli belirgin çekirdekçikle karakterizedir. Spermatogonyal fazın sonunu temsil ederler ve mitoz girerek primer spermatozoayı oluştururlar¹¹.

2.3.2.1. Spermatisitler

Primer Spermatisitler, spermatisit fazında B tipi spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucu primer spermatisitler oluşur. Primer spermatisitler seminiferöz tübülün en büyük hücreleridir. Bu hücreler mayoz bölünme geçirmeden hemen önce DNA'larını eşlerler ve her bir kromozom iki kromatitten oluşur. Sonuçta $2n$ sayıda kromozom ve iki katı miktarda DNA ($4d$) içerirler (46 kromozom ($44 + XY$ ve $4d$ DNA-Diploid)). Bölünmeyle birlikte hem DNA miktarlarını hem de kromozom sayılarını azaltırlar¹¹.

İnsanda her bir primer spermatisit birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez fazlarına girer. Bu olay yaklaşık 22 gün sürdüğü için kesitlerde görünen spermatisitlerin çoğu bu aşamadır. Leptotende, her kromozom birbirine paralel iki kromatidden oluşur. Zigoten evresinde homolog kromozomların eşleşmesi ve sinaps oluşumu görülür³⁰. Pakiten evresinde, sinaptonemal kompleks tarafından homolog kromozomların bir araya gelmesiyle sinaps tamamlanır ve kardeş olmayan kromatidler (tetrat) arasında DNA dizileri değişimi yani crossing-over başlar. Bu olay genetik çeşitliliği garanti altına alır. Pakiten fazı, memelilerde yaklaşık bir haftada tamamlanır. Diploten evresinde, sinaptonemal kompleks dağılmaya başlar ve iki homolog kromozom birbirinden ayrılır, sadece kiazma denilen uç bölgelerde yapışık kalırlar. Diyakinez fazında, kromozomlar çekirdek zarından ayrılırlar, kısalırlar ve kalınlıkları artar. Bu uzamış profaz safhasının sonunda oluşan kardeş kromatidler metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçerek her biri birbirine sitoplazmik köprülerle bağlı olan haploid kromozumlu sekonder spermatisitleri oluşturur¹¹.

Sekonder Spermatisitler, primer spermatisitin birinci mayotik bölünmesi sonucu oluşan 23 kromozumlu (haploid) küçük hücrelerdir. Bu hücreler yeni DNA sentezi

yapmadan ikinci mayozun profaz evresine geçerler. Kısa sürede ikinci mayozu girdikleri için kesitlerde görülme olasılığı azdır ($22 + X$ veya $22 + Y$ ve $2d$ DNA-Haploid)¹¹.

2.3.2.2. Spermatozoidler

Sekonder spermatozoidlerin ikinci mayoz bölünmeyi tamamlamasıyla spermatozoidler oluşur. Her bir sekonder spermatozoidten, d DNA ve 23 kromozom sayısına sahip iki haploid spermatozoid meydana gelir²⁷. Seminifer tübüllerin lümenine yakın yerleşim gösterirler. Genellikle nükleuslarında yoğunlaşmış kromatin bölgeleri bulunur. Bir çift sentriol, mitokondri, serbest ribozomlar, düz endoplazmik retikulum ve iyi gelişmiş golgi kompleksine sahiptirler ($22 + X$ veya $22 + Y$ ve $1d$ DNA-Haploid)²⁴.

Spermiyogenez, akrozomun ve flagellumun oluşumunu ve gelişimini, kromatinin yoğunlaşmasını, çekirdeğin yeniden şekillenmesini ve spermiyasyon sırasında spermatozoidin salınmasından önce sitoplazmanın çıkarılmasını içerir³⁰. Spermatozoidlerin farklılaşma süreci geçirerek bölünme olmaksızın spermatozoidleri oluşturduğu bu safhada³⁰ küre ya da poligonal şeklindeki spermatozoid uzayarak hareket yeteneği kazanır²⁴. Hücrelerde, kromatini yoğun olup merkezi yerleşimli olan bir nükleus, nükleusa yakın iyi gelişmiş golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri ve bir çift sentriol bulunur²³. Spermiyogenezdeki üç ana olay; akrozom gelişimi, flagellum gelişimi ve nükleer yoğunlaşmadır¹². Akrozom gelişimi; golgi fazı, şapka fazı, akrozom fazı ve maturasyon (olgunlaşma) fazı olmak üzere dört ardışık evreden oluşmaktadır¹².

1. Golgi Fazı: Endoplazmik retikulumda oluşturulan hidrolitik enzimler golgi kompleksine iletilir, burada çeşitli değişiklikler geçiren ve PAS⁺ boyanan granüller halinde akrozomal veziküle aktarılır. Bu granüller glikoprotein bakımından zengindir ve akrozomal vezikülleri oluşturmak üzere birleşerek, proakrozomal granül adını alırlar. Faz süresince akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar¹¹. Golgi kompleksinden elde edilen akrozomal vezikül, gelişmekte olan spermatozoidin ön kutbunu belirleyecek şekilde çekirdeğe doğru ilerleyerek çekirdek dış zarına tutunur²³. Sentriollerden bir çifti jukstanükleer bölgeden uzaklaşır, flagellumun aksonemini (9 çift periferde, 2 tane merkezde mikrotübül yapısı içeren, $9 + 2$, kuyruk iskeleti) oluşturmak üzere akrozomal bölgenin zıt kutbuna yerleşir^{26,27}.

2. Şapka fazı: Akrozomal vezikül, çekirdek yüzeyinin yarısını örtecek şekilde genişleyerek sperm başını şapka gibi sarar¹². Vezikül içeriği hidrolitik enzimleri içeren 'akrozomal kep' adını alır¹¹. Bu fazda şapka altında bulunan çekirdek kılıfı porlarını yitirerek daha kalın hale gelir. Aynı zamanda çekirdekte de kromatin yoğunlaşması gözlenir^{10,11,26}. Sentriyol çifti akrozomal vezikülün zıt kutbuna ulaşmıştır. Seminifer tübül lümeninde spermatid, akrozomal bölge bazal kompartmana bakacak şekilde yön değiştirir¹².

3. Akrozom fazı: Bu fazda spermatid kendini yeniden hizalar ve baş, sertoli hücrelerinin içerisine iyice gömülerek bazal laminaya doğru yönelir. Flagellum ise gelişmeye başlayarak seminifer tübülün lümenine doğru uzanır¹¹. Spermatidin yoğunlaşan nükleusu uzayıp yassılaşır. Çekirdek ve akrozom plazma membranının ön kısmına taşınır ve sitoplazma posteriyora doğru yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanan silindirik bir kılıf olan manşeti oluşturmak üzere organize olurlar. Çekirdeğe yakın olan sentriolden (bazal sentriol) prizmatik bir flagellum uzanır. Flagellum uzadıkça çevresinde ince, fibriller bir kılıf oluşur²³. Bu fibriller çekirdeği flagellum ile birleştirirler ve bu nedenle bu bölgeye bağlantı parçası denmektedir¹¹. Flagellum spermiumun kuyruk kısmını yapar. Diğer sentriol (distal sentriol) kuyruğun başlangıç kısmına yakın bir yere göç ederek flagellumu bir halka gibi kuşatır (annulus)²³. Plazma membranı geliştirmekte olan flagellumu çevrelemek üzere arkaya doğru hareket ederken¹¹, manşet kaudale göç eder ve sonrasında dağılır¹². Mitokondriler, boyun bölgesindeki kaba fibrillerin etrafında ve boyun bölgesinin hemen posteriyor uzantısında sıkı, heliks tarzda saran bir kılıf oluşturmak üzere sitoplazmanın kalan kısmından göç ederler. Bu bölge, spermatozoonun hareketliliğini sağlayan sperm kuyruğunun orta parçasıdır¹¹. Hidrolitik enzimler nedeniyle özel bir tip lizozom olarak yorumlanan akrozom; hyaluronidaz, akrozin, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteazlar içerir¹¹. Fertilizasyon esnasında bu enzimler kumulus ooforus tabakasının ve zona pellusidanın aşınmasında rol oynarlar²⁷.

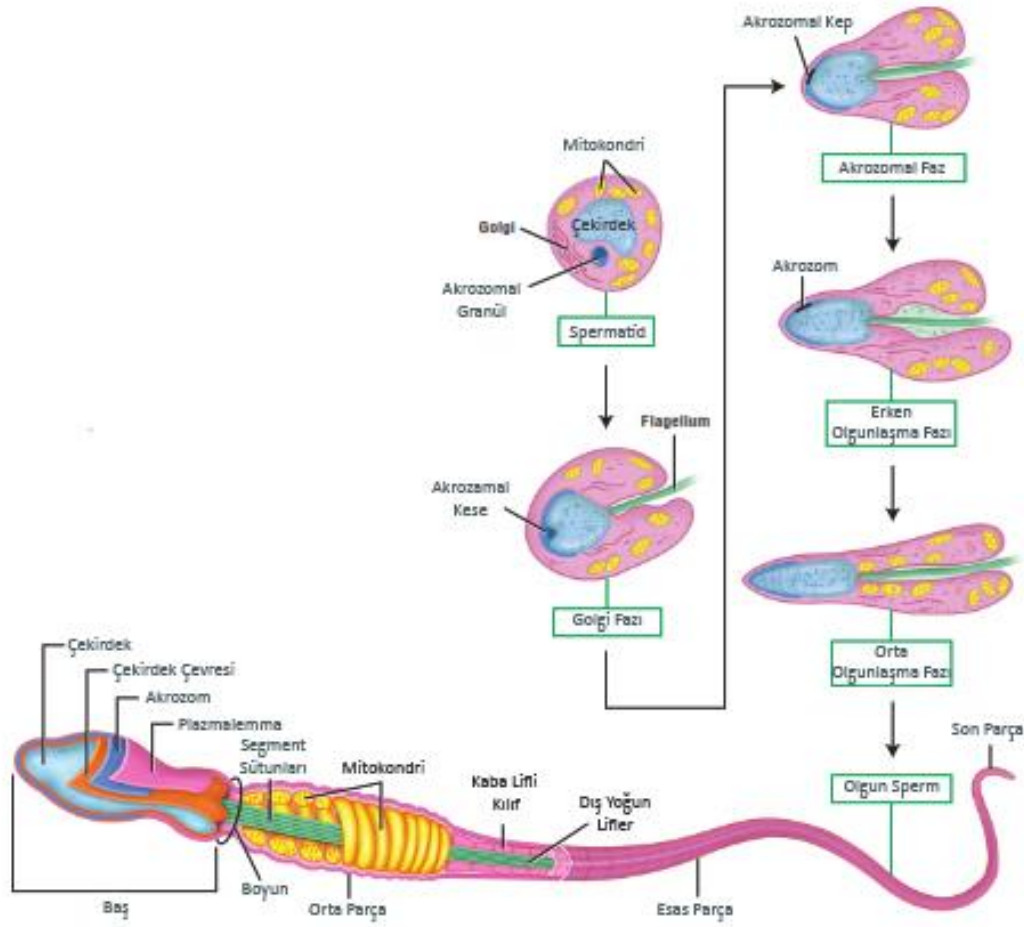
4. Olgunlaşma (maturasyon) fazı: Spermatid olgunlaşmasının bu son fazında flagellum etrafındaki fazla sitoplazma azaltılarak atılır ve olgun spermatozoon meydana gelir. Atılan fazla sitoplazma rezidüal cisimcik olarak da adlandırılır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır¹¹. Olgunlaşma fazının sonuna doğru spermatidlerin arasındaki sitoplazmik köprüler ortadan kalkar böylece spermatidlerin

birbirleriyle bağlantıları kalmaz ve spermatozoonlar tübül lümenine salınırlar. Bu sürece spermiyasyon adı verilir ve spermatogenezin en son basamağıdır³⁰.

İnsanlarda spermatogenez safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 70 ± 4 günlük bir sürede tamamlanırken, sıçanlarda benzer şekilde gelişen spermatozoon yaklaşık 50 ± 4 günde oluşur³¹. Spermatogenez dalgalanmalar halinde oluşur ve her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez²⁷. Bu durum da herhangi bir tübülde, bu dönemde oluşan bütün hücreleri görmek genellikle mümkün değildir³¹. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. İnsanda her bir siklus yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez dört siklustan sonra biter²⁷.

Olgun Spermium (Spermatozoon), sertoli hücrelerinden ayrılarak seminiferöz tübül lümenine geçen spermatozoonlar morfolojik olarak olgun olmasına rağmen fonksiyonel olarak henüz olgun değildir. Duktus epididimiste hareket yeteneklerini, dişi genital kanallarında ise geçirdikleri kapasitasyon süreci ile dölleme yeteneklerini kazanarak olgun sperm haline gelirler. Baş, kuyruk ve onları birbirine bağlayan bağlantı parçası (boyun) olmak üzere 3 parçadan oluşan olgun insan spermi yaklaşık olarak $55 - 65 \mu\text{m}$ uzunluğundadır. Yassı şekilli sperm başı, $4.5 \mu\text{m}$ uzunluğunda, $3 \mu\text{m}$ genişliğinde ve $1 \mu\text{m}$ kalınlığında olup anterior yüzeyi yarıya kadar akrozom ile sarılmış 23 kromozomlu ($22 + Y$ kromozomu veya $22 + X$ kromozomu) yoğun homojen bir nukleustan oluşur. Ayrıca bu kısım akrozomal hidrolitik enzimler (proteaz, asit fosfataz, hiyaluronidaz, nöraminidaz ve akrozin) içermektedir. Bu akrozomal enzimler ile yumurta etrafındaki zona pellusidanın yıkılması olayına akrozom reaksiyonu adı verilmektedir. Boyun, baş bölgesini kuyruk bölgesine bağlayan bir çift sentriyol içeren dar bir parçadır. Spermin en uzun parçası olan kuyruk yapısal olarak silyuma benzer ve 3 bölümden oluşmuştur: Orta parça, esas parça, son parça. Sarmal dizilmiş miyokondriyonların oluşturduğu orta parça yaklaşık $7 \mu\text{m}$ uzunluğundadır. Mitokondriyonlar kuyruğun hareketi için gereken enerjiyi sağlarlar. Çapı distale doğru gittikçe incelen orta parça esas parçaya bağlantıyı sağlayan spermin hareketinde rol alan annulus ile sonlanır. Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. $40 \mu\text{m}$ uzunluğunda olup, dokuz adet dış yoğun fibril ve aksonemal kompleks ile birlikte bunları saran bir fibröz kılıf içermektedir. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan keratin proteinlerini içerir. Kuyruğun $5 \mu\text{m}$ 'lik en kısa parçası olan

son parça ise dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın olmaması nedeniyle çıplak olup sadece aksonem ile onu saran hücre membranından oluşur^{11,12,23}.



Şekil 3 Spermiogenezin farklı evreleri ve olgun bir sperm yapısı²⁶

2.3.3. Üreme sisteminin düzenlenmesi

Germ hücresi gelişimi, Sertoli hücresi ile oldukça koordineli bir etkileşime dayanır. Germ hücreleri ve Sertoli hücreleri doğrudan reseptör aracılı etkileşimler veya parakrin faktörler aracılığıyla iletişim kurar. Sertoli hücreleri proteinlerin üretilmesi ve salgılanması düzeyinde germ hücrelerinin değişen ihtiyaçlarına karşı adapte olma yeteneğine sahiptirler.

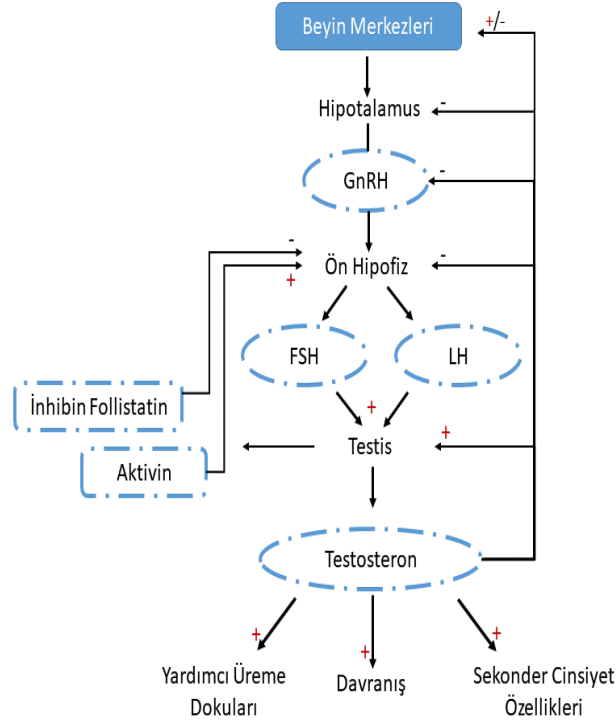
Gonadotropinler, spermatogenezin ana endokrin düzenleyicileridir. LH, Spermatogenez kontrol etmek için seminifer epitelde androjen reseptörleri üzerinde etkili olan androjenlerin, yani testosteronun salgılanmasını uyararak spermatogenez için Leydig hücresini hedef alır. FSH ise, Sertoli hücre faktörlerinin üretimini uyararak spermatogenez için Sertoli hücresi içindeki reseptörleri hedefler. Ancak FSH spermatogenez için

gerekli olmamakla birlikte, niceliksel olarak normal spermatogenez ve doğurganlık için açıkça gereklidir. Spermatogenezin FSH, LH ve androjenler tarafından düzenlenmesi açısından, kantitatif olarak normal spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi, dolayısıyla tam doğurganlığın sağlanması açısından hipotalamo- pitüiter- testis ekseninin hassas dengesine bağlıdır³⁰.

2.3.3.1. Hipotalamo- hipofiz- gonad aksı

Spermatogenezin başlatılması ve devam ettirilmesi, gonadotropinlerin hipofizden salgılanmasını gerektirir ve bu nedenle hipotalamo- hipofiz- testis aksı oldukça önemlidir³⁰. Üreme işlevi denetimi büyük ölçüde hormon zinciri tarafından yapılır. Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) zincirdeki ilk hormondur. GnRH, hipotalamustaki nöroendokrin hücreler tarafından salgılanır ve hipotalamo - hipofizer kan damarları ile ön hipofize erişir. Hipofiz bezinin ön lobunu uyararak buradan başlıca iki gonodotropin olan luteinizan hormon (LH) ile folikül uyarıcı hormon (FSH) salgılatır. Bu hormonlar büyümenin düzenlenmesinde, seksüel gelişimde, spermatogenez ve testisin fonksiyonunda etkilidirler³². LH, spermatogenezisi dolaylı yoldan uyararak, Leydig hücre fonksiyonunu kontrol eder ve testislerden testosteron salgılanmasına neden olur. FSH ise spesifik reseptörleri olan Sertoli hücreleri üzerine etki ederek doğrudan spermatogenezini düzenler. Seminifer tübüller içinde sadece sertoli hücreleri, testosteron ve FSH için reseptörlere sahiptir. Bundan dolayı testosteron ve FSH, seminifer tübül epiteline etki eder. Testosteron üretildikleri gonadlar dahil üreme sisteminin bütün bölümleri ve vücudun diğer bölümleri üzerinde birçok etki göstermektedir.

Plazma testosteron miktarındaki bir artış, hipotalamusa giderek GnRH salınımını inhibe eder. GnRH seviyesinin düşmesi ise ön hipofizden salınan LH ve FSH üretiminde azalmaya sebep olur. LH seviyesindeki azalma Leydig hücrelerinden testosteron üretimini azaltmaktadır. Böylece gonadal steroidler negatif feedback görevi görürler. Bunların dışında inhibin gibi gonadal proteinlerde ön hipofiz bezi üzerine feedback etkilerine sahiptir^{11,18,33}.



Şekil 4 Erkekte üremenin pozitif ve negatif geri bildirimle düzenlenmesi

2.3.3.2. Isı kontrolü

Spermatogenetik hücreler yüksek ısıya dayanıklı değildir. Skrotum, derisi çok ince olan, melanin pigmenti içerdiğinden kahverengi renkte olan, ince kıllar, yağ bezleri (salgısı özel kokuda) ve çok bol ter bezleri bulunan, sinir sonlanmalarından zengin (kılın mekanik uyarılması ve ısı değişimlerine duyarlı) bir yapıdır. Deri altında yağ dokusu yoktur (ısı kaybı için uygun bir yapı), deri ile altında yer alan ince düz kas tabakası (dartos kası) arasında ince bir bağ dokusu vardır²³. Skrotum içindeki sıcaklık abdominal boşluğun yaklaşık 2° C altında olmalıdır. Bu ısının ayarlanmasında skrotum önemli rol oynar³⁴. Yapısal özellikleri (deri altında yağ dokusu olmayışı, damardan ve ter bezinden zengin oluşu) bu işlevine uygundur²³.

2.3.4. Genital kanallar

2.3.4.1. İntratestiküler duktuslar

Tubuli Rekti, seminifer tübüller düz seyirli tubuli rektillerle devam eder. Tubuli rektiller çok kısa yapıdadırlar. Epitelin proksimal yarısını Sertoli hücreleri, distal yarısını tek katlı kübik epitel döşer. Çevresinde mediastinum bağ dokusu bulunur^{23,24,27}.

Rete Testis, damardan zengin mediastinum içerisinde birbirleriyle anastomozlaşan kanallar sistemidir²⁷. Kanalın duvarı basit kübik ya da yassı epitel ile döşelidir. Bu nedenle lümenler düzensiz olarak izlenir. Bazı epitel hücreleri tek bir silya taşımaktadır²³.

2.3.4.2. Ekstratestiküler duktuslar

Duktuli Efferentes, rete testis ile duktus epididimis arasındaki 10 - 20 tübülden oluşan bir yapıdır. Duktuli efferentes intratestiküler duktus olarak başlar, testisi terk eder ve ekstratestiküler duktus olarak devam eder. Duktus epiteli epididimis yönüne doğru hareketi sağlayan silyalı prizmatik epitel veya tek katlı silyasız kübik epitel kümelerinden oluşur. İki farklı uzunluktaki epitel hücrelerinin düzenlenmesi duktuli efferentesin lümen sınırında tarak görünümlü bir özellik ortaya çıkarır. Silyasız hücreler seminifer tübüllerden salgılanan semen sıvısının çoğunu absorbe ederler. Silyalı hücre aktivitesi ve sıvı absorpsiyonu spermatozoonların epididimise doğru süpürülmesini sağlayan bir ortam oluşturur. Tüm duktus sisteminde hareketli sil sadece duktuli efferenteslerde dir. Epitel bazal laminasının altında ince sirküler seyirli bir düz kas tabakası bulunur. Bu kaslar peristaltik hareketlerden sorumludur. Genital duktusların çevresinde düz kasın görülmeye başlandığı yer duktuli efferenteslerdir. Tüm duktuli efferentesler yaklaşık 2 cm uzunluğunda olup ortak bir bağ dokusu ile kuşatılarak epididimin baş kısmına açılırlar^{24,27}.

Duktus Epididimis, 4 - 6 m uzunlukta, aşırı kıvrımlı tek bir duktustur. Çevresindeki damardan zengin bağ dokusu ile birlikte epididimisin korpus ve kuyruk kısımlarını oluşturur. Duktuli efferenteslerden ayırmada en önemli kriter hem dış hem de iç sınırlarının düzgün oluşudur (lümeni düzgün)^{23,27}. Bazal lamina tarafından desteklenen yalancı çok katlı prizmatik epitelyum (psödostratifiye) ile döşelidir, epitelin iki çeşit hücresi vardır: Bazal hücreler, bazal membrana oturmuş fakat lümeneye kadar erişmeyen konik ya da yuvarlak hücrelerdir. Morfolojik olarak farklılaşmamış olan bu hücreler, esas hücrelerin kök (öncül hücre) hücresi olarak görev yaparlar ve açık renkli boyanırlar. Esas hücreler, silindirik olup hepsi aynı boydadır. Boyları lümeneye kadar ulaştığından lümen düzgün görünümlüdür. Bu yüzeylerinde Streosillia taşırlar. Bu hücrelerin sitoplazmalarında, küçük bir golgi kompleksi, granüler endoplazmik retikulumu, lizozomları, çok sayıda apikal pinositotik ve kapalı vezikülleri bulunur.

Esas hücrelerin fonksiyonu duktuli efferenteslerle birlikte testiküler sıvının yaklaşık % 90'ını geri absorbe etmektedir²⁴. Duktus epididimisin epiteli lizozomal aktivite ile spermatogenez süresince atılan artık cisimciklerin ortadan kaldırılması ve sindirilmesine katılır²⁷. Duktus epididimis, spermi duktus deferense iletmeye yardımcı olan peristaltik kasılmalar yapan longitudinal düz kas tabakaları tarafından sarılır²⁴. Spermier epididimis içinden çok yavaş geçmektedir (6 hafta)²³. Bu kanalların sperm olgunlaşmasını sağlayan çeşitli sekresyonları vardır, ayrıca gliserofosfokolin salgısı ile kapasitasyonu inhibe eder. Bu yüzden kapasitasyon sadece dışı genital kanalına giriş yaptığında gerçekleşir²⁴. Spermiumlar epididimis içinde hareket etmeye başlarlar^{23,24}. Epididimisin kuyruk kısmında kas kontraksiyonları çok azalmıştır ve spermin başlıca depo yeridir. Spermier burada 2 hafta kalır. Sempatik sinirlerle innerve kuyruk bölümü kasları ejakülasyon refleksiyle kuvvetli olarak kasılır²³.

Duktus (Vaz) Deferens, epididimisin kuyruğundan başlar. İçte ve dışta longitudinal, ortada sirküler kalın düz kas duvarına sahiptir. Duktus epididimis benzeri olarak yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşeli, dar ve düzensiz lümeni vardır²⁴.

Vesicula Seminalis, iki lobüllü membranöz kesecikten oluşur¹⁵. Mesanenin arka yüzünde yer alan ve bir çift olan bu uzun keseler testis salgısına katılan bir sıvı salgırlarlar. 1.5 cm uzunluğunda olan her bir vesicula seminalis, oldukça kıvrıntılı ve düzensiz lümenli bir tüpten ibarettir. Seminal vezikülün boşaltım kanalı, ejakulatör kanalı oluşturmak üzere duktus deferens ile birleşerek duktus ejakulatouriusu yapar ve daha sonra prostat bezi içerisinde geçerek prostatik üretraya açılır^{15,26}.

Seminal veziküllerin glandular epiteli değişkenlik göstermekle birlikte genellikle alçak yalancı çok katlı ve alçak prizmatik veya kübiktir. Muskularis katı ise içte sirküler ve dışta longitudinal kas tabakasından oluşur²⁶.

Seminal veziküller, semenin temel karbonhidrat bileşiği olan fruktoz gibi yüksek yoğunluktaki sperm aktive edici kimyasalları içeren sarımtırak, visköz sıvıyı, yani seminal plazmayı üretirler^{26,35}. Erkek üreme sisteminden üretilen seminal plazma, magnezyum (Mg) ve fruktozamin (FRA) gibi organik ve inorganik bileşenler içerecek, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve gamet etkileşimlerinde rol oynar. Mg, seminal sekresyon, spermatogenez ve sperm fizyolojik değişiklikleri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik yollarda ve enzimatik reaksiyonlarda yer alırken FRA, DM'yi belirtmek için kullanılan bir glisemik biyobelirteçtir ve döllenme süreci ile ilişkilidir³⁵.

Seminal vezikül içeriğinde bulunan fruktoz sperm tarafından metabolize edilir ve sperm motilitesi için temel enerji kaynağıdır. Semende bulunan sıvının çoğunluğu seminal veziküller tarafından üretilir²⁶.

Duktus Ejakulatoryus, duktus deferensin prostat bezine giren kısmıdır²⁷. Kas duvarından yoksundur. Prostatik üretrada yer alan kollikulus seminalisteki düz ve uzun bir yarıktadır²⁴.

2.4. Testis Fizyolojisi

Erkek genital sistemi dış ve iç genital organlar olmak üzere ikiye ayrılır. Erkeğin dış genital organları penis ve içinde testisleri barındıran skrotumdur. İç genital organları ise gametleri (sperm) ve hormonları salgılayan testisler ve sperm hareketi için gerekli olan maddeleri salgılayan yardımcı bezler ile sperm ve bez salgılarını taşıyan kanallardan oluşur¹³. Testisler, spermatogenez ve steroidogenez olmak üzere iki önemli fonksiyona sahiptir. Hem somatik hücre bölünmesi (mitoz) hem de redüksiyon bölünmesinin (mayoz) gerçekleştiği spermatogenez süreci sonunda erkek gametler oluşmaktadır. Steroidogenez ise seks hormonları olarak da bilinen başta testosteron olmak üzere androjenlerin sentezlendiği süreçtir. Androjenler; spermatogenezin sürdürülmesinden, erkek embriyonun fenotipik erkek fetus haline gelişiminden ve seksüel dimorfizmden (erkek fiziksel ve davranış karakteristikleri) sorumludur¹¹. Genç erişkinlerin testisi günde $\sim 120 \times 10^6$ sperm üretir. Sperm her biri ortalama 150 - 250 μm çapında, 0.3 - 0.7 m uzunluğunda, sayıca 900'den fazla olan seminifer tübüllerde üretilir. Üretilen spermilerin küçük bir bölümü yaklaşık 6 metre boyunda kıvrımlı bir tüp olan epididimde çoğunluğu ise vas deferensde depolanmaktadır. Spermin epididimden geçebilmesi için günler gerekir. Seminifer tübül ve epididimin ilk bölümlerinden geçen spermier hareketsizdir ve ovumu fertilize edemezler. Spermier 18 ila 24 saat epididimde kaldıktan sonra hareket yeteneklerini kazanırlar, ancak ejakülasyona kadar, epididim sıvısında bulunan inhibitör proteinlerle hareketleri engellenir^{33,36}.

Spermatozoon üretimi olan spermatogenez, primitif germ hücresi olan spermatogonium ile yaklaşık 13 yaşında başlar ve ileri yaşlarda belirgin şekilde azalarak yaşam boyu devam eder^{33,36}. Spermatogoniumlar, tübüler yapının dış kenarında tek sıra halinde yer almaktadır. Bu hücreler sürekli proliferasyonla kendilerini yenilerler. Hücrelerin bir bölümü, spermierin oluşumunu sağlayan son aşamaya kadar farklılaşır.

Spermatogenezin ilk evresinde, spermatogoniumlar merkeze yönelik Sertoli hücreleri boyunca yerleşirler. Sertoli hücreleri oldukça büyük hücrelerdir. Tübül merkezinde, lümene giden tüm yollardaki spermatogonium hücre dizilerini, sitoplazmik uzantılarıyla kuşatarak onlara destek olurlar³³.

Ejakülasyondan sonra, sperm hareket ve ovumu dölleme yeteneği kazanır. Bu olaya kapasitasyon adı verilir ve bu olay 1 - 10 saat arasında gerçekleşir. Sertoli hücreleri ve epididimdeki epitel sperm ile birlikte atılan özel bir sıvı salgılar. Bu sıvı hormonlar, enzimler ve spermin olgunlaşması için gerekli olan besinleri içerir³³.

Normal olarak harekete sahip ve fertil spermler, flagellaların hareket yeteneği ile sıvı ortamda dakikada yaklaşık 1 - 4 mm hızla ilerleyebilir. Sperm aktivitesi ejakulat semeninde olduğu gibi, nötral ve hafif alkalik ortamda büyük bir artış gösterir; ancak orta derecede asidik ortamda büyük ölçüde baskılanır. Kuvvetli asit ortam spermlerin hızla ölümüne neden olur. Sperm aktivitesi ısı artışı ile belirgin artış gösterir, ancak bu koşullarda metabolizma hızı da yükselerek spermin ömrünü önemli ölçüde kısaltır. Sperm testislerin genital kanallarında birkaç hafta canlı kalabildiği halde, kadın genital kanalında sadece 1 veya 2 gün yaşar³³.

Spermatogenezi Uyaran Hormonal Faktörler:

1. Testosteron, testislerde interstisyumda yerleşim gösteren Leydig hücrelerinden salgılanır³⁶. Bu hücreler erişkin testis ağırlığının % 20'sini oluşturur³³. Sperm oluşumunda germinal hücrelerin bölünme ve gelişmeleri için gereklidir.

2. Luteinizan hormon, ön hipofiz bezinden salgılanarak, Leydig hücrelerini uyarır, testosteron salgılanmasını sağlar.

3. Folikül stimulan hormon da ön hipofiz bezinden salgılanır. Sertoli hücrelerini uyarır. Bu stimülasyon olmaksızın spermatidlerin spermelere dönüşümü (spermiogenez) olanaksızdır.

4. Büyüme hormonu (ve diğer pek çok hormon) testislerin temel metabolik fonksiyonlarının kontrolü için gereklidir. Büyüme hormonu, özellikle spermatogoniumların erken bölünmesini hızlandırır. Hipofizer cücelikte olduğu gibi, hormonun yokluğunda spermatogenez ciddi boyutlarda yetmezlik gösterir veya tümüyle ortadan kalkar³⁶.

Testosteron, steroid yapıda bileşik olup, hem testislerde hem de adrenal bezlerde kolesterolden veya direkt olarak asetil koenzim A'dan sentezlenir. Salgılanan testosteronun yaklaşık % 97'si zayıf bağlarla plazma albumini ya da daha sıkı bir şekilde, seks hormonu bağlayan globulin olarak adlandırılan bir β globulinle bağlanır. Bağlı hormonun dolaşım sisteminde kalış süresi 30 dakika, 1 saat bazen de daha uzun olabilir. Bu süre sonunda, testosteron ya dokularda fikse olur ya da inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan atılır. Dokulara fikse olan testosteronun çoğunluğu hücre içinde dihidrotestosterona dönüşür. Bu olayın gerçekleştiği hedef organlar ise erişkinlerde, özellikle prostat bezi, erkek fetusta eksternal genital organlardır. Dokularda fikse olmayan testosteron, karaciğerde başlıca androsteron ve dehidroepiandrosterona dönüşür. Aynı anda, her iki yapı glukuronidlerle veya sülfatlarla birleşerek bağlı hale getirilir. Bunlar da, safra içinde sindirim kanalına ya da idrarla böbreklerden atılırlar³³.

Testosteron genel olarak, vücuttaki belirgin erkek karakterlerinin oluşumundan sorumludur. Fetal yaşam sürecinde, testisler plasentada oluşan koryonik gonadotropinlerle uyarılarak, orta düzeyde testosteron salgırlar. Bu hormon fetal gelişim periyodunda ve hatta doğumdan sonra 10 ya da daha çok haftalar süresince vücutta bulunur. Sonra, çocukluk çağında yaklaşık 10 - 13 yaşına kadar testosteron üretilmez. Daha sonra, puberte döneminde ön hipofiz gonadotropik hormonların uyarısıyla testosteron yapımı hızla artar. 50 yaşından sonra hızla düşmeye başlar, 80 yaşında maksimum düzeyin % 20-50'sine iner³⁷.

Testosteron, spermatogenezdeki germ hücrelerinin bölünme ve gelişimi için gereklidir. Bunun yanında testis içindeki testiküler arter ve testiküler venler birbirlerine paralel bir şekilde seyir halindedirler ve bu da ters akım halinde olup, ısı ve testosteron alışverişini sağlar. Testislerin skrotumda asılı olmasıyla sıcak havalarda gevşeyip sarkması ve soğuk havalarda musculus cremaster kasının kasılmasıyla vücuda yaklaşmasıyla testisin ısı değişkenlerinden ve diğer etkenlerden etkilenmesi önlenmiş olur. Tüm bu faktörler sperm oluşumu için oldukça önemlidir³⁸.

Erkek ve kadın her iki cinste seksüel fonksiyonların kontrolü hipotalamustan gonadotropin serbestletici hormon (Gn - RH) sekresyonu ile başlar. GnRH aralıklı olarak 1-3 saatte bir, birkaç dakika süreyle salgılanır. Bu hormon, önhipofiz bezini uyararak gonadotropik hormonlar adı verilen glikoprotein yapıda iki hormonun salgılanmasına neden olur: Luteinizan hormon (LH) ve Folikül Stimulan Hormon

(FSH). LH testislerden testosteron salgılanması için başlıca uyarandır. FSH ise, özellikle spermatogenezi stimüle eder³³.

LH uyarısı ile testislerden salgılanan testosteron hormonu, karşıt olarak ön hipofizden LH sekresyonunu etkiler. Bu da daha sonra, ön hipofizden LH ve FSH salgısını azaltır ve LH'nın azalması da testislerin testosteron sekresyonunda azalmaya neden olur. Böylece, testosteron salgısının çok fazla olması halinde, otomatik olarak negatif feedback etkiyle hipotalamus ve ön hipofizin salgısı azaltılarak testosteron sekresyonu baskılanır ve hormon düzeyi normale getirilir. Buna zıt olarak, testosteronun çok az olması halinde hipotalamustan yüksek düzeyde GnRH salgılanır. Ön hipofizden LH ve FSH salgısı artar ve testiküler testosteron sekresyonu yükselir³³.

FSH seminifer tübüllerde, özgül FSH reseptörleriyle Sertoli hücrelerine bağlanır. Bu olay, hücrelerin büyümesine ve çeşitli spermatogenik maddelerin salgılanmasına neden olur. Aynı anda, interstisyel alanlardaki Leydig hücrelerinden tübüller içine difüze olan testosteron hormonu spermatogenez üzerinde şiddetli bir tropik etki gösterir. Bu nedenle, spermatogenezin başlaması için, FSH ve testosteron hormonlarının her ikisi de gereklidir.

Seminifer tübüller sperm yapımını azalttığına, ön hipofiz bezinden FSH salgısı belirgin olarak artar. Tersine, spermatogenezin hızlanması ile FSH salgısı azalır. Ön hipofiz bezi üzerindeki bu negatif feedback etkinin sebebi, Sertoli hücrelerinden salgılanan, inhibin adı verilen bir başka hormondur. Bu hormon, doğrudan ön hipofiz bezi üzerinde, FSH salgısını baskılayan kuvvetli bir etkiye sahiptir. Ön hipofiz bezi üzerindeki inhibitör etkisi, spermatogenezin kontrolünde önemli bir negatif feedback mekanizması oluşturur. Buna eş olarak, testosteron sekresyonunun düzenlenmesine de yardım eder³³.

2.5. Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes, Yunanca aşırı idrar oluşumu, Mellitus ise 'bal' anlamına gelir ve idrardaki yoğun şekeri ifade ederler³⁴. Diabetes mellitus, azalan insülin sekresyonu veya insülin direncine bağlı olarak karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmalarının bozulmasıyla karakterize olan yaşam boyu süren kronik bir hastalıktır^{1,39}. Kandaki glukoz düzeyi, insülin hormonu tarafından kontrol edilir. Normal şartlarda, besinlerden alınan veya karaciğerden kana salınan glukoz, insülin sayesinde hücre içine alınır ve metabolik yollardan geçerek enerjiye dönüştürülür. Peptid yapısındaki insülin, vücudumuzdaki

tüm hücrelerin enerji ihtiyaçlarını karşılamak için kullandıkları glukozun hücre içine alınmasında anahtar görevi görür. Kan glukoz seviyesi insülin sekresyonunun yeterince olmaması veya yeterince olmasına karşın hücrelerin insüline direnç göstermesi ile glukozun hücre içine alınamaması sonucunda artmaktadır⁴⁰. Artan kan glukoz seviyesi ile glukozun kullanımı giderek azalır ve lipitlerin, proteinlerin kullanımı giderek artar³³. Hastalar da kan glukoz düzeyi öyle yüksek olur ki, şeker hastasının böbreklerinden glukoz atılmaya başlanır. Hastalığın tanısında, idrarda glukoz aranmasının nedeni de budur. İdrarda glukoz oranı arttıkça bununla birlikte su atımı da artar. Bu olay neticesinde, idrar miktarında ve su içme isteğinde aşırı derece de artışlar görülür³⁴. Diyabet, organ sistemlerinde morfolojik ve fonksiyonel anomalilere neden olurken, kronik olarak nefropati, retinopati, kardiyomiyopati ve nöropati gibi komplikasyonlara yol açabilir³⁹. Belirgin hipergliseminin semptomları ise glukozüri, poliüri (sık idrara çıkma), polidipsi (aşırı su tüketimi), kilo kaybı, bazen polifaji (aşırı sağlıksız beslenme) ve bulanık görmedir⁴.

Diabetes Mellitus en eski hastalıklardan biridir. İlk kez Kapodokyalı Arataeus, çok idrar yapan ve kilo kaybeden kişileri sifonlu fiçıya benzetererek “Diabetes” ismini kullanmıştır. Mısırlı, Çinli ve Hintlilerce yapılan çalışmalar VII. yüzyılda idrarın şekerli olduğunun tespit edilmesini sağlamıştır. İbn-i Sina, XI. yüzyılda kaynatılan idrarın tortusunda bal tadını belirlemiştir⁴¹. John Rollo hastaların idrarlarının tatlı olduğunu belirtmek için diabetes kelimesinin yanına 'mellitus' kelimesini eklemiştir. 1921 yılında Toronto Üniversitesi'nde İnsülin ilk kez keşfedilmiştir. 1980'lere kadar sadece hayvan pankreasından üretilen insüline ek olarak genetik mühendisliğinin gelişimiyle birlikte insan insülinine benzer yapıda farklı absorpsiyon özellikleri olan değişik preparatlar da sentezlenmiştir⁴².

Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) açlık plazma glukozunun (FPG) 126 mg / dl (7 mmol/L) veya üstünü diyabet olarak tanımlamaktadır⁴³. Hiperglisemi de denilen Diabetes Mellitus, modern toplumlarda en belirgin halk sağlığı sorunlarından biridir ve insidans oranı hızla artmaktadır⁴⁴. 2013 yılında, dünya genelinde tahmin edilen 295 milyon⁴⁵, günümüzde yaklaşık 382 milyon insan DM'den muzdarip olup bu vakaların % 10'unu tip 1 diyabet oluşturmaktadır⁴⁶. Bu sayı yetişkin nüfusun % 8.3'üne eşittir. 2012 ve 2013 yıllarında diyabet, yılda 1.5 - 5.1 milyon insanın ölümüyle sonuçlandı ve dünyada 8. ölüm nedeni oldu⁴⁷. Koruyucu önlemler alınmadığı sürece 2030 yılına kadar diyabetli hasta sayının 439 milyona çıkacağı tahmin ediliyor⁴⁵.

Yüksek şeker tüketimi, yüksek kalorili diyetle yapılan düşük fiziksel aktivite, genetik duyarlılık ve yaşam tarzı nedeniyle ortalama bir diyabet başlangıç yaşı 42.5'dur. Dünyada yaklaşık % 8 çocuk ve % 26 genç erişkin diyabet hastası olup bu oranlar gün geçtikçe artmaktadır⁴⁷.

2.5.1. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması

Dünya sağlık organizasyonu (WHO) ve Amerikan Diyabet Derneği (ADA) tarafından günümüzdeki sınıflandırılması hastalığın etiyojisine dayanır:

▪ **Tip 1 diyabet:** Pankreas β hücre harabiyeti sonucunda vücudun yeterince insülin üretememesinden kaynaklanır. Genç diyabet olarak da bilinir. Bu diyabetin nedeni henüz tam olarak belirlenememiştir.

▪ **Tip 2 diyabet:** İnsülin direnci zemininde gelişen β hücre insülin sekresyonu bozukluğudur. Erişkin başlangıçlı diyabet olarak da bilinir. Nedeni yüksek yağlı diyet ve düşük fiziksel aktivitedir.

▪ **Diğer spesifik tipler:** Genetik defektler, ekzokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, vs.

▪ **Gestasyonel diyabet (GDM):** Gebelik öncesinde diyabet öyküsü olmayan ancak gebelik esnasında tanı konulan diyabet formudur. Gebelik diyabeti genellikle doğumdan sonra düzelir^{43,47,48}.

2.5.1.1. Tip 1 diabetes mellitus

Kalıtsal hastalık olduğu kabul edilen Tip 1 DM'ye 'insüline bağımlı diyabet' veya 'juvenil diyabet' de denilmektedir. Tip 1 DM, pankreatik Langerhans adacıklarında (LA) insülin üreten β hücrelerinin oto-reaktif T hücresine bağlı yıkımı ile ketoasidoz gelişme eğilimi gösteren hiperglisemiye ve insülin eksikliğine yol açan kronik bir otoimmün hastalıktır^{33,46,49,50}. Otoimmün hasarı oluşturan faktörlerin tamamının anlaşılammış olmasına karşın, Tip 1 DM'nin patogenezinde tetikleyiciler olarak, özellikle antijen sunumunda yer alan insan lökosit antijeni (HLA) genleri gösterilmiştir. Yüksek riskli HLA sınıf II gen varyantlarının otoantikorlarla kombinasyonu, pozitif öngörüü daha da arttırır. Ancak, bu belirteçler ihtiyaçları tam olarak karşılamamaktadır⁵¹. Bununla beraber oto-antijenler, virüsler, temel ve çevresel metaller ve iz elementler diyabeti etkileyen faktörlerdendir⁵². β hücrelerinin imha hızı genellikle daha genç

yaşlarda daha hızlı meydana gelmektedir⁵⁰. Bu hastalık, çoğunlukla çocukluk ve ergenlik döneminde aniden ortaya çıkmakta ve kişinin insülin üretme yetisini ortadan kaldırmaktadır³⁴. Artan kan glukoz seviyesinin düzenlenmesi için mutlaka dışarıdan enjeksiyon ile insülin alınması gerekir³⁴. Dünyada ki 20 yaş altı diyabet hastalarının en sık karşılaştığı diyabet türü % 85 ile tip 1 diyabettir. Görülme sıklığı, doğumdan itibaren artar ve puberte döneminde (10 - 14 yaş) doruklara çıkar. Artan Tip 1 insidansı özellikle küçük çocuklarda daha belirgindir. Avrupa'daki son kayıtlara göre, bu oran 0 - 4 yaş grubunda en yüksek seviyededir. İnsidans oranları ergenlikten sonra düşmekte ve genç erişkinlik döneminde (15 - 29 yaş) stabilize hale gelmektedir. Yetişkinlerde Tip 1 DM insidansı çocuklara göre daha düşük düzeydedir buna rağmen Tip 1 diyabete sahip hastaların yaklaşık %25'i yetişkinlerden oluşur⁵².

2.5.1.2. Tip 2 diabetes mellitus

Tüm diyabet vakalarının % 90'ını oluşturmakta olup en yaygın görülen diyabet formudur⁴⁷. Bu form 'insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus' veya 'erişkin başlangıçlı diyabet' olarak bilinir⁴⁷. Tip 2 diyabet, heterojen bir hastalık özelliğinde olup hastalığın temelinde, genetik olarak yatkın kişilerde yaşam tarzı ile tetiklenen ve giderek artan insülin direnci üzerine β hücre yetmezliği eklenen sonucunda zamanla azalan insülin salınımı söz konusudur⁵³. İnsülin direnci, plazmada insülin bulunmasına (pankreasın yeterince insülin salgılayabilmesi) rağmen hücrelerde insülinin bağlanabileceği reseptörler olmadığından ya da reseptörün bulunmasına karşın yapısal bozukluklar sebebiyle bağlanamadığından gerçekleşir⁵⁴. Bunun sonucunda glukoz hücre içine alınmaz, plazma glikoz düzeyi artışı görülür ve genellikle başlangıçta insülin gereksinimi olmadan kontrol edilebilen bir hastalıktır^{55,56}. İnsülin direnci β -hücre salgılanması azalmadığı sürece tek başına Tip 2 diyabete neden olmaz. Tip 2 diyabet genellikle kas, yağ ve karaciğer seviyesinde insülin direnci eşliğinde β - hücreleri çoğunlukla işlev bozukluğu olan kişilerde gelişmektedir⁵³.

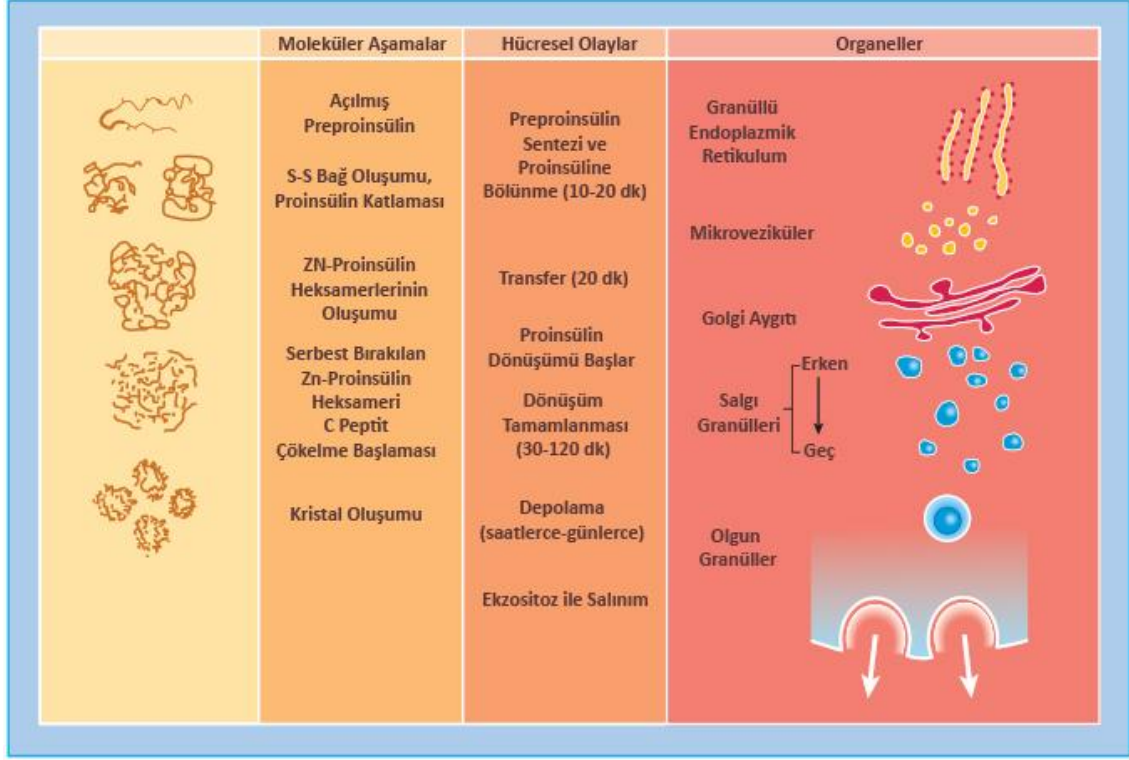
Genellikle orta ve ileri yaş erişkinlerde daha sık rastlanan diyabetin bu tipi genetik orijinli olup, kalıtsal özellik gösterir. Tip 2 diyabet görülen hastaların % 60 - 90'ının obez olduğu bilinmektedir⁵⁴. Bu hastalığın prevalansı, yaşlı popülasyonun artışı, sedanter yaşam tarzının yaygınlaşması ve obez insan sayısındaki yükselişle beraber giderek artmaktadır. Tip 2 DM, insülinli veya insülin olmayan ilaçlarla tedavi edilir.

Uygun tedavi edilmediğinde ise morbidite ve mortalite oranı yüksek olabilen bir hastalıktır⁴⁷.

2.5.2. İnsülin

İnsülin hormonu pankreasın Langerhans adacıklarında bulunan β hücrelerinden salgılanan ve vücuttaki karbonhidrat metabolizmasının (hipoglisemiyan) düzenlenmesinde glukagon ile birlikte rol alan bir hormondur⁵⁷. β hücreleri, insülin sekresyonunu arttırmanın yanı sıra insülin üretimini arttırarak dolaşımdaki besin konsantrasyonlarındaki artışlara yanıt verir, böylece insülin depolarını korur⁵⁸. β hücrelerinin ribozomlarında 600 nükleotidli bir mesajcı RNA'nın translasyonu başlatmasıyla 11.5 kDa ağırlığında bir polipeptid olan preproinsülin sentezlenir. İnsülinin öncüsü olan preproinsülini kodlayan gen, insanlarda kromozom 11'in kısa kolunda bulunur. 1355 baz çifti uzunluğundadır ve kodlama bölgesi üç ekzondan oluşur⁵⁹. Preproinsülin hızlı bir şekilde granüllü endoplazmik retikuluma gelir ve burada membranını geçip lümenine girerken, proteolitik enzimlerce lider peptidi (sinyal peptit, pre) kesilir. Geriye A, B, C peptid zincirlerinden oluşan 9 kDa ağırlığında proinsülin kalır. Proinsülin endoplazmik retikuluma, yeniden kesilir ve birbirlerine disülfid köprüleriyle bağlı A - B zincirleri ve C peptidinden (bağlayıcı peptid) oluşur. Proinsülin ve insülinin yapısal özellikleri çok benzerdir ve C peptidinin temel işlevi, A ve B zincirlerini bağlayan disülfid köprülerini organize ederek, molekülün doğru bir şekilde katlanmasını sağlamaktır. Proinsülinin insüline dönüşümü, golgi kompleksinde başlatılır ve olgunlaşan salgı granülünün içindeki endopeptidaz ve karboksipeptidaz H'nin ardışık etkisi ile C peptid zinciri ayrıştırılarak disülfid köprüleri serbest bırakılır sonuçta insülin açığa çıkar. İnsülin ve C peptidi salgı granüllerinde salgılanmak üzere birlikte depolanır ve sonuçta düzenlenmiş ekzositoz işlemi ile eşit mol miktarlarında salınır. Normal koşullar altında oluşan ürünün % 95'i insülin (ve C peptidi) ve % 5'i ise hala proinsülin formundadır. Ancak, tam işlenmemiş insülin öncüllerinin salgılanması tip 2 diyabetli bazı hastalarda artmıştır⁶⁰. Oluşan insülin küçük bir protein olup molekül ağırlığı 5.8 kilodaltondur (kDa)³³. Birbirine disülfid köprüleri ile bağlanmış 21 aminoasitli ve 30 aminoasitli iki aminoasit zincirinden oluşur^{33,60}. Disülfid köprülerinin yıkılıp, A ve B zincirlerinin birbirinden ayrılması halinde, insülin molekülü fonksiyonel etkinliğini yitirir³³. İnsan pankreası günde ortalama 40 - 50 ünite (U) insülin salgılamaktadır⁶¹. İnsülin, kana ilk salgılandığında tamamına yakını serbest dolaşır; kandaki ortalama yarılanma ömrü 6 dakika kadardır, sekresyondan 10 - 15 dakika sonra

dolaşımdan temizlenir. Hedef hücrelerde bulunan reseptörlere bağlanmış olan insülin dışında tamamı başta karaciğer olmak üzere azalan oranlarda böbrek, kas ve çok az diğer dokularda insülinaz enzimi ile yıkılır. İnsülin kontrol fonksiyonlarının hızlı bir şekilde sonlandırılması, bu fonksiyonların başlangıcı kadar önemli olduğu için, plazmadan hızlı bir şekilde uzaklaştırılmasının ayrı bir değeri vardır³³.



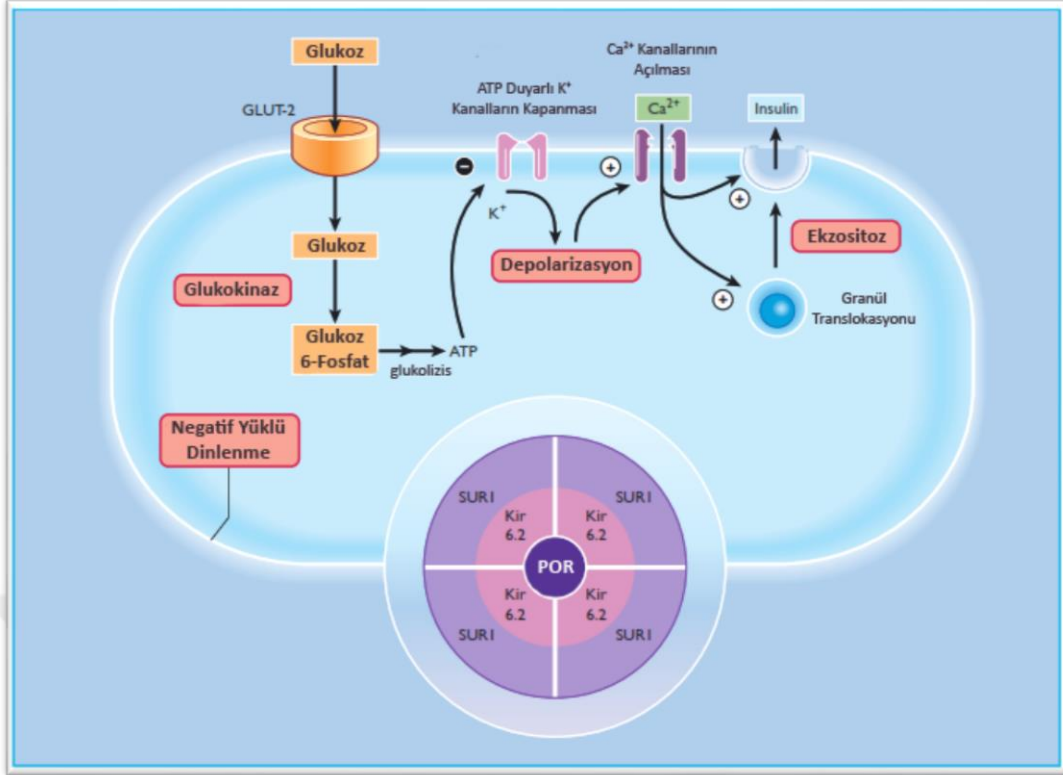
Şekil 5 İnsülin biyosentezi, işleme ve depolamanın hücre içi yolları⁶⁰

İnsülin etkileşiminin hedef hücrelerde başlayabilmesi için, öncelikle 300 kDa ağırlığında bir zar reseptör proteinine bağlanarak onu aktive etmesi gerekir. Sonrasındaki etkileşimi insülin yerine aktive olan reseptör sağlar. İnsülin reseptörü iki α ve iki β alt birimlerinden oluşur. Bu birimler birbirlerine disülfid köprüleri ile bağlanmışlardır. β alt birimler hücre zarını geçerek sitoplazmaya uzanırken, α alt birimler bütünüyle hücre zarının dışında yer alır. İnsülin α alt birimlerine bağlanırken, β alt birimler aralarındaki disülfid köprüler sayesinde otofosforile olur. Reseptörün otofosforilasyonu, lokal bir tirozin kinazı aktive ederek insülin reseptörü substratları (IRS) dahil olmak üzere çok sayıda hücre içi enzimin fosforilasyonuna sebep olur³³. Sonuç olarak insülin, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının düzenlenmesinde etkilidir⁵⁷. Normal bir bireyde besinlerle alınan glukozun \sim % 30-40'ı lipidlere, \sim % 10'u glukojene çevrilir. İnsülinin yokluğunda ise glikoneojenez engellenerek lipolizis artar ve karaciğerde keton cisimleri oluşur. Keton cisimlerinin bir kısmı enerji kaynağı

olarak dokularca kullanılır. Üretilen keton cisimleri çevre dokuların gereksiniminden fazla bir düzeye ulaşırsa bunların kanda birikimi sonucu ketoz ve asidoz gelişir³³.

Pankreas β hücreleri, hücre dışı glukoz konsantrasyonlarında, dar bir fizyolojik aralıktaki değişikliklere cevap verir⁶⁰. Fazla miktarda karbonhidrat alınımından hemen sonra kana geçen glukoz, hızla insülin salgılanmasına sebep olur. İnsülin glukozun bütün vücutta, özellikle kas, karaciğer ve yağ dokusu tarafından yakalanması, depolanması ve kullanılmasını sağlar. Kan glukoz konsantrasyonundaki artış insülin salgısının en önemli nedenidir³³. Glukoz β hücrelerine yüksek kapasiteli glukoz taşıyıcıları (GLUT; kemirgenlerde GLUT2, insanlarda GLUT1, 2 ve 3⁶²) ile taşınır ve hücre içi-hücre dışı glukoz konsantrasyonlarının hızla dengelenmesini sağlar⁶⁰. β hücre glukozu “glukoz sensörü” olarak işlev gören glukokinaz ile glukoz - 6 - fosfata fosforillenir. β hücresinde bu aşama, insülin miktarını kan glukoz seviyesine göre ayarlama da önemlidir⁶³. Glukoz ile indüklenen insülin sekresyonunun doz - cevap eğrisi sigmoidaldır ve esas olarak glukokinazın aktivitesi ile belirlenir. 5 mmol / L'nin altındaki glukoz konsantrasyonları insülin salınım hızlarını etkilemez ve bazal düzede insülin salınımı devam eder, ~8 mmol / L'de ise kısmi bir uyarılma olur. Sekresyon oranı, hücre dışı glukoz seviyelerinde 5 ila - 15 mmol / L arasında kademeli olarak artar⁶⁰. İnsülin salgısı iki faz ile karakterizedir: Yüksek glukozu verdiği tepki süresi, hızlıca yükselen ancak geçici olan bir ilk faz, ardından bazal düzeyde uzun süreli devam eden ikinci faz⁶⁰.

Hücre dışı glukozun yokluğunda, membran hücre zarı potansiyeli, potasyum iyonlarının düzenleyici potasyum kanallarından akmasıyla potasyum denge potansiyeline yakın tutulur. Bu kanallara ATP'ye duyarlı potasyum (K_{ATP}) kanalları adı verilir. K_{ATP} kanalının bu özelliği, glukoz metabolizmasını insülin sekresyonuna bağlamakta çok önemlidir⁶⁴. Glukoz - 6 - fosfat, K_{ATP} kanallarını inhibe eden adenzin trifosfatı (ATP) oluşturmak için okside olur³³. Glukoz metabolizmasını takiben ATP üretiminin ve ADP seviyelerinin birlikte düşmesi ile K_{ATP} kanalları kapanır. Kanalların kapanması ve ardından potasyum akışındaki azalma, β hücre zarının depolarizasyonuna ve hücre zarındaki voltaja - duyarlı kalsiyum kanallarının açılmasına neden olur. Hücre içine kalsiyumun girişi ve sonuçta sitosolik Ca^{2+} 'da meydana gelen artış, insülin salgılama granüllerinin ekzositozunu tetikler, böylece insülin salınımı başlamış olur⁶⁴.



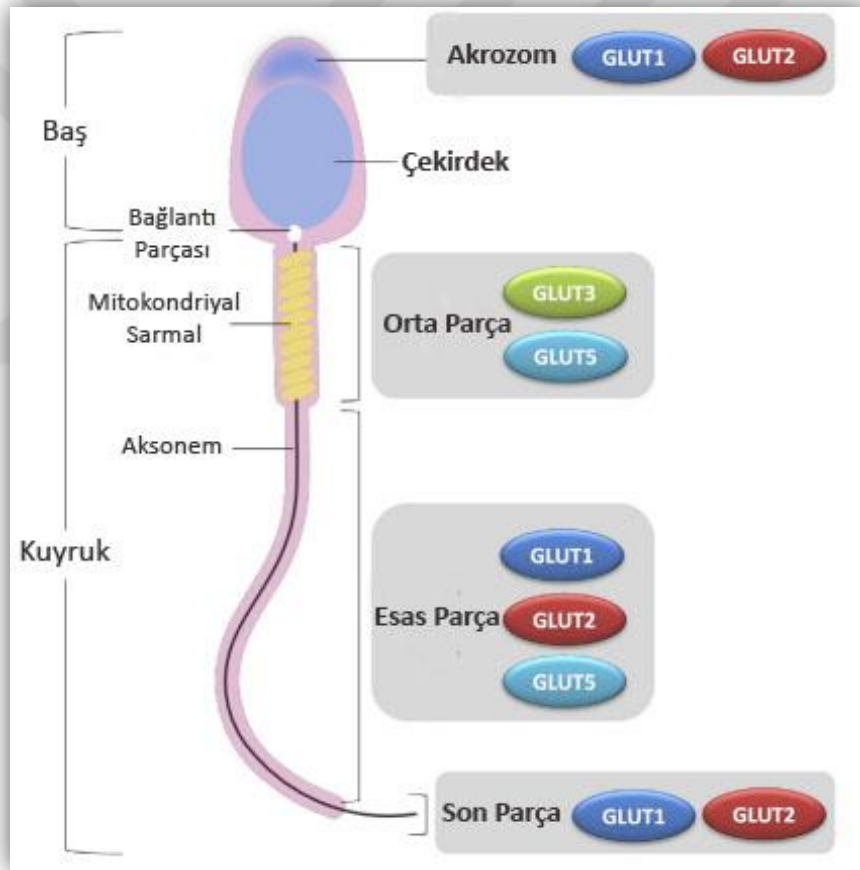
Şekil 6 Glikozun insülin sekresyonunu uyardığı hücre içi mekanizmalar. Glikoz, hücre zarındaki ATP'ye duyarlı potasyum kanallarını kapatan ATP'nin üretilmesi için β hücresinde metabolize edilir. Bu, potasyum iyonlarının hücreden ayrılmasını önleyerek zardaki voltaj kapılı kalsiyum kanallarını açan ve kalsiyum iyonlarının hücreye girmesini sağlayan zar depolarizasyonuna neden olur. Sitosolik kalsiyumdaki artış granül ekzositozunu başlatır. Sülfonilüreler, K_{ATP} kanalının (içindekiler) SUR1 bileşenine bağlanarak glukoz metabolizmasının aşağısında etki eder. GLUT, glukoz taşıyıcısıdır⁶⁰

Glukoz hücreler için önemli metabolik bir yakıttır. Vücuda alınan besinlerin birçoğu glukozla parçalanır, kan akışına katılır ve hücre içine alınır. Böylece hücrelerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli enerji sağlanmış olur⁶⁵.

İnsülin ve glukagon glukoz homeostazı için kritik iki hormondur ve alınan glukoz miktarı ile büyüme hormonu ve glikokortikoidler gibi kan glukoz düzeyine etkili diğer hormonların kandaki seviyelerine göre salgılanırlar⁶⁵. Sağlıklı bireylerde insülin ve glukagon, kan glukoz seviyelerini karşılıklı olarak modüle ederler. Artan glukagon sekresyonuna bağlı insülin sekresyonunda kombine bir düşüş meydana gelir. Glukagon, glukoz değerleri normal açlık seviyesinin altına düştüğünde hipoglisemiye önlemek için hepatik glikojen yıkımını ve glikoz üretimini uyararak, Langerhans adacıklarında bulunan α - hücreleri tarafından salgılanan 29 amino asitli bir peptid hormondur^{66,67}. İnsülin ise yemeklerden sonra glukoz seviyesi yükseldiğinde β hücrelerinden salgılanır⁶⁶ ve kan glukoz düzeyini düşüren tek hormondur⁶⁵. İnsülin bir parakrin tarzında glukagon sentezini inhibe ederken, glukagon insülin sentezini stimüle eder⁶⁶.

2.5.3. Diabetes mellitus ve erkek infertilitesi

Testis dokularındaki ve çeşitli türlerin spermelerindeki GLUT ekspresyonunu tanımlamak ve karakterize etmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. GLUT5, insan testisinde ve spermde tanımlanan ilk glukoz taşıyıcısıdır. Daha sonra, GLUT1 ve GLUT2'nin insan spermatozoasının akrozomal bölgesinde, baş ve kuyruk parçalarında da mevcut olduğu bildirilmiştir ancak Leydig hücrelerinde gözlenememiştir^{32,68}. Genel olarak, elde edilen veriler insan spermatozoasının GLUT1, GLUT2, GLUT3 ve GLUT5'i eksprese ettiğini göstermektedir. Bununla beraber insan sperm hücre membranında, GLUT1, GLUT2, GLUT3 ve GLUT5 proteinlerin varlığı ortaya konulmuştur⁶⁹.



Şekil 7 İnsan sperm hücresinin şematik gösterimi. Birkaç glikoz taşıyıcı izoformunun lokalizasyonunun spermatozoonun baş ve kuyruğunda konumlandırılması. GLUT1 glukoz taşıyıcı 1; GLUT2 glukoz taşıyıcı 2; GLUT3 glukoz taşıyıcı 3; GLUT5 glukoz taşıyıcı 5³²

Spermatogenezin sürekliliği, hormonal kontrol altındadır. Spermatogenez ürünü olan spermatozoalar metabolik ihtiyaçları için glikoz, fruktoz gibi 6 karbonlu monosakkaritleri kullanırlar. Spermatogonium kan-testis bariyerinin dışında yer alır, bu

nedenle spermatogonium, metabolik kaynak olarak plazmadaki glikozu kullanabilir. Kan-testis bariyeri içindeki germ hücreleri, glikozu kullanabilme yeteneğine sahip olmayıp enerji üretmek için sertoli hücrelerinden aldıkları laktatı kullanırlar. Bu sayede germ hücreleri hayatta kalabilir ve farklılaşabilirler^{32,70}. Sperm yüksek bir glikolitik kapasiteye sahip olup aktivasyon ve kapasitasyon için glikoz bağımlıdır⁷¹. Bu da hekzosların erkek üreme sistemindeki organizasyonunun değerini göstermektedir⁷⁰. Glikozun alınması ve metabolize edilmesi erkek fertilitésinin korunmasında önemli bir role sahiptir, glikoz sadece spermatogenezin devamlılığı için değil, aynı zamanda sperm hücreleri tarafından doğurganlık kapasitesinin elde edilmesi için de çok önemlidir.

Son zamanlardaki çalışmalar, infertil erkek sayısında bir artış olduğunu ortaya koymaktadır. Erkek infertilitesinin başlıca sebepleri arasında, hormonal bozukluklar, geçirilmiş enfeksiyonlar, diyabet, genetik faktörler, organ yetmezliği gibi metabolik hastalıklar gösterilmektedir^{72,73}. Kriptorşitizm gibi patolojiler de kısırlığa sebep olmaktadır⁷⁴. Son yıllarda erkek infertilite insidansını artıran diğer faktörler, yetersiz beslenme, artan çevre kirliliği, çeşitli kimyasallara maruz kalma, radyasyon, sigara tüketimi, alkol ve bağımlılık maddesi kullanımı gibi çevresel faktörlerdir. Kandaki yüksek glikoz düzeyi, damarlara ve sinirlere zarar vermekte olup bu tahribata bağlı olarak tetiste disfonksiyonlar görülmektedir. Diyabetik hastaların ve hayvanların doğurganlığı üzerinde olumsuz etkilere sahip olan DM'nin; testis ağırlığında azalmaya ve apoptotik değişikliklere neden olarak spermatogenezde bozulmaya, bozulmuş sperm kalitesine, yüksek oranda nükleer ve mitokondriyal DNA hasarlı spermatozoalara, kan testis bariyerinde değişmiş glukoz metabolizmasına, erektil disfonksiyona, seminifer tübüllerin boyutunda azalmaya, testosteron sentez ve salgısında azalma ve libidoyu azaltarak erkek infertilitesine sebep olduğu bildirilmiştir^{1,44,46}. İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan diyabetik çalışmalar, seminiferöz tübüllerin atrofisi, germ epitelinin düzensizliği ve hücre kaybı, spermatogenezin arresti, bazal membran kalınlaşması ile Leydig hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Bu değişikliklerin oksidatif stres ve DM nedeniyle hormonal bozulmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir⁷⁵⁻⁷⁸.

2.5.4. Serbest radikaller

Serbest radikaller yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron

bulunduran reaktif kimyasal ara ürünlerdir^{79,80}. Bu paylaşılmamış elektronu, yakındaki hücrel yapılar transfer ettiklerinde hücrel hasarları indüklerler. Bu durum hücre zarı lipidlerinin, proteinlerdeki amino asitlerin veya nükleik asitlerin oksidasyonuna yol açar⁸¹.

Canlı organizmada aerobik şartlarda serbest radikallerin en önemli kaynağı moleküler oksijendir⁸². Hücre metabolizması esnasında, yan ürün olarak açığa çıkan serbest radikallerin (SR), çoğu oksijen radikali halinde bulunur. Serbest oksijen radikalleri (SOR), doymamış yağ asitleri, karbonhidratlar, nükleik asitler ve proteinleri hedef alırlar⁸³. Oluşan serbest radikaller, hücrede öncelikle DNA ile etkileşime girerler. Bu etkileşimin sonucu olarak kromozomal yapıda mutasyonlar oluşur. DNA zincirinin kopması, nükleik asit yapısındaki baz değişimleri bu mutasyonların başlıca sebebidir. Serbest radikallerin bu etkilerinin birçok hastalığın temelini oluşturduğu düşünülmektedir⁸⁴.

Serbest radikaller hücrel yapıları bozarak hücre hasarlarına neden olurlar. Bu hasarlar sonucunda reaktif türler (RS) ortaya çıkar. Aynı zamanda, organizmanın soluduğu oksijenin %95 'i H₂O'ya indirgenirken, kalan %5'i reaktif oksijen türlerini (ROS) ve reaktif nitrojen türlerini (RNS) meydana getirir⁸⁵. Bu reaktif türler ikili rol oynayarak organizma için hem zararlı hem de faydalı olabilirler. ROS, hücre içi sinyalizasyonda, hücre farklılaşmasında, konakçı savunmasında, sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde, protein fosforilasyonunun düzenlenmesinde, NF-kB ve AP-1 ailesi faktörleri gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu da içeren gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynarken aynı zamanda artan ROS miktarı protein, RNA ve DNA hasarı ile dolaylı yoldan kanser, arteriyoskleroz, artrit, nörodejeneratif bozukluklar ve yaşa bağlı hastalıkların gelişiminde anahtar rol oynadığı öne sürülmüştür⁸⁶. ROS, hem endojen hem de eksojen maddelerden üretilebilir. Potansiyel endojen kaynaklar arasında mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve inflamatuvar hücre aktivasyonu bulunur⁸⁷. Mitokondri, serbest radikal oluşumunun ana bölgesi olduğundan, organeldeki oksidatif stresi en aza indirmek için, membranlarının her iki tarafında bulunan glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler antioksidanlarla zenginleştirilmiştir⁸⁸. Hücrel reaktif oksijen türlerinin ilave endojen kaynakları nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlardır⁸⁹. ROS'un zararlı etkileri, antioksidan enzimlere ek olarak enzimatik olmayan antioksidanların

antioksidan etkisi ile dengelenir⁹⁰. Reaktif yapısının yüksek olmasından dolayı ROS, diğer moleküller ile kolayca birleşebilir, doğrudan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle beraber hücrel hasara yol açabilecek oksidasyona neden olabilir^{91,92}. ROS, kimyasal reaktif moleküller olup radikallerin (hidroksil radikali (OH⁻), süperoksit (O₂⁻), nitrik oksit (NO), peroksil (ROO[·])), radikal olmayanların (ozon, tek oksijen, lipid peroksit, hidrojen peroksit (H₂O₂)) ve oksijen türevlerinin toplandığı geniş bir molekül kategorisini temsil eder⁹³. Reaktif azot türleri (azot oksit, peroksinitrit, nitroksil iyonu, vb.) serbest azot radikalleridir ve ROS'un bir alt sınıfı olarak kabul edilir^{94,95}.

Serbest oksijen radikallerinin üretimi normal biyolojik fonksiyonlarının ayrılmaz bir parçasıdır. Gerçekleşen tepkimelerin sonucunda üretilen radikaller tekrar kullanılabilir ve önemli ölçüde radikal birikimi görülmez⁹⁶. İnsan vücudundaki antioksidan savunma sistemi radikallerin birikimini engelleyebilecek düzeydedir ancak karşılaşılan çevresel etmenler bu savunma direncini düşürebilmektedir. Hücredeki serbest radikallerin oluşum hızıyla ortadan kaldırılma hızları arasında oksidatif bir denge bulunur. Bu denge sağlandığı sürece, organizma serbest radikallerden etkilenmez. Radikallerin oluşum hızlarında ki artış veya yok edilme hızlarında ki düşüş bu dengenin bozulmasına sebep olur⁹⁶. Bu bozulma ile oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar.

Oksidasif stresin oluşması, lipid peroksidasyonunun oluşmasına neden olur. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden en çok etkilenen yapılardan biri de membran lipidleridir⁹⁷. Memeli hücre membranları çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) bakımından zengindir ve lipid peroksidasyonunun aracılık ettiği oksijenin neden olduğu hasara karşı hassastır⁹².

Lipid peroksidasyonu; çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasif oksijenle birlikte yıkımıdır. Bu peroksidasyon ile hücre membran yapısı, akışkanlığı bozulur ve kalsiyum gibi iyonlar hücreye girer. İyonların hücre içinde artmasıyla proteazlar aktive olmaya başlar. Bu aktivasyon ile hücre iskeletinde hasarlar meydana gelir. Aynı zaman da kalsiyum iyonu ile endonükleazların aktive olması, DNA da kırılmalara neden olur⁹⁸.

2.5.5. Diabetes mellitus'a bağlı oksidatif stres

Pankreas β hücrelerinin asıl görevi glukoz uyarısıyla insülin sekresyonudur. DM patogenezinde ana etken, pankreas β hücre disfonksiyonu ve kaybı ve kan glukoz seviyelerini kontrol etmek için yeterli miktarda insülin üretilmemesidir. Yapılan

çalışmalar, normal hücre fonksiyonunun kaybında oksidatif stresin bir rolü olduğuna işaret eder⁹⁹.

Oksidatif stres, genellikle oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin, oksidanlar yönünde bozulmasıyla ve yüksek reaktif kimyasal bileşikleri nötralize etmek için kullanılan endojen antioksidan kabiliyetinin bastırılmasıyla ortaya çıkar¹⁰⁰⁻¹⁰². Ortaya çıkan oksidatif stresin bir işareti DNA çapraz bağlanma ve apoptoz gibi hücrel hasardır. Aynı zamanda OS, kanser, yaşlanma, kalp hastalıkları, diyabet ve diyabetin komplikasyonları başta olmak üzere pek çok patolojik durumun ve de yaşlanmanın patogeneziyle yakın bir ilişki içerisinde¹⁰³. DM'de serbest radikallerin; non-enzimatik glikozilasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının arttığı ve antioksidan savunma duvarının aşıldığı durumda diyabetik komplikasyonlara yol açtığı vurgulanmaktadır^{98,104}. Diabetes mellitusta, protein oksidasyonu ile serbest radikallerin sentezlerinde artma, süperoksit dismutaz temizleyici gücünde azalma ve indirgenmiş glutatyon yokluğu oksidatif stresin kaynakları olarak kabul edilmektedir¹⁰⁵. Disfonksiyonel redoks homeostazinin, çeşitli mekanizmalar yoluyla hastalığın patogenezinde ve komplikasyonlarında rol oynadığı uzun süredir bilinmektedir ve diyabet hastalarının, hücrel seviyelerde reaktif oksijen türlerine (ROS) ve ROS'un indüklediği DNA hasarına sahip oldukları gösterilmiştir¹⁰³. Yapılan çalışmalar, diyabetteki artmış glisemik yükün Krebs döngüsünü bastırdığını, bunun da mitokondri zarında yapılan transferin engellenmesine ve serbest radikallerin birikmesine neden olduğunu göstermiştir¹⁰⁶. ROS üretiminin artmasıyla, doğal antioksidan moleküllerin tükenmesi ve vasküler hücrelerde zararın görülmesinin yanı sıra, gen ve protein ekspresyonu, kan akışı ve endotel hücre geçirgenliği değişiklikleri görülür¹⁰³. Diyabette antioksidan tedavisinin, glisemik indeksi yükselttiği, diyabetik komplikasyonları azalttığı ve serbest radikalle uyarılmış oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir¹⁰⁷.

2.5.6. Testis ve diabetes mellitus

1980'li yıllardan beri reaktif oksijen türlerinin diyabetteki rolü geniş çaplı tartışılan bir konu olup son yıllarda oksidatif stres ve diyabet arasındaki ilişkilerin mekanizmaları ile

ilgili yapılan çalışmalar artmıştır^{108,109}. Hiperglisemi ile uyarılan reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek miktarda üretimi sonucunda meydana gelen oksidatif stres, diyabetle ilgili önemli komplikasyonlardan sorumludur¹¹⁰.

DM'nin uzun zamandır tanımlanmış önemli komplikasyonlarından biri de anormal sperm yapımı ve üreme sistemine olumsuz etkisidir¹¹¹. Testis; steroidogenez ve sperm üretimini desteklemek amacı ile antioksidanlar bakımından korunmasına rağmen, bazı endojen ve ekzojen faktörlerin bu savunmayı bozduğu ve oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Diyabetin neden olduğu oksidatif stres erkek üreme sistemine çeşitli zararlar vererek, diyabetik erkekler de infertiliteye neden olmaktadır^{112,113}. Erkek infertilitesinin diğer sebeplerinden bazıları; inmemiş testis, testiküler torsiyon, varikosel, hormonal dengesizlikler, hipertiroidizm ve enfeksiyondur¹¹⁴.

Spermin temel enerji kaynağı olarak kullandığı maddelerden biri olan glukoz, spermatogenez sırasında kan-testis bariyerinden pasif difüzyonla geçmektedir ve spermin temel hücre aktiviteleri, spesifik fonksiyonları, motilitesi ve ferzilizasyon kabiliyeti için önemli bir role sahiptir. Dolayısıyla tübül içindeki glukoz seviyesi spermatogenezin sürekliliği için çok önemli olup diyabetteki hiperglisemik durumla meydana gelen glukoz dengesizlikleri spermatogenezin sürekliliğini bozmakta ve sperm kalitesini oldukça etkilemektedir^{115,116}.

DM'de glukoz homeostazisinin başarısız olması, seks hormonları üzerinde de değişikliklere sebep olmaktadır⁷⁸. DM'nin neden olduğu bu hormonal değişiklikler, testis ve sperm hücrelerinin glukoz algılama mekanizmalarını etkileyerek diyabetik hastaların serumlarında luteinizan hormon (LH), folikül uyarıcı hormon (FSH), prolaktin ve büyüme hormon düzeylerini azaltmaktadır^{32,117}. Bir endokrin hastalık olarak diyabet aynı zamanda hipotalamo-hipofizeal-testiküler aks hormonlarını etkileyerek anormal geribildirimlerde bulunulmasına ve hipofiz duyarlılığının azalmasına sebep olmaktadır^{33,117}. Bu değişiklikler, özellikle testiküler işlevselliği, spermatogenezi, spermiyogenezi ve sperm metabolizmasını etkilemektedir¹¹⁷. Glukoz homeostazı, in-vivo spermatogenezin ve spermlerin fertilite kapasitesinin korunması için oldukça önemlidir³². Testiküler fonksiyonda DM tarafından uyarılan bu komplikasyonlar, glukoz homeostazından sorumlu lider hormon olan insülinin eksikliğiyle ilişkilendirilmektedir. Beyindeki insülin sinyali üreme fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır¹¹⁸. İnsülinin, hipotalamik GnRH nöronal hücre dizisinde GnRH sekresyonunu arttırdığı ve hipofiz hücre kültürlerinden

gonadotropin salgılanmasını ve kültüre edilmiş leydig hücrelerinden testosteron salınımını uyardığı gösterilmiştir¹¹⁹. Yapılan deneysel çalışmalar ile düşük plazma insülin seviyesinin, plazma LH seviyesini düşürdüğü bildirilmektedir¹¹⁹.

Diyabet, üreme çağındaki genç erkeklerin bir kısmında görülmektedir¹¹⁵. Fertiliteleriyle ilgili yapılan çalışmalar, DM'nin görülme sıklığındaki artışın fertilitede azalmayla yakından ilişkili olduğunu göstermiştir^{32,107}. Diyabet çeşitli yollarla erkek üreme fonksiyonlarını etkilemekte^{115,116} ve bu etki sonucunda düşük testosteron düzeyi, testiküler disfonksiyon ve yetersiz spermatogenez meydana gelmektedir. Testislerde, tunika albuginea, seminifer tubüllerde, interstisyel bağ dokusu içinde ve Leydig hücrelerinde diyabete bağlı olarak histopatolojik değişiklikler izlenmektedir³⁸. Yapılan son çalışmalar, tip 1 ve tip 2 diyabete sahip genç hasta sayısında devam eden bir artış olduğunu göstermiştir. Bu artışın aktif üreme çağındaki birçok diyabetli erkeği etkiliyor olması, yakın gelecekte DM'ye bağlı fertilité problemlerinin artacağına göstergesi olarak düşünülebilir. Ayrıca DM ile ilişkili hormonal ve metabolik değişikliklerin de erkek infertilitesinin gelişmesinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Glukoz homeostazisi, spermatogenezin devamında ve sperm fertilizasyon kapasitesinin korunmasında kritik bir önem taşıdığından DM'nin testiste meydana getirdiği komplikasyonların, glukoz homeostazisinde önde gelen hormon olan insülin yokluğuyla ilgili olduğunu düşündürmektedir³².

2.5.7. Testis ve oksidatif stres

Sperm metabolizması ve DM, oksidatif stres ile yakından ilişkilidir. Diyabetik hastalarda genellikle yüksek seviyede oksidatif stres ve dolayısıyla aşırı ROS üretiminin yanı sıra antioksidan savunma düzeylerinde azalma görülmektedir. Bu koşullar erkeklerin üreme potansiyeli için oldukça tehlikelidir çünkü diyabetik bireylerin fertilizasyon kapasitesi, hipergliseminin neden olduğu yüksek oksidatif stres seviyelerinden kaynaklanan spermde artan DNA hasarı yüzünden tehlike altındadır. Spermdeki ROS üretimi çoğunlukla, mitokondri tarafından tüketilen az miktarda oksijenin elektron transport zinciri kompleks I ve kompleks III'den sızmasıyla oluşur⁹². Spermatozoa tarafından üretilen ROS, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, dölleme kabiliyetinin sürdürülmesi ve orta parçadaki mitokondriyal kapsülün stabilizasyonu gibi normal fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Kontrollü ROS

üretimi, birçok farklı hücre tipinde sinyal molekülleri (ikincil haberciler) olarak işlev görebilir ve sperm fonksiyonlarının önemli araçlarıdır⁹². ROS ve IVF oranı arasında anlamlı bir negatif korelasyon bulunmuş olmasına rağmen, döllenmeyi sağlamak için gerekli olan kapasitasyon ve hiperaktivasyon gelişim sürecinde kontrollü ROS üretiminin gerekli olduğu gösterilmiştir⁹². Başka bir açıdan kriyoprezervasyon sırasında semen soğuk şok ve atmosferik oksijene maruz kalır, bu da ROS'un daha yüksek üretimine bağlı olarak lipid peroksidasyonuna duyarlılığı artırır⁴⁶. Sperm plazma zarı kriyoprezervasyondan etkilenen ana yapılardan biri olduğu için, sperm kriyoprezervasyonu ve çözülme artmış ROS üretimi ve azalmış antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Spermatozoa, farklılaşma aşamasında sitoplazmasının çoğunu atar böylece ROS ve LPO'nun zarar verici etkisine karşı koyan antioksidanlar içeren önemli sitoplazmik bileşenden yoksun hale gelir. Bundan dolayı, spermatozoa, kriyoprezervasyon ve çözülme sırasında LPO'ya karşı hassastır. İnsanlarda ROS seviyesinin, apoptotik spermilerin derecesi ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir⁹².

Spermatogenez saniyede yaklaşık olarak 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyal oksijen tüketimine neden olur⁷⁵. Testiste vaskülarizasyonun zayıf olması nedeniyle burada oksijen miktarı düşüktür. Bu düşük oksijen seviyesi testiste serbest radikal hasarından kendini koruyabilmesini sağlayan mekanizma parçalarından biridir. Fakat her ne kadar testiste oksijen miktarı düşük olsa da, fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle, testis oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Oksidatif stresin sonucu olarak testiste hem spermatogenez hem de Leydig hücre steroidogenezi hasar görebilmektedir^{75,120}. Testis bu korunmayı sağlamak için; çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir. Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir. Bunların sonucunda; erkek germ hücre hattında DNA hasarı, spermatozoada DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, oksidatif stres indüklenmesi, lipid peroksidasyonunun indüklenmesi, ROS temizleyicilerinin kaybı ve testiküler süperoksit dismutaz (SOD) ile katalazın (KAT) baskılanması görülmektedir¹²¹. Oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, ilk kez 1943 yılında İskoç androlog John MacLeod'un aerobik şartlarda enkübe edilen insan spermazoonların hareketliliğinin KAT eklenmesi ile arttığını göstermesi ile

başlamıştır¹²². Diyabet, vücut ve reproduktif organ ağırlıklarının azalmasıyla, testis ve epididimdeki sperm sayısında azalmaya neden olur¹²³. Oksidatif stres kaynaklı rahatsızlığı olan hastalarda endojen kaynaklı antioksidanlar yeterince etkili olmadığı için, oksidatif hasarı azaltabilecek diyet sadece dışardan alınacak antioksidanlarla mümkün olmaktadır (vitamin E, C, melatonin) ve spermin kalitesi yapılan antioksidan tedaviyle artmaktadır. Bununla lipid peroksidasyon potansiyelinin azaltılması fertilizasyon oranının artmasıyla paralellik göstermektedir¹²⁴.

2.5.8. Deneysel diyabet modelleri

Günümüzde çeşitli kompleks hastalıklara tanı konulması, rahatsızlığın meydana getirdiği fizyolojik ve patolojik değişikliklerin aydınlatılması, hastalıklardan korunma yolları ve potansiyel tedavi mekanizmalarının geliştirilebilmesi amacıyla deneysel hayvan modellerinin kullanımı oldukça yaygındır¹²⁵. Geçmiş yıllarda kimyasal ajanların kullanılmasıyla oluşturulan deneysel diyabet modellerinde Alloksan, Streptozotosin, çinko şelatörleri (8- hidroksikinolin, dithizone), diyet nitrozaminleri gibi diyabetojenik etkisi bulunan toksinler kullanılmıştır⁷⁷. Günümüzde ise yaygın olarak kullanılan toksinler STZ ve Alloksandır¹²⁶. Bu kimyasallar pankreatik β hücrelerine karşı spesifik toksisite göstererek β hücrelerinde deformasyona neden olmaktadır. Diyabetin her bir tipine farklı hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu deneysel diyabetik hayvan modelleri sayesinde elektrofizyolojik, biyokimyasal, anatomik ve histolojik değişimler in vivo ya da in vitro olarak rahatlıkla araştırılabilmektedir¹²⁷. Tip 2 diyabetik hayvan modelleri, genetik olarak mutasyonlarla ya da genetik mühendisliği teknikleri ile geliştirilebileceği gibi kimyasal olarak da oluşturulabilmektedir. Sıklıkla kullanılan yöntem streptozotosin (STZ) enjeksiyonudur. İnsanlardaki tip 2 diyabetin tüm fizyolojik ve patolojik özelliklerini yansıtan deneysel tip 2 diyabet oluşturma yöntemi 2 günlük neonatal sıçanlara tek seferlik 90 mg/ kg dozunda intravenöz (i.v.) STZ enjeksiyonudur¹²⁷. 6 - 15 haftalık sıçanlarda glukoz kullanım oranında bozulma ve β hücresi fonksiyonlarında ciddi azalma görülür. Ayrıca Tip 2 diyabet modeli pankreasın bir kısmının cerrahi olarak çıkarılmasıyla da oluşturulabilir¹²⁸. Genetik mühendisliği yöntemleriyle elde edilmiş olan Tip 1 diyabet hayvan modelleri genetik modifiye NOD fareleri ve BB sıçanlarıdır. Bu hayvan modellerinde diyabet kendiliğinden gelişir ve yaşamlarını sürdürebilmek için dışarıdan insülin alınmasına ihtiyaç duyarlar. Tip 1 diyabetin viral yolla da oluşturulabilmesi, insanlarda çevresel faktörler kaynaklı diyabet oluşumunun daha iyi anlaşılmasına imkan tanımıştır¹²⁸. Tip 1 diyabet modeli oluşturulması, kimyasal

yolla en çok kullanılan yöntemdir. Deneysel yolla diyabet oluşturmak amacıyla kullanılan kimyasallar 3 esas kategoride toplanabilir;

- 1- Spesifik olarak β hücre hasarı oluşturanlar,
- 2- İnsülin üretiminin ve salgılanmasının geçici olarak inhibe edilmesine sebep olanlar,
- 3- Hedef organlardaki insülinin etkinliğini azaltanlar.

İlk kategorideki kimyasallar sıklıkla tercih edilmektedir. Çünkü bu ajanlarla uzun süreli çalışmalarda kullanılmak üzere göreceli olarak kalıcı diyabet oluşturulabilmektedir. Deney hayvanlarında kalıcı diyabet oluşturabildiği ilk rapor edilen bu kategorideki ajan sıklıkla üre molekülü benzeri Alloksan'dır¹²⁹. Aynı mekanizma ile diyabet oluşturan Streptozotocin (STZ) zamanla bazı özelliklerinden dolayı alloksan'ın yerini almıştır.

Bu özellikleri;

- 1- β hücrelerine karşı daha seçici olması¹³⁰,
- 2- STZ verilerek diyabet oluşturulan hayvanlardaki mortalitenin daha düşük olması (Letal dozu uygulama dozunun 5 katından fazladır)¹³¹,
- 3- STZ'nin vücuttaki yarılanma ömrünün uzun olması (15 dakika)¹³².

2.5.9. Streptozotosin (STZ)

Laboratuvar hayvanlarında deneysel diyabet modeli, yaygın olarak pankreatik β hücrelerine karşı spesifik toksisite gösteren STZ ile oluşturulmaktadır. Kimyasal adı 2-Deoksi- 2- (3- Metil- 3- Nitrozoüredio) – D- Glikopiranoz olan Streptozotosin, streptomycetes achromogenes mantarı tarafından sentezlenen, neoplastik, antineoplastik ve diyabetojenik özellikleri olan esasında geniş spektrumlu bir antibiyotik türevidir. STZ, pankreas β hücrelerinde yarattığı hasar sonucu gelişen hipoinsülinemi, hiperglisemi ve insülin bağımlı tip 1 ve insülin bağımlı olmayan tip 2 diyabet modellerini oluşturmak için sıklıkla kullanılmaktadır^{132,133}.

STZ, sitotoksik etkisini yüksek reaktif özellikteki nitrozüre yan zinciri sayesinde gerçekleştirir¹³⁴. Yapısında bir glukoz molekülü içeren STZ, pankreas β hücrelerine glukoz taşıyıcı 2 (GLUT2) aracılığıyla alınarak burada birikir^{134,135}. Böylece glukoz taşıyıcıları ile etkileşmeyen hücreler STZ'ye karşı dirençli kalmış olurlar¹²⁵. STZ'nin ilk etkisi, Pankreatik β hücresi membran reseptörlerine bağlanarak glukozu verilen yanıtı ortadan kaldırmaktır^{134,136}. Bu olayı kalıcı β hücre hasarı ve kaybı izler. Sıçanlara STZ

verildikten yaklaşık 2 saat sonra kan glukoz düzeylerinde ani bir artış ve 6 saat sonrasında kandaki insülin düzeyindeki yükselmeye bağlı olarak hipoglisemi gözlemlendiği bilinmektedir. İnsülin düzeyindeki azalmayla gelişen hiperglisemiyle STZ'nin diyabetik etkileri kendini göstermeye başlar¹²⁶. STZ'nin asıl hedefinin β hücrelerinin DNA'sı olduğu düşünülmektedir. STZ'nin hücre içinde nitrozüre gruplarının dekompozisyonu sonucu meydana gelen reaktif karbonyum iyonları, DNA bazlarında alkilasyona sebep olmaktadır. Bunu DNA tamiri izler ve tamir sırasında görev alan poli (ADP- riboz) polimeraz (PARP) hücre içindeki nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) kullanarak NAD depolarını boşaltır ve ATP içeriğini azaltır. Böylece hücresel enerji depolarının tüketimi β hücrelerinde nekroza yol açar^{135,137}. STZ oksidan özellik gösteren bir kimyasal olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. STZ uygulandıktan sonra, ksantin oksidaz sisteminin aktive olduğu ve buna bağlı hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin üretildiği bildirilmektedir. STZ'nin glukoz oksidasyonunu, insülinin biyosentezini ve sekresyonunu azalttığı da bildirilmektedir¹²⁶.

STZ ile oluşturulan diyabet sonucu fertilité, proliferasyon yeteneği^{117,138}, libido¹¹⁷, testiküler sperm sayısı, hareketliliği ve testiküler ağırlık^{138,139} belirgin olarak azalır. STZ uygulanmasıyla testiste germ hücre sayısında azalma, Sertoli ve Leydig hücre vakoulizasyonu¹³⁸, Leydig hücrelerinin sayısında ve fonksiyonunda azalma gözlenir. Aynı zamanda STZ uygulanması sonucu, seminifer tübüllerdeki FSH, insülin, insülin benzeri büyüme faktörü- 1 (IGF- 1) reseptörlerinin duyarlılığı da etkilenmektedir. Serum LH, FSH ve testosteron düzeyleri belirgin olarak azalmaktadır. İnsüline bağlı diyabette; insüline duyarsız hale gelen hücrelerde insüline bağlı olarak gelişen FSH azalması sonucu Leydig hücrelerinin fonksiyonu ve testosteron üretiminde ve devamında LH düzeylerinde azalma gözlenir. Ayrıca, sperm atımı ve fertilité kapasitesi de FSH'a bağlı olarak azalır¹¹⁷. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır^{104,140-142}.

2.5.10. Nuklear faktör erythroid 2 (NFE2)- düzenleyici faktör 2 (Nrf2)

Hücrel redoks homeostazını düzenleyen, cap'n'collar (CNC) basic- region leucine zipper (bazik lösün fermuar bölgesi- bZIP) transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan Nrf2, 1994 yılında klonlama çalışmalarında, β -globin lokusu kontrol bölgesinin tandem NFE2 / AP1 tekrarına bağlanan ve bir transkripsiyonel aktivatörü kodlayan cDNA klonu olarak tanımlanmıştır¹⁴³. Nrf2, bir dizi detoksifikasyon ve antioksidan enzim genlerini indükleyerek vücudun, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve elektrofiller gibi çeşitli çevresel streslere karşı korunmasında kritik rol oynar¹⁴⁴. Nrf2 proteini, farklı dokularda farklı seviyelerde olmasına rağmen, tüm insan ve fare dokularının bütün bölgelerinden eksprese edilebilir. Nrf2, küçük muskuloponörotik fibrosarkom (Maf) proteinleri ile heterodimer oluşturarak DNA'ya bağlanır¹⁴⁵. Memeli hücrelerinde üç sMaf proteini vardır MafF, MafG, MafK ve bu üç faktör yüksek düzeyde yapısal benzerlik gösterir¹⁴⁴. Maf ve Nrf2, faz II antioksidan enzimlerinin transkripsiyonunu başlatmak için Antioxidant Respond Element (Antioksidan Tepki Elemanı- ARE) - DNA dizilerini tanıyabilmektedir. ARE, glutatyon S-transferaz (GST π), katalaz (Cat), glutatyon-peroksidaz (GPxs), hemeoksijenaz1 (HO- 1), peroksiredoksinler (Prdx) ve NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 (NQO- 1) gibi çeşitli genleri düzenlemektedir¹⁴⁶. Nrf2'nin sitoprotektif mekanizmalar, ara metabolizma ve mitokondri fonksiyonu ile ilgili olanlarda dahil olmak üzere 200'den fazla geni düzenlediği bilinmektedir.

Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1), proteazomlar yoluyla Nrf2 down regülasyonunu uyaran bir Cullin3- bağımlı E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir substrat adaptör bileşenidir. Keap1, Nrf2'yi stres koşulları altında bağlar ve ubiquitin proteazom yoluyla hızlıca Nrf2'nin aşağı regülasyonunu teşvik eder. Ancak hücreler oksidatif ve elektrofilik strese maruz bırakıldıktan sonra, reaktif sistein kalıntıları modifiye edilir. Bu işlemler Nrf2'nin degradasyonunu önler ve Keap1'i baskılayarak Nrf2'nin transkripsiyonel aktivitesini artırır¹⁴⁷.

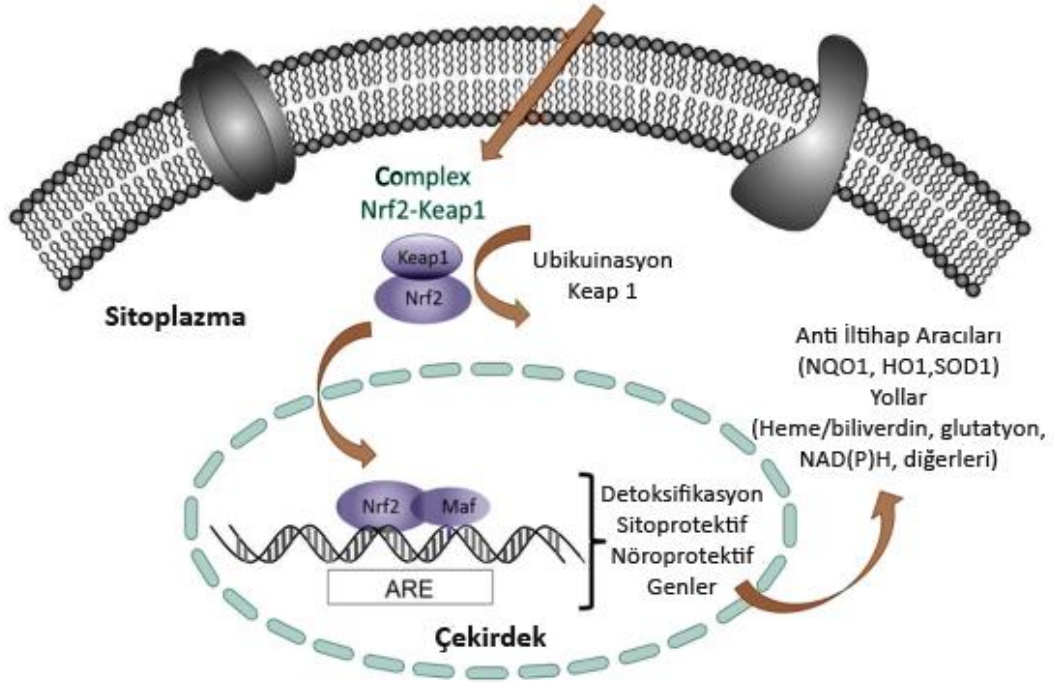
Nrf2 aktivasyonu karmaşıktır ve antioksidan savunma mekanizması olarak, sitoprotektif gen ekspresyonuna aracılık etmek için birkaç aşama gerektirir¹⁴⁸. Antioksidanlar, Nrf2'nin güçlü aktivatörleri olarak fonksiyon görürler. Metabolizasyon sonrasında, antioksidanlar Nrf2 aktivasyonunu tetikleyen az miktarda oksidatif stres oluştururlar. Nrf2, çok sayıda detoks ve antioksidan genlerinin ekspresyonunu düzenler ve antioksidan cevaba ek olarak, immun ve inflamatuvar yanıtlar, karsinogenezis ve

metastaz, bilişsel işlev bozukluğu ve bağımlılık davranışı gibi farklı süreçleri de kontrol eden genleri düzenlemektedir¹⁴⁹. Nrf2'nin protein yapısı, yedi domain içermektedir. Bunlar Nrf2-ECH homoloji (Neh) domainleri 1- 7'den oluşur. Neh2 domaini Keap1 ile etkileşir ve ortaya çıkan Keap1 - Nrf2 kompleksi, Nrf2'nin transkripsiyonel aktivasyonuna aracılık eden oksidatif stres için hücrel bir sensördür¹⁵⁰.

Nrf2, hücrelerdeki ana oksidatif stres cevabını oluşturmaktadır. Bazal koşullar altında, Nrf2 Keap1 homodimerine bağlanır ve sitozolde bağdaştırıcı protein olan Culin 3 (Cul3)-bağımlı E3 ubiquitin ligaz tarafından ubiquitine edilir ve ardından parçalanır. Stres koşullarında Keap1 protein dimeri Nrf2'yi çekirdeğe serbest bırakarak hücrel oksidatif stresi algılar. Nükleusta, Nrf2, Maf ve Jun proteinleriyle bir kompleks oluşturur ve birçok antioksidan geninde bulunduğu upstream promoter bölgesi ARE dizilerine bağlanır ve Nrf2 transkripsiyonu başlatır¹⁵¹.

Hücrel redoks homeostazının tekrar sağlanmasının ardından, Keap1 nükleusa transloke olarak Nrf2'yi ARE'den ayırır ve Nrf2'nin degradasyonuna neden olur. Sonuç olarak Nrf2, oksidatif stresin sitotoksik etkilerine karşı primer hücrel savunma sistemi gibi davranır. Nrf2-Keap1 sistemi, kanser, karaciğer toksisitesi ve inflamasyon gibi çeşitli hastalıklara karşı korunmaya katkıda bulunmaktadır¹⁵².

Hem oksijenaz-1 (HO-1), hücrel hem içindeki serbest demirin, karbon monoksitin (CO) ve biliverdin'in sınırlı oranda oksidatif degradasyonunu katalize eden bir enzimdir ve hemen sonrasında biliverdin hızla bilirübine dönüştürülür. Katabolik son ürünler ve prooksidan hem'in uzaklaştırılmasıyla, HO- 1 antioksidan, antiapoptotik ve immün modüle edici etkiler göstererek memeli hücrelerinde genel sitoprotektif ve yararlı fonksiyonlar ortaya koyar. Sonuç olarak, HO- 1 çeşitli oksidatif stresle ilişkili koşullarda bir hayatta kalma molekülü olarak düşünülür. Oksidatif stres koşullarında, Nrf2, HO- 1'in transkripsiyonunu aktive eder¹⁵³.



Şekil 8 Keap1 – Nrf2 sistemi ile pankreatik β hücresi koruması. Stres aracılı Keap1 modifikasyonları Nrf2'yi stabilize ederek Nrf2'nin çekirdekte birikmesine ve sMaf proteinleri ile heterodimerize olmasına izin verir. Nrf2-sMaf heterodimeri cis etkili ARE / EpRE motiflerine bağlanır ve hedef gen ekspresyonunu indükler. Nrf2, antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu artırır ve pankreas β hücrelerinde ROS seviyelerini azaltır. Nrf2 ayrıca iNOS ve COX-2 dahil olmak üzere iltihapla ilişkili gen ekspresyonunu baskılar. Nrf2, proteazom ve otofaji dahil olmak üzere proteolitik sistemlerin bakımına katkıda bulunur. Sonuç olarak, Keap1-Nrf2 sistemi pankreatik β -hücrelerini çeşitli streslere karşı korur.¹⁵⁰

2.5.11. Nrf2 ve oksidatif stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) üretimi ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlik durumudur. ROS, çeşitli fizyolojik fonksiyonları yerine getirme, konakçı savunması, hücre sinyalizasyonu, gen ekspresyonu düzenlenmesi ve hücre farklılaşmasında önemli rol oynar. ROS seviyeleri merkezi sinir sisteminde (MSS) sıkı bir şekilde düzenlenir⁸⁶. ROS'un zararlı etkilerine karşı koymak ve MSS'de hassas redoks dengesini sağlamak için, hücreler birkaç antioksidan enzim içeren endojen antioksidan savunma mekanizmaları ile donatılmıştır. Birçok antioksidan enzimin üretimi transkripsiyonel düzeyde transkripsiyon eritroid 2 ile bağlantılı faktör 2 (Nrf2) ile düzenlenir. Hastalıkların deneysel modellerinden elde edilen verilerin sonuçlarına göre, Nrf2 yolağının aktivasyonu, ROS aracılı hasarı azaltarak sistemik ve redoks dengesini düzeltmek için umut verici bir yaklaşımdır. Bununla birlikte, klinik ortamda sadece birkaç Nrf2 aktive edici bileşik test edilmiştir. Fizyolojik redoks dengesini korumak için hücreler, bir dizi endojen antioksidan enzim ile donatılmıştır. Bu sitoprotektif proteinlerin transkripsiyonu, hücrel redoks

durumunun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan Nrf2 ile kontrol edilir¹⁵⁴. Homeostatik koşullar altında Nrf2 transkripsiyonu, Nrf2'nin negatif düzenleyicisi olan Keap1 tarafından baskılanır¹⁵⁵. Nrf2, ROS'a maruz kaldıktan sonra, sitozolik Keap1'den ayrılır ve çekirdeğe transloke olur. Daha sonra, peroksiredoksinler (en önemlisi Prdx6), hem oksijenaz- 1 (HO- 1)¹⁵⁶ gibi antioksidan koruma ve detoksifikasyona katılan yüzlerce genin promotör bölgesindeki ARE'ye bağlanır. Sonuç olarak, serbest radikalleri uzaklaştıran bu enzimler, güçlü bir antioksidan savunma mekanizması oluşturur¹⁵⁰.

2.5.12. Nrf2 ve diyabet

Nrf2, "antioksidan yanıtın ana düzenleyicisi" olarak kabul edilir, çünkü faz II metabolik ve antioksidan enzimler dahil olmak üzere çeşitli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde ve dolayısıyla diyabet dahil oksidatif stres kaynaklı hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynar⁸. Kalıcı salgılayıcı aktiviteleri ve endojen antioksidan potansiyelinin bulunmamasından dolayı, pankreas β hücreleri, serbest radikallerin, yanlış katlanmış proteinlerin, endoplazmik retikulum hiperaktivitesinin ve hasarlı mitokondrinin neden olduğu çeşitli stres tiplerine kronik olarak maruz kalır¹⁵⁷. Bu birikmiş stres, β - hücre apoptozuna neden olur ve nihayetinde pankreasın bir bütün olarak işlev bozukluğuna yol açar. Nrf2'nin aktivasyonu, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, akut ve kronik akciğer hasarı, otoimmün hastalıklar, inflamasyon ve çeşitli patolojik koşullara karşı koruma sağlamaya dahil edilmiştir¹⁵⁸. Nrf2'nin doğal bileşikler tarafından aktivasyonu, diyabetin patojenezinde rol oynayan hiperglisemi ile indüklenmiş oksidatif stresin ve bununla ilişkili komplikasyonların önlenmesinde umut veren bir yaklaşımdır. Nrf2 indüksiyonunun pankreatik β hücrelerinde reaktif tür (RS) hasarını önlediğini ve Keap1-Nrf2 sisteminin pankreatik β hücrelerinin fizyolojik ve patolojik korunumu için önemli bir savunma yolu olduğu gösterilmiştir¹⁵⁹. Ayrıca Nrf2; karaciğer, iskelet kası ve pankreatik β - hücreleri gibi çoklu dokular da dahil olmak üzere, diabetes mellitusun başlamasını önlemektedir¹⁶⁰.

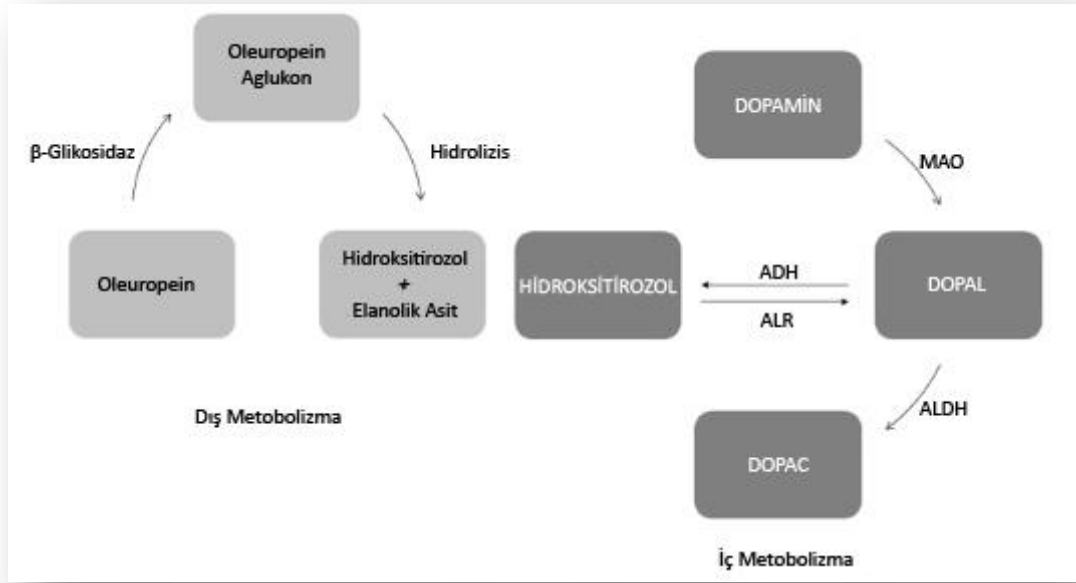
2.6. Hidroksitirozol (HT)

Günümüzde birçok sağlığa faydalı özellik Akdeniz diyetine bağlanmıştır¹⁶¹. Yıllar

boyunca, araştırmacılar hangi gıdaların ya da hangi gıda bileşenlerinin sağlıklı olduğunu öğrenmeye çalıştılar¹⁶¹. Akdeniz diyeti, gelişmiş insan sağlığı ile olan ilişkisi nedeniyle geniş ölçüde çalışılmıştır. Bu diyet, yüksek miktarda tahıl, sebze, meyve, zeytinyağı, fındık ve baklagil alımına, düşük miktarda et ve et ürününe, ılımlı miktarda balık ve deniz ürününe ve orta derecede alkollü içeceklere dayanmaktadır¹⁶². Zeytinlerden elde edilen fenolik bileşiklerin sağlığa yararlı olduğunun en büyük kanıtı, Yunanistan ve Güney İtalya'da tipik bir "Akdeniz diyeti" tüketen popülasyonların diğer popülasyonlara göre daha düşük kardiyovasküler mortalite göstermesidir. Akdeniz diyetinin modernleştirilmiş tanımı bölgeye özgüdür, ancak tanımlanmış besin piramidinin ortasında zeytinyağı bulunur ve zeytinyağı diyet lipidlerinin birincil kaynağı olarak teşvik edilir¹⁶³. Zeytinyağının en önemli bileşenlerinden biri de fenolik bileşik olan Hidroksitirosol'dür (HT), toplam fenolik fraksiyonların % 70 ila % 80'ini oluşturur^{19,164}.

Hidroksitirosol, zeytinlerin başlıca fenolik küçük molekülü bileřenidir¹⁶³. HT, 154.16 g/mol moleküler ağırlığa ve feniletal alkol yapısına sahip olan bir amfipatik fenoldür. Ayrıca Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Sistemi Birliği (IUPAC) tarafından 3,4- dihydroxyphenylethanol (DOPET) ya da 3,4- dihydroxyphenolethanol (3,4-DHPEA) ya da 4- (2- Hydroxyethyl) -1, 2- benzenediol olarak adlandırılır. Bu bileşik, zeytin ağacı yapraklarında çok yüksek bir konsantrasyonda ve zeytinyağında bulunan ana bileşiklerden biridir ve birçok biyolojik aktiviteye sahip bir antioksidan olarak tanımlanmıştır^{165,166}.

HT, aynı zamanda başka bir zeytin bileşeni olan oleuropeinin hidrolizinden kaynaklanır¹⁶⁷. Hidroliz olayı, zeytinlerin olgunlaşması, tüketime yönelik hazırlanması, zeytinyağlarının depolanması sırasında ve gastrointestinal kanal koşullarında meydana gelir^{163,168}. Zeytinler yağları çıkarılmak için işlendiğinde, üç farklı polifenolle zenginleştirilmiş tabaka elde edilir: zeytin değirmeni atık su, pirina ve zeytinyağı. HT amfipatik karakteri nedeniyle, bu üç fazda serbest formda, asetat formunda veya oleacein, verbascoside ve oleuropein gibi karmaşık bileşiklerin bir parçası olarak bulunabilir¹⁶⁹.



Şekil 9 Hidroksitirozolün iç ve dış metabolizması arasındaki karşılaştırma. ALR: aldehit redüktaz; ADH: alkol dehidrojenaz; MAO: monoamin oksidaz; ALDH: aldehit dehidrojenaz; DOPAL: 3-4-dihidroksifenilasetaldehit; DOPAC: 3-4 dihidroksifenilasetik asit ¹⁶¹

Oleuropein, güçlü bir damar açıcı olan ve bununla birlikte antibakteriyal etkiye sahip, nitrik asit oluşumunu destekleyen ve suda çözünen bir fenoldür. Zeytinyağı ve sofralık zeytin üretimi aşamalarında, oleuropein miktarı azalırken, hidroksitirozol miktarı artar. Bu yüzden taze zeytinde ve zeytinyağında HT miktarı azdır. Oleuropein bileşeni, aglikon oluşturmak için glikozunu kaybeder, daha sonra hidroksitirozol ve elenolik aside dönüşür¹⁶³.

Öte yandan zeytinyağındaki HT içeriği, zeytin ağacı ve zeytin türüne, ekim yerinin konumuna, yağ kalitesine ve zeytinyağı hazırlama sürecine bağlıdır¹⁷⁰. Son on yılda yapılan araştırmalar, HT'nin farklı tipteki şaraplarda da bulunduğunu ancak beyaz şaraba göre kırmızı şarapta daha yüksek konsantrasyonda olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, şaraptaki konsantrasyonlar genellikle sızma zeytinyağı veya zeytin yapraklarından elde edilen HT özütlerinden daha düşük düzeydedir^{171,172}. Zeytinyağında yaklaşık 1.9 mg / kg'lık bir konsantrasyonda bulunan hidroksitirozol (HT) en çok

araştırılan fenolik bileşiklerden biridir¹⁶⁸. Saf hidroksitirozol, berrak, renksiz ve sıvıdır¹⁶³.

Hidroksitirozol tüketiminin yararları literatürde belirtilmiştir¹⁶³. HT yüksek antioksidan aktivitesine sahip olup çoklu farmakolojik aktiviteleri nedeniyle artan bir ilgi görmektedir^{168,173}. Bu özelliği ile farklı alanlardaki hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynar. Kardiyoprotektif, antitümoral, antimikrobiyal, antiviral, antialerjik, antiparaziter, antidiyabetik ve nöroprotektif aktiviteler HT'ye atfedilmiştir^{163,168}. Ek olarak Hidroksitirozol, antiinflamatuvar özelliklere sahiptir ve mitokondriyal fonksiyonu destekler. Aynı zamanda apoptozisi modüle etme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Potansiyel olarak antioksidan aktivitesi gerçekleştirebilen hidroksitirozol, anti kanserojen bir bileşik olarak da önerilmiştir¹⁶³.

HT'nin in vitro serbest radikalleri etkin bir şekilde temizlediği ve oksidatif stresin neden olduğu hasara karşı sitoproteksiyon gösterdiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır¹⁷³. Hidroksitirozol antioksidan rolünü serbest radikalleri doğrudan yakalayarak ya da antioksidan enzimlerle birleştirilmiş bir dizi tepkime yoluyla onları parçalayarak ortaya koyar¹⁷⁴. Son çalışmalar HT'nin, karaciğerde lipitlerin, kolesterolün ve trigliseritlerin sentezini inhibe ettiğine dair kanıtlar sağlamıştır. Ortaya çıkan faydalar arasında, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidatif hasarından koruması kabiliyeti de yer almaktadır¹⁶³. Bunun için Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA) 2011 yılında zeytinyağı polifenollerinin sağlığa yararlı etkileri olduğu ile ilgili bir sağlık bülteni yayınladı. Bu yararlı etkilerin ortaya çıkması için HT'nin günlük diyetle minimum gereksinimini 5 mg olarak belirledi¹⁶⁸. Bu doz, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu azaltarak, yüksek yoğunluklu lipoproteinleri artırarak, normal kan basıncını koruyarak ve pro-enflamatuar süreçlerden kaçınarak sağlık açısından faydalı özellikler üretmek için yeterlidir¹⁷⁴.

Fenolik bileşikler bağırsakta doza bağlı bir şekilde emilir ve önemli bir bağırsak / hepatik metabolizmaya maruz kalır^{175,176}. Tüm polifenoller, portal kan akışına girmeden önce enterositlerdeki metabolizma faz I'den ve glukuronid, metillenmiş ve sülfat yan ürünlerine dönüştürüldükleri metabolizma faz II'den geçer^{177,178}. Daha sonra portal dolaşım ile karaciğere ulaştıktan sonra ilave faz II metabolizmasına tabi tutulur¹⁶⁸. HT zeytinyağı formunda uygulandığında % 98'i plazma ve idrarda glukuronid konjugatları

veya sülfat formda, % 2'si ise serbest formda bulunur^{175,176}. Fenolik biyoyararlanımını, yaş, hormonal durum veya cinsiyet gibi farklı faktörler etkilemektedir¹⁷⁹. Bununla birlikte, cinsiyet HT türevlerinin nihai biyoyararlanımı için kritik bir özelliktir ve HT dişi sıçanların vücudunda daha uzun süre kalmaktadır¹⁸⁰. Ek olarak, HT metabolizmasının cinsiyete bağlı olduğu, kadınlarda dönüşümün ve kullanımın daha etkili olduğu bulunmuştur¹⁸¹. Yapılan diğer çalışmalar, etanol ve dopaminerjik yollar arasındaki etkileşime bağlı olarak, HT, kırmızı şarap olarak uygulandığında en yüksek idrar seviyelerine ulaştığını göstermiştir. HT bir dopamin metabolitidir¹⁸². HT'ye maruziyet sadece HT veya öncüllerini içeren doğal ürünlerin dışarıdan alınmasıyla meydana gelmez aynı zamanda insanlarda dopamin oksidatif metabolizmasından türetilen endojen bir metabolit olması ile de sağlanır^{175,183}.

Bu bileşik hızlı bir emilim işlemine sahiptir ve alımdan yaklaşık 7 dakika sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır¹⁸⁴. Zeytinyağından elde edilen görünür emilimin, alınan dozun % 55 - 65'i arasında olduğu tahmin edilmektedir. Radyoaktif işaretli Hidroksitirozol ile yapılan çalışmalar, bir zeytinyağı çözeltisinden Hidroksitirozolün oral biyoyararlanımının % 99 olduğu ve sulu çözelti şeklinde uygulandığında ise bu yararın % 75 olduğunu ortaya çıkarmıştır¹⁶³. Bazı yazarlar, HT'nin en yüksek plazma konsantrasyonuna 0.5 ila 1.0 saat arasında ulaşıldığını ve oral uygulamadan 4 saat sonra pratik olarak saptanamadığını öne sürmüşlerdir¹⁸⁵. HT bir kez absorbe edildiğinde, hızla bir antioksidan olarak görev yapan plazmatik yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin bir parçası haline gelir¹⁸⁶. HT, güçlü ve hızlı metabolizması nedeniyle, 1- 2 dakikalık bir plazma yarı ömrü sunar¹⁸⁷. HT ve metabolitleri, kas, testis, karaciğer ve beyin (HT, kan beyin bariyerini geçebilir) gibi dokularda çok iyi bir dağılım kabiliyetine sahiptir. Bunun yanında böbrek ve karaciğerde birikim gösterir. Bu yaygın dağılım, HT'nin sağlığa faydalı özelliklerinden sorumludur¹⁸¹. HT'nin yapısı, yoğun metabolizması ve dönüşümleri göz önüne alındığında, konjuge katabolitler, esas olarak böbrekler tarafından atılır¹⁸⁸. HT veya metabolitlerinin vücuttan tamamen atılması için gereken süre, insanlarda ~ 6, sıçanlarda ~ 4 saattir^{177,189}. HT antioksidan özellikleri sayesinde nefro koruyucu bir rol oynayabildiği yer olan böbreklerde atılana kadar birikir¹⁹⁰. Toplam HT'nin yaklaşık % 5'i enjeksiyondan 5 saatlik bir süre sonra dışkı ile atılır¹⁶¹.

Önemli faaliyetlerden biri de HT'nin ROS süpürücü rolü olmasıdır. HT ve metabolitleri, serbest radikal moleküllerin yanı sıra hem hücre içi hem de hücre dışı ROS üretimini

yok etmek için yüksek bir kapasiteye sahiptir¹⁹¹. Öte yandan, HT, SOD, glutatyon peroksidaz (GPx) veya glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerini artırarak ve ayrıca hücrelerde daha yüksek seviyelerde düşük glutatyon (GSH) seviyesini koruyarak antioksidan sistem üzerinde doğrudan bir etki üretebilir^{187,192}. Ek olarak, HT, peroksitlerin hücre ortamından çıkarılmasını destekleyerek katalaz (CAT) aktivitesini artırır¹⁶⁸. HT antioksidan rolünü ya oksidatif stres sırasında üretilen reaktif oksijen türlerini doğrudan temizleyerek ya da oksidatif strese karşı organizma savunmasını artıracak farklı hücresel sinyal yollarını aktive ederek ortaya koyar^{193,194}.

Her ne kadar diyet fenolik bileşikler in vitro olarak iyi antioksidanlar olsalar da, in vivo olarak, bu tür etkilere dolaylı olarak bazı antitoksik aktiviteleri ile değil, Nrf2 / Keap1 gibi bazı yolların aktivasyonu yoluyla aracılık edilebilir^{195,196}.

Reaktif oksijen türleri (ROS) normal hücresel metabolizma sırasında sürekli olarak üretilir ve hücre farklılaşması, çoğalması ve ölümü ile ilgili çeşitli sinyal yollarında mesajcı moleküller olarak işlev görür⁸⁰. Bununla birlikte, çevresel stres veya hücre hasar üzerine, hücreler ROS'u kolayca detoksifiye edemez ve böylece oksidatif strese maruz kalabilir. Eksojen antioksidanlar ve hücre endojen antioksidan sistemi, ROS aracılı oksidatif strese karşı koymak için çok önemlidir. İçsel antioksidan savunmasını indüklemek için iyi aydınlatılmış bir evrensel yol, antioksidan duyarlı elemanın (ARE) aktivasyonu yoluyla transkripsiyonel düzenlemeyi içerir^{197,198}. Bazal koşullar altında, sitosolik düzenleyici protein, Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1), Nrf2'ye sıkıca bağlanır ve bunu sitoplazmada tutar ve proteazom bozulmasını hedefler¹⁹⁹. Keap1'in Nrf2 ile birleşmesi kritik olarak Keap1 proteinindeki fonksiyonel sistein kalıntılarına dayanır. Adaptör proteini Keap1'deki bu sistein kalıntılarını değiştirebilecek maddeler, Nrf2'nin inhibitör partner Keap1'den salınmasına neden olur ve bunun çekirdek içine translokasyonunu kolaylaştıracak ve böylece sitoprotektif genlerin transkripsiyonunu başlatacaktır¹⁷³.

Aynı zamanda, HT sperm hareketliliğini ve canlılığını etkiler. HT'nin spermatozoa kültürlerine uygulanması, sperm canlılığını artırır ve hem sperm DNA oksidasyonunu hem de ROS seviyelerini azaltır, ancak HT'nin in vivo kullanımının sperm canlılığı veya dölleme teknikleri açısından herhangi bir faydalı etkiye sahip olup olmadığı hala belirsizdir⁷.



Şekil 10 Hidroksitirozol'ün olası etkileri.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2018/ 5/ 2 sayılı karar ile onay alınarak (Bkz: Ek- 1) Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütüldü. Ayrıca Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından Proje no: 2019.04.01.906 proje numarası ile desteklendi.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden (DÜHAM) temin edildi. Hayvanlar çalışma başlayıncaya kadar ve çalışma süresince DÜHAM'da, standart koşullarda, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne uygun $25\pm 3^{\circ}$ C oda ısısında, % 60 ± 3 nemli bir ortamda özel olarak hazırlanmış kafeslerde (4'lü ve 5'li gruplar halinde) her gün altları temizlenerek barındırıldı. Yemler; ad libitum besin olarak çelik kaplarda, su; paslanmaz çelik bilyeli cam biberonlarda günlük normal çeşme suyu şeklinde verildi. Çalışmaya 28 adet 3- 5 aylık ve 270 ± 30 gr ağırlığında sağlıklı erkek Wistar Albino sıçan ile başlandı ancak 1 sıçanın sebebi belirlenemeyen ölümü nedeniyle 27 örnek ile tamamlandı. Deney hayvanlarına yapılmış olan tüm deneysel ve cerrahi işlemler Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun belirlemiş olduğu kurallara uyularak yapıldı.

3.2. Deney Grupları

Deneysel çalışmalar, toplam 28 adet sıçan üzerinde gerçekleştirildi. İlk tartımları yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Denekler rastgele seçilerek; Grup 1: Kontrol grubu (n=5), Grup 2: Diyabetik kontrol grubu (STZ) (n=9), Grup 3: HT kontrol grubu (HT) (n=5), Grup 4: Tedavi grubu (STZ+HT) (n=9) olmak üzere 4 ayrı gruba ayrıldı.

Deneye başlamadan önce sıçanlardan alınan kan örneği ile kan glukoz düzeylerine bakılarak normal değerlere sahip denekler çalışmaya alındı.

Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla Streptozotosin (STZ) (Sigma Aldrich, CAS no: 18883- 66- 4) kullanıldı. Grup 2 ve 4'ü oluşturan sıçanlara steril distile su içerisinde eritilen STZ tek doz 55 mg / kg intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. STZ enjeksiyonu bittikten 48 saat sonra, kuyruk ucundan lansetle elde edilen kan örneği ile kan glukoz düzeyleri ölçülerek diyabet olup olmadıkları tespit edildi. Kan glukoz

değerleri 250 mg / dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Grup 4'ü oluşturan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildikten sonra Hidroksitirozol (HT) 30 gün süreyle, günde birer kez 10 mg/kg intraperitoneal (i.p) enjeksiyon yoluyla verildi. 30 günün sonunda, tüm gruplardaki sıçanlar tartılıp açlık şekerleri ölçüldükten sonra, ketamin (90 mg / kg) + xylazine (10 mg / kg) intraperitoneal uygulama ile anestezi altına alınarak kalbin sağ ventrikülünden biyokimyasal analizler için kan alındı ve sonrasında hayvanlar sakrifiye edilerek çalışma sonlandırıldı. Ardından sıçanların testis dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan testis ve epididimisler hassas terazi ile tartılarak sonuçlar not edildi. Daha sonrasında histolojik çalışma yapabilmek için 24 saat süreyle bouin solüsyonunda tespit edildi. Sperm parametrelerinin analizi için epididimis kaudasından tiftikleme yoluyla alınan örnekler SF'e (serum fizyolojik) konuldu.



Şekil 11 Deney hayvanlarının sakrifiye edilmesi ve sonrasındaki doku takipinden kesitler. Mavi ok:

Tablo 1 Diyabetik rat modeli, deney grupları, maddeler ve veriliş yolları

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

3.3. Diyabet Oluşturma Modeli

Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla Streptozotosin (STZ) (Sigma Aldrich, CAS no: 18883- 66- 4) kullanıldı. Diyabet oluşturulurken, STZ enjeksiyonundan 12 saat önce sıçanlar hiperglisemiye karşı aç bırakıldılar. Enjeksiyon öncesi sıçanlar tartılıp, açlık kan glukoz değerleri kuyruk ucundan lansetle elde edilen kandan ACCU- CHECK Performa Nano cihazı kullanılarak ölçüldü. Ayrıca sıçanların vücut ağırlığına göre STZ çözelti miktarı hesaplandı. STZ çözeltisi; 9 ml steril distile su (dH₂O) içinde çözülerek hazırlandı. Tek doz 55 mg / kg STZ intraperitoneal olarak uygulandı. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların kuyruk ucundan alınan kandan kan glukoz değerleri ölçülerek diyabet tayini yapıldı. Kan glukoz değeri 250 mg / dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik kabul edildi.

3.4. Hidrositirozolün Hazırlanması

Koruyucu rolünü öğrenmek amacıyla kullanılan Hidroksitirozol (HT) (CAYMAN, Cas no:70604) alındı. 1 gram stok Hidroksitirozol 5 ml steril distile suda çözüldü. Günlük 45 mg (225 µl), stok HT'den falkon tüpe alındı ve üzerine 8775 µl steril distile su eklendi. Deney süresi boyunca hergün saat 10: 00 ile 12: 00 arasında deneklere enjeksiyon yapıldı.

3.5. Bouin Fiksatifinin Hazırlanışı

Bouin Solüsyonu testis dokularının tespiti için kullanılır. Molekül ağırlığı kadar tartılan pikrik asit (12.2 g), 1 L distile su içinde iyice çözdürüldü. Dipte tortu kalmamasına dikkat edilerek gerekli miktarda pikrik asit kullanıldı. Bouin solüsyonu hazırlamak için önce 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi, 25 ml % 37'lik formaldehitte karıştırıldı. Daha sonra bu karışımın üzerine yavaşça 1 ml glasiyal asetik asit eklenerek tekrar karıştırıldı.

3.6. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)

2.85 gram di sodyum hidrojen Fosfat, 16 gram sodyum klorür ve 0.8 gram potasyum dihidrofosfat 2 litre distile su (dH₂O) içinde çözülür. pH 7.2 ile 7.4 arasında ayarlanır.

3.7. Sitrat Tamponu

2.10 gram sitrik asit 900 ml distile su (dH₂O) da çözünür. NaOH ile pH 6'ya ayarlanır.

3.8. İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulaması

Sıçan uygun bir şekilde tutulduktan sonra, abdomen bölgesinin sağ veya sol alt kadrana insülin enjektörü ile 45 derecelik bir açıyla deriye girildi. Deri altında bir miktar ilerledikten sonra hafifçe itilerek, karın kaslarına geçildi. Bu işlem sırasında visseral organlara ve bezlere zarar verilmemesine dikkat edildi. Hayati bir organda bulunmadığının doğrulanması için enjektör ucu hafifçe yukarı kaldırıldı ve madde enjekte edildi.

3.9. Işık Mikroskopik İncelemeleri

1. Dokular bouin solüsyonunda yaklaşık 24 saat tespit amaçlı fikse edildi.

Dehidratasyon amacıyla alkol serileri kullanıldı.

2. % 70'lik alkolde 15 dakika bekletildi.

3. % 80'lik alkolde 15 dakika bekletildi.

4. % 90'lik alkolde 30 dakika bekletildi.

5. % 90'lik alkolde 30 dakika bekletildi.

6. % 96'lik alkolde 30 dakika bekletildi.

7. % 96'lik alkolde 30 dakika bekletildi.

8. % 96'lik alkolde 45 dakika bekletildi.

9. Asetonda 45 dakika bekletildi.

Şeffaflaştırma amacıyla ksilol serileri kullanıldı.

10. Ksilol- 1'de 10 dakika bekletildi.

11. Ksilol- 2'de 20 dakika bekletildi.

Gömmeye hazırlık amacıyla parafin serileri kullanıldı.

12. Parafin- 1'de 75°C sıcaklıktaki etüvde 10 dakika bekletildi.

13. Parafin- 2'de 75°C sıcaklıktaki etüvde 20 dakika bekletildi

14. Parafin- 3'de 75°C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika bekletildi

15. Takip edilen dokular base moldda parafine gömülerek etiketleme yapıldı.

Hazırlanan bloklardan Leica RM2245 marka mikrotom cihazı ile 4- 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlere genel dokuyu değerlendirmek için Hematoksilen-Eozin (HE) ve Gomori Trikrom ve PAS boyaması; oksidatif stresi (OS) göstermek amacıyla Nrf2 antikor ile immünohistokimyasal boyamalar yapıldı.

3.9.1. Hematoksilen-Eozin boyaması

1. Parafin kesitler 75° C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika bekletildi.

2. Ksilol- 1'de 15 dakika bekletildi.

3. Ksilol- 2'de 15 dakika bekletildi.

4. % 96'lık etil alkole 10 defa daldırıldı.

5. % 80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

6. % 70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

7. Akan suda yıkandı.

8. Hematoksilende 2 dakika bekletildi.

9. Akan suda yıkandı.
10. Asit alkole 2 defa daldırıldı.
11. Akan suda yıkandı.
12. Amonyaklı suya 2 defa daldırıldı.
13. Akan suda yıkandı.
14. % 70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
15. Eozine 10 defa daldırıldı.
16. Akan suda yıkandı.
17. % 70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
18. % 80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı
19. % 96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı
20. 1- 2 dakika 75° C sıcaklıktaki etüvde bekletildi.
21. Ksilolde 10 dakika bekletildi.
22. Oda sıcaklığında kuruyan lamalar entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.9.2. Gomori Trikrom boyaması

1. Parafin kesitler 75° C sıcaklıktaki etüvde 45 dakika bekletildi.
2. 30 dakika ksilolde deparafinize edildi.
3. % 96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
4. % 80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
5. % 70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
6. Akan suda yıkandı.
7. Bouin solüsyonunda 75° C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika bekletildi.
8. 3 ayrı kaptaki bol su ile yıkandı.
9. Trikrom solüsyonunda 45 dakika bekletildi.
10. % 0.5'lik asetik asitle diferansiye edildi.

11. Akan suda yıkandı.
12. % 70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
13. % 80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
14. % 96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
15. 1- 2 dakika 75° C sıcaklıktaki etüvde bekletilerek kurutuldu.
16. Ksilolde 10 dakika bekletildi.
17. Oda sıcaklığında kuruyan lamalar entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.9.3. PAS boyama

1. Parafin kesitler 75° C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika bekletildi.
2. İki ayrı ksilen kabında 15'er dakika olmak üzere toplam 30 dakika ksilende bekletildi.
3. Kesitler hidrate edildi.
 - a. % 96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
 - b. % 80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
 - c. % 70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
4. Bol suyla yıkandı.
5. Distile suyla yıkandı.
6. % 0.5 periyodik asitte 5 dakika bekletildi.
7. Distile suyla yıkandı.
8. Schiff bazında 10 dakika bekletildi.
9. Akan suyun altında 5 dakika yıkandı.(Kesitlerin rengi pembeye döndü.)
10. Hematoksilende 2 dakika bekletildi.
11. Bol suyla yıkandı.
12. Kesitler dehidrate edildi.
 - a. % 70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

b. % 80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

c. % 96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

13. 1- 2 dakika etüvde bekletildi.

14. Ksilende 10 dakika bekletildi.

15. Üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.9.4. Semen analizi (Spermiyogram)

Semen analizi için, petri kutusu içerisindeki 1 ml'lik SF (serum fizyolojik) de kauda epididimden bistüri ve makas yardımıyla yapılan tiftikleme yöntemi ile açığa çıkarılan spermeler seyreltilerek (10 µl), Makler sperm sayma kamerası (Makler counting chamber



sefi
-
me
dica
l
inst
rum
ents
)

kullanılarak ışık mikroskopunda 20x

büyütmede sayıldı. Semen analizinde sayı, hareketlilik ve morfoloji parametreleri incelendi.

A

B

Şekil 12 Semen Analizi aşamaları A: Testis ve epididim görüntüsü, B: Tiftikleme şekli

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kriterlerine göre;

- a- İleri Hızlı hareketli
- b- İleri Yavaş hareketli
- c- Yerinde hareketli
- d- Hareketsiz olarak sınıflandı.

Sayma işleminden sonra geriye kalan örnekler ile yayma preparatları hazırlandı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen- Eozin Boyaması ile boyandı. Daha sonra ışık mikroskopunda 100x büyütmede incelendi.

3.10. İmmunohistokimyasal İncelemeler

3.10.1. Nrf2 İmmün İşaretleme

1. Tüm gruplar için hazırlanan bloklardan immüno lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı.
2. Bir gece önceden kesitler 56° C'lik etüvde bekletildi.
3. Ertesi sabah deparafinizasyon için iki ayrı ksilolde 10'ar dakika bekletildi.
4. Daha sonra herbirinde 5 dakika olmak kaydıyla % 96, % 90, % 80, % 70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.
5. Kesitler distile suda 7 dakika çalkalandı.
6. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 0.01 M sitrat tamponuna (pH: 6.0) konularak mikrodalga fırında 4 ve 3'er dakika 750 Watt'ta kaynatıldıktan sonra 20 dakika boyunca oda ısısında soğumaya bırakıldı.
7. Fosfat tamponlu tuz tamponunda (PBS; pH: 7.2- 7.4) 2 x 5 dakika yıkandı.
8. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler % 3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildi.
9. 3 x 5 dakika PBS ile yıkandı.
10. Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle (Pap-pen) çizildi.

11. Kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu ile 7 dakika muamele edildi.
12. Serumun fazlası alınarak kesitler, Nrf2 primer antikorları eklendi.
13. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine uygun izotip kontrol uygulandı.
14. Nrf2'li kesitler nem odasında +4 C'de gece boyu inkübe edildi.
15. Ertesi gün kesitler PBS ile üç defa beşer dakika yıkandı.
16. Daha sonra sırasıyla, 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor ve 20 dakika AP-konjuge streptavidin kompleksi ile oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı.
17. Sinyalleri geliştirmek için dokular 5 dakika Di Amino Benzidin (DAB) kromojeni ile muamele edildi ve disitle suda yıkandı.
18. Kesitlere Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
19. Akan suda yıkanan kesitler her birinde 10 dip olmak kaydıyla % 70, % 80, % 90'lık alkol serilerinden geçirildi.
20. % 96'lık alkolde 4 dakika tutularak dehidrate edildi.
21. Ksilolde 10 dakika bekletildi.
22. Oda sıcaklığında kuruyan lamlar entellan kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

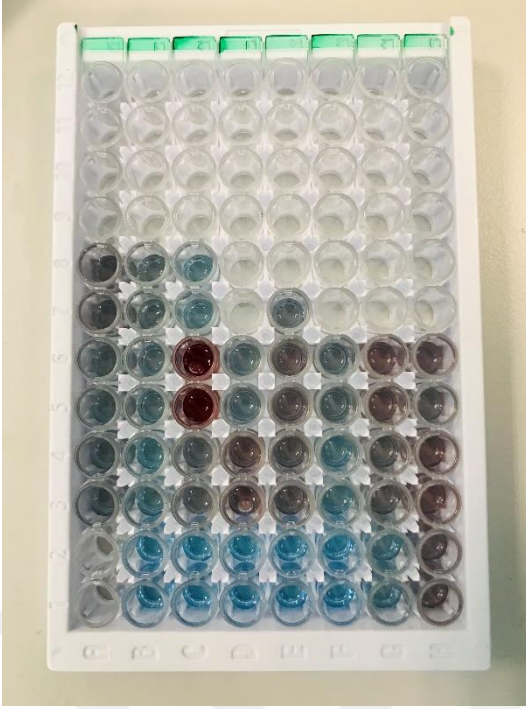
3.11. Biyokimyasal İncelemeler

3.11.1. Testosteron seviyesinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi

Deneyin sonunda, hayvanlar ketamin + xylazine anestezisine maruz bırakıldı ve biyokimyasal analizler için kan örnekleri doğrudan sıçanların kalplerinden toplandı. Toplanan kan örnekleri 15 dk boyunca 8100 rpm'de santrifüj edildi. Alınan serumlar analiz gününe kadar -20 derecede ependorflarla saklandı. Testosteron seviyesini ölçmek için ayrı bir serum kullanıldı. Serum testosteron düzeyi, özel sıçan kitleri (Elabscience Cat No:E-EL-R0033) kullanılarak enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) yöntemi ile belirlendi. Kitin protokolü takip edilerek işlem yapıldı. Analiz prosedürü: 96 kuyucuklu plakaların A1 ve A2 kuyucukları blank olarak atandı. B1-F1 ve B2-F2 kuyucuklarına 50 µl standart-Biotin + 50 µl streptavidin-HRP yüklendi. Diğer

kuyucuklara oda ısısına getirdiğimiz her gruba ait örneklerden 40 µl + 10 µl T-antibody + 50 µl streptavidin-HRP yüklendi. Kuyucukların üzeri Elisa membranı ile kapatılarak plakalar 60 dakika 37° C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyulardaki sıvılar plakanın ters çevrilmesi suretiyle boşaltıldı. Kuyuların tamamen boşaltılması amacıyla plakalar hafifçe kurutma kağıdı üzerine vurularak örnekler uzaklaştırıldı. Sonrasında 275 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Yıkamalar sonunda kuyuların tamamen boşaltılması amacıyla hafifçe kurutma kağıdı üzerine vurularak kurulandı. Yıkama işleminden sonra kuyulara 50 µl kromojen reagent A + 50 µl kromojen reagent B eklendi, karıştırıldı ve karanlıkta 10 dk inkübasyona bırakıldı. Kuyulara 50 µl stop solüsyonu eklenerek spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutuldu. Tüm işlemler her kuyuya eşit solüsyon veren mikropipetör kullanılarak yapıldı.





Şekil 13 ELİSA plakalarında meydana gelen renk değişimi.



3.12. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen bulguların istatistiksel analizi GraphPad Prism 8 programıyla gerçekleştirildi. Deney grupları için hesaplanan ortalamalar arasındaki farklılık, tek yönlü varyans analizinin (One-Way ANOVA) karşılaştırmalarına tabi tutuldu, farklılığın hangi gruplar arasında olduğu Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanarak tespit edildi. Hesaplanan p değeri 0.05'ten küçük olan ($p < 0.05$) gruplar arasındaki farklılık, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler ortalama±standart sapma (SD) olarak ifade edildi.



4. BULGULAR

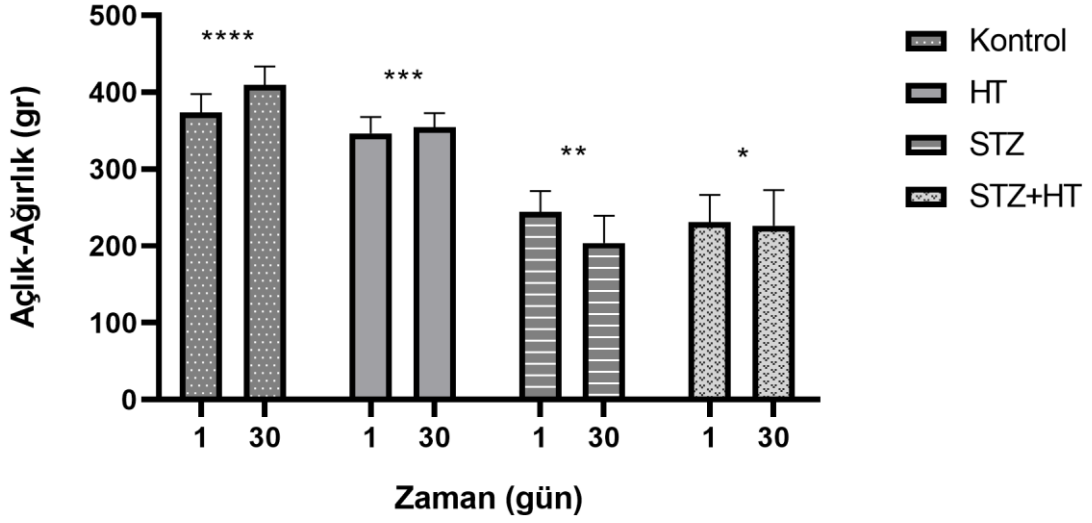
4.1. Vücut Ağırlıkları ve Su Tüketimi Parametresi

Deneyin 1, 3, 7, 14, 21, 28 ve 30.günlerinde tartılan deneklerin vücut ağırlıkları Tablo 2’de gösterilmiştir. Deneyin başındaki ve sonundaki vücut ağırlıkları kıyaslandığında; kontrol grubundaki sıçanların vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir kilo artışı görüldü. HT grubundaki sıçanların deney sonuna değin kilo aldığı ancak bu kilo alınımın anlamlı olamadığı tespit edildi. Diyabet grubunda yer alan tüm deneklerde, kontrol grubuna göre vücut ağırlığında istatistiksel açıdan önemli bir azalma olduğu tespit edildi ($P<0.008$). Tedavi grubundaki deneklerin deney sonunda kilo aldıkları gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Deneyin 1. ile 30. günündeki kilo farkları Grafik 1’de gösterilmiştir.

Ayrıca deneysel diyabet oluşturulan ratlarda polidipsi ve buna bağlı poliüri gözlemlendi.

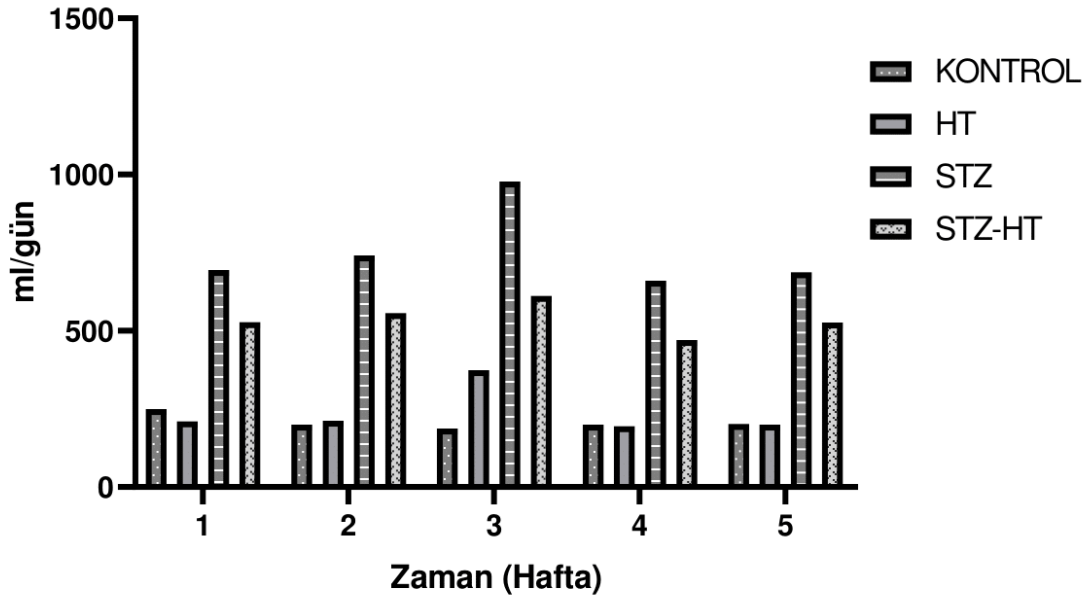
Tablo 2 Deneyin 1, 3, 7, 14, 21, 28 ve 30. günlerinde tartılan deneklerin vücut ağırlıkları

Ölçüm Periyodu (gr)	Kontrol Grubu (\pm SD)	HT Grubu (\pm SD)	STZ Grubu (\pm SD)	STZ-HT Grubu (\pm SD)
1. Gün (Açlık)	401.6 \pm 23.93	366.6 \pm 23.33	281.1 \pm 31.64	266.1 \pm 25.67
3. Gün	412.8 \pm 23.72	360.8 \pm 20.46	257.2 \pm 27.47	246.4 \pm 24.73
7. Gün	424.8 \pm 25.87	362.6 \pm 23.64	252.9 \pm 28.33	244.3 \pm 29.03
14. Gün	432.6 \pm 25.75	367.6 \pm 23.32	240.2 \pm 32.53	246.8 \pm 30.87
21. Gün	432.6 \pm 27.51	370.6 \pm 21.92	236.8 \pm 34.26	242.1 \pm 35.72
28. Gün	438 \pm 24.94	374.6 \pm 21.69	240.8 \pm 38.55	261.8 \pm 37.59
30. Gün (Açlık)	409.8 \pm 23.58	354.4 \pm 18.23	203.9 \pm 35.48	226.6 \pm 46.06



Grafik 1 Deneyin başındaki ve sonundaki vücut ağırlıkları * : istatistiksel olarak anlamlı olmayan kilo kaybı var. ** : istatistiksel olarak anlamlı derecede kilo kaybı var. *** : istatistiksel olarak anlamlı olmayan kilo alımı var. **** : istatistiksel olarak anlamlı derecede kilo alımı var.

Deney süresi boyunca tüketilen su miktarları ölçülerek not edildi. Su tüketimi, diyabetik sıçanlarda kontrol sıçanlarına göre anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.036$). Kontrol grubu ile HT grubu karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p < 0.8698$). Tedavi grubu ise ortalama bir değere sahip olup kontrol ($p < 0.0011$), HT ($p < 0.004$) ve STZ ($p < 0.0175$) grupları ile arasında anlamlı bir fark yoktur (Grafik 2).



Grafik 2 Deney süresi boyunca tüketilen su miktarları

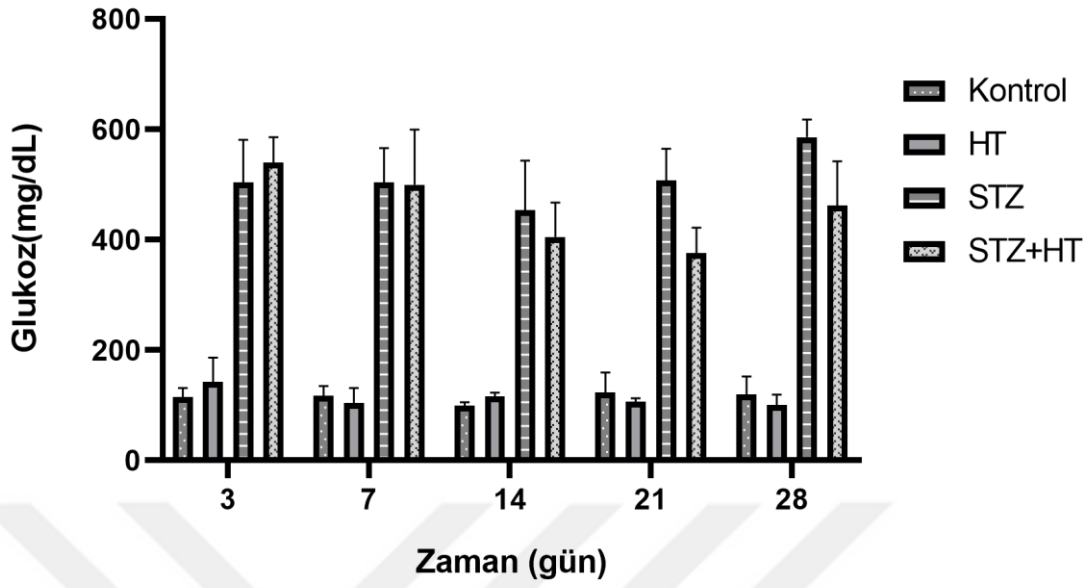
4.2. Kan Şekeri Düzeyi Sonuçları

Diyabet grubunda bulunan deneklerin STZ uygulamasından 48 saat sonra, diyabetik modeli doğrulamak için glukometre ile kan glukoz değerleri ölçüldü. Ölçüm sonucunda kan glukoz değerleri 250 mg / dL ve üstü olan denekler diyabet olarak kabul edildi ve deney sonunda da sakrifiye öncesi değerlere göre diyabetin devam ettiği, değerlerin 250 mg / dL ve üstünde olduğu saptandı. Tüm grupların deney süresince ölçülen kan glukoz düzeyleri Tablo 3’de gösterilmiştir.

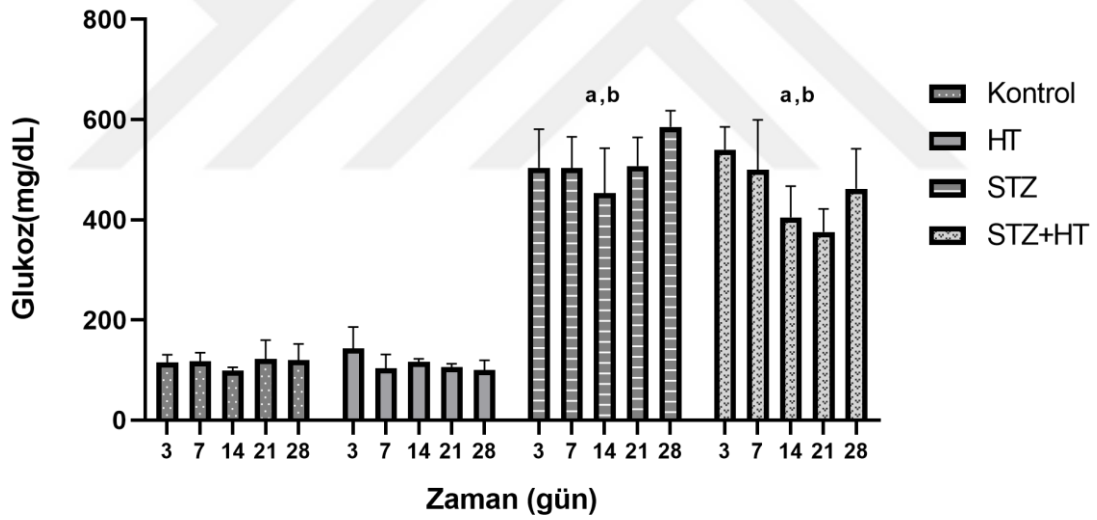
Tablo 3 Deney süresince ölçülen glukoz seviyeleri

Ölçüm Periyodu (mg/dL)	Kontrol Grubu (±SD)	HT Grubu (±SD)	STZ Grubu (±SD)	STZ-HT Grubu (±SD)
3. Gün	114.8±16.18	142.8±43.36	426.4±114.96	502.3±101.99
7. Gün	117.4±17.52	103.8±27.73	517.1±48.26	494.1±115.12
14. Gün	99.4±6.23	116±6.78	437.4±68.08	429.3±152.54
21. Gün	122.8±36.77	106±6.56	523.4±59.95	360.7±110.50
28. Gün	119.6±32.72	100.2±19.31	577.1±32.47	417.6±145.38
30. Gün (Açlık)	76.4±3.85	100.4±40.43	396.3±61.85	235.3±163.15

Sıçanların deney başındaki ile deney sonundaki kan şekeri düzeyleri karşılaştırıldığında tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p < 0.0486$). Kontrol ($p < 0.9525$) ve HT ($p < 0.2655$) gruplarına ait deneklerin kan-glukoz düzeyleri değerlendirildiğinde deney başlangıcından bitimine kadar istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olmadı. Deney gruplarının deney başlangıcındaki kan glukoz değerleri (STZ’den 2 gün sonra) kontrole göre anlamlı derecede yükseldi. Daha sonrasında deney bitimine dek anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p < 0.0070$). Deney sonundaki kan şekeri düzeyleri gruplar arası karşılaştırıldığında STZ grubunda, kontrol ve HT gruplarına göre belirgin artış gözlemlendi. Tedavi grubunda, diyabet ile artan kan şekeri düzeyi, uygulanan HT ile düşürüldü. Bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($P < 0.0486$). (Grafik 3 ve 4)



Grafik 3 Her bir grubun deney süresince kendi içinde karşılaştırılması



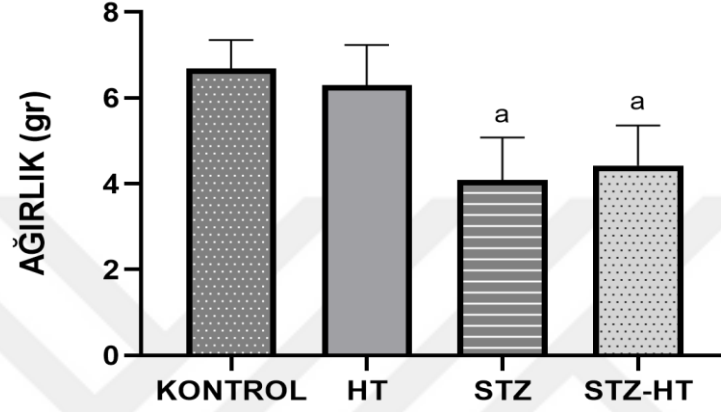
Grafik 4 Her bir grubun deney süresince kendi içinde karşılaştırılması

4.3. Üreme Organı Ağırlıkları

Tüm deney gruplarına ait sıçanların testis ağırlıklarının karşılaştırılması Tablo 4 ve Grafik 5'de gösterilmiştir. Deney sonunda deneklerin testis ağırlıkları ölçüldüğünde diyabet grubu deneklerde kontrole göre anlamlı derecede bir düşüş belirlendi ($p < 0.0474$).

Tablo 4 Deneş grupların testis ağırlıkları

Gruplar	Kontrol Grubu (±SD)	HT Grubu (±SD)	STZ Grubu (±SD)	STZ-HT Grubu (±SD)
Testis Ağırlık (gr)	6.68±0.66	6.30±0.94	4.09±0.99	4.62±0.82

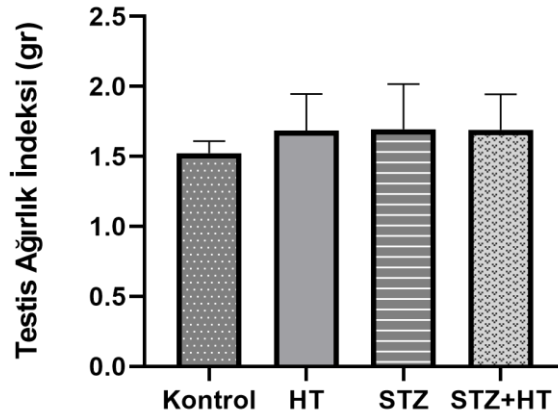


Grafik 5 Grupların testis ağırlıkları

4.4. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) Analizi

Deneşin son günü ölçülen vücut ağırlığı ile aynı sıçana ait sol ve sağ testis ağırlıkları toplamı aşağıda verilen formüle göre hesaplandı. Her bir sıçan için testis ağırlık indeksine ait bulgular Grafik 6 ve Tablo 5’te gösterilmiştir.

$$TAİ = \frac{\text{sol testis ağırlığı} + \text{sağ testis ağırlığı}}{\text{vücut ağırlığı}} \times 10$$



Grafik 6 Grupların TAİ değerleri

Tablo 5 Testis Ağırlık İndeksi

Gruplar	Kontrol Grubu (\pm SD)	HT Grubu (\pm SD)	STZ Grubu (\pm SD)	STZ-HT Grubu (\pm SD)
TAİ (%)	1.695 \pm 0.324	1.685 \pm 0.262	1.524 \pm 0.086	1.691 \pm 0.253

4.5. Spermatolojik Parametreler

Sakrifikasyondan hemen sonra, sperm sayıları yapılan grupların toplam sperm sayıları ve hareketli sperm sayıları Tablo 6 ve Tablo 7’de gösterilmiştir.

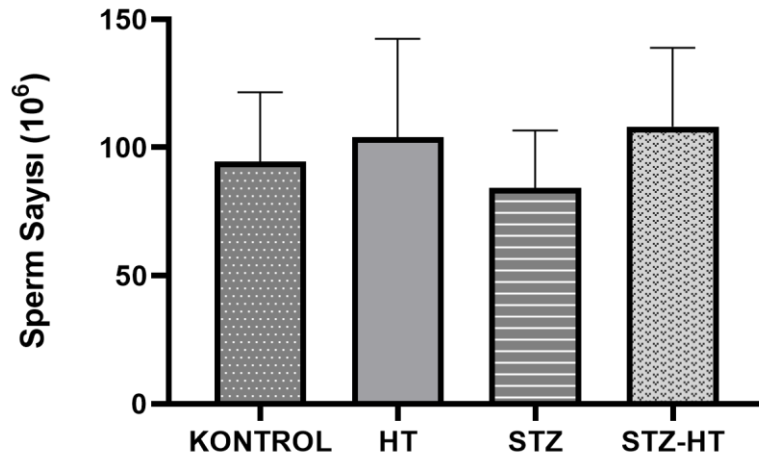
Spermilerin sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Grafik 7).

Tablo 6 Toplam Sperm sayıları

Gruplar	Kontrol Grubu (\pm SD)	HT Grubu (\pm SD)	STZ Grubu (\pm SD)	STZ-HT Grubu (\pm SD)
Toplam Sperm Sayısı (10^6)	94.60 \pm 26.94	104.00 \pm 38.47	108.13 \pm 30.81	108.13 \pm 30.81

Tablo 7 Hareketli Sperm Sayıları

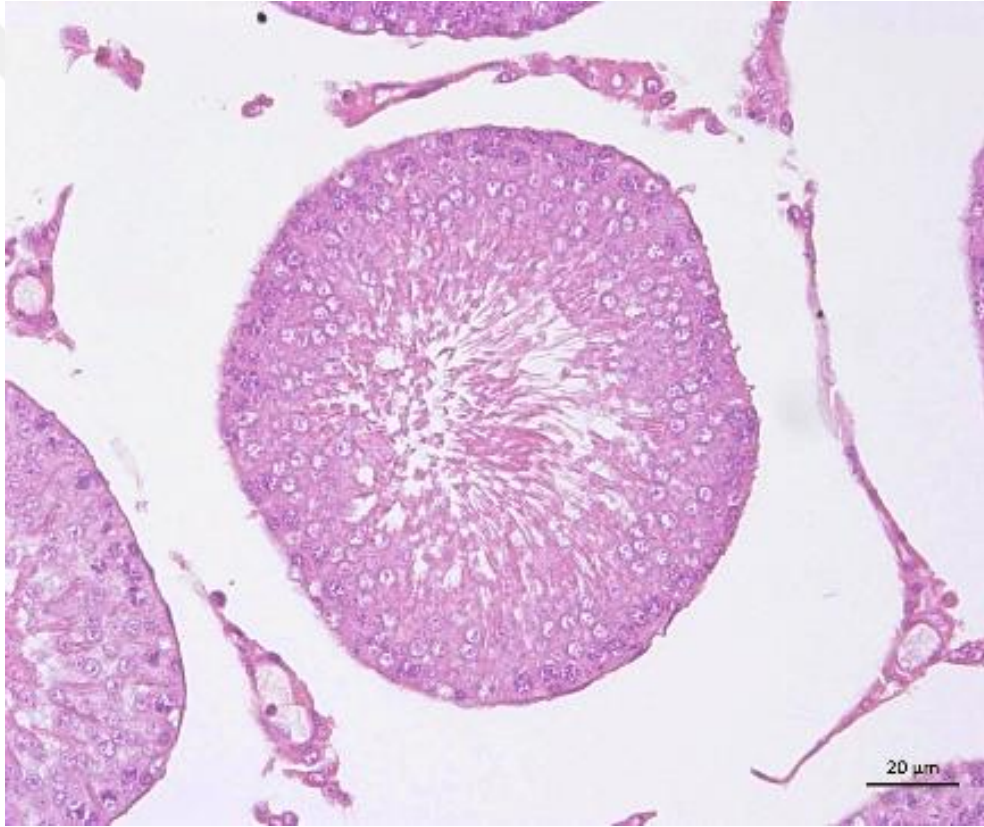
Gruplar	Kontrol Grubu (\pm SD)	HT Grubu (\pm SD)	STZ Grubu (\pm SD)	STZ-HT Grubu (\pm SD)
Harkeketli Sperm Sayısı (10^6)	9.80 \pm 8.11	7.00 \pm 7.58	1.00 \pm 0.0	5.20 \pm 3.83

**Grafik 7** Grupların sperm sayılarına ait grafik

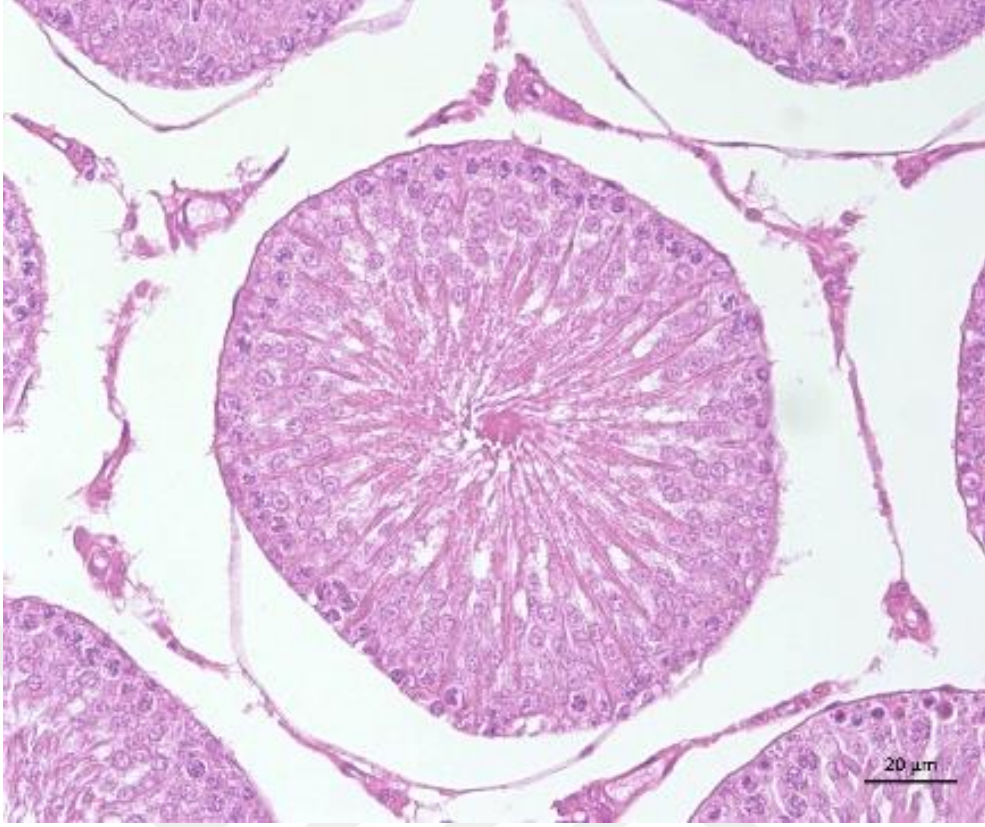
4.6. Morfolojik Bulgular

4.6.1. Histolojik bulgular

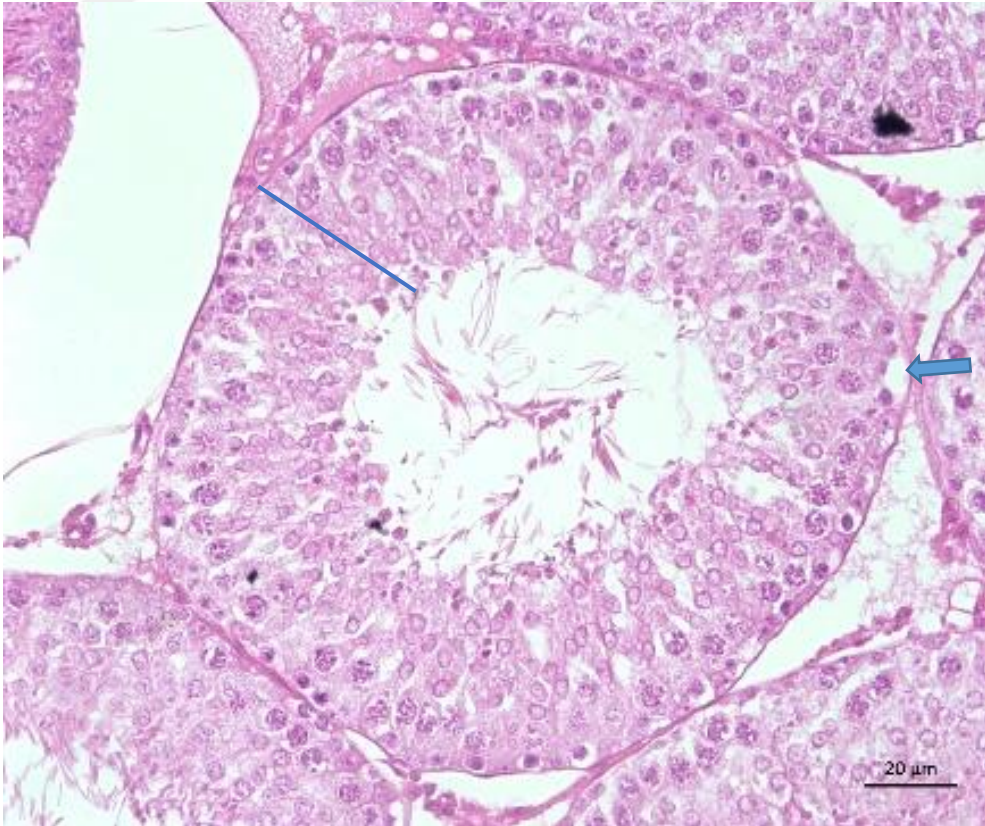
Kontrol ve HT gruplarına ait deneklerden alınan testis doku kesitleri rutin H&E, Gomori Trikrom ve PAS boyaları uygulandıktan sonra incelendiğinde, ışık mikroskopik bulguları normal bir testis doku organizasyonu sergiledi. Diyabetik grubun histopatolojik sonuçları ortaya koyduğumuz deneysel bulgular ile uyumluydu ve sıçanların testis dokularında, seminifer tübüller içerisinde vakuolizasyon, apoptotik hücreler, germinal epitel boyunda ve hacminde azalma, intertübüler alanda bağ dokusu artışı ile genel bir dejenerasyon gözlemlendi. HT ile muamele edilmiş diyabet grubundan alınan örnekler de ise normal seminifer tübüller ve genel yapısal bütünlük görüldü.



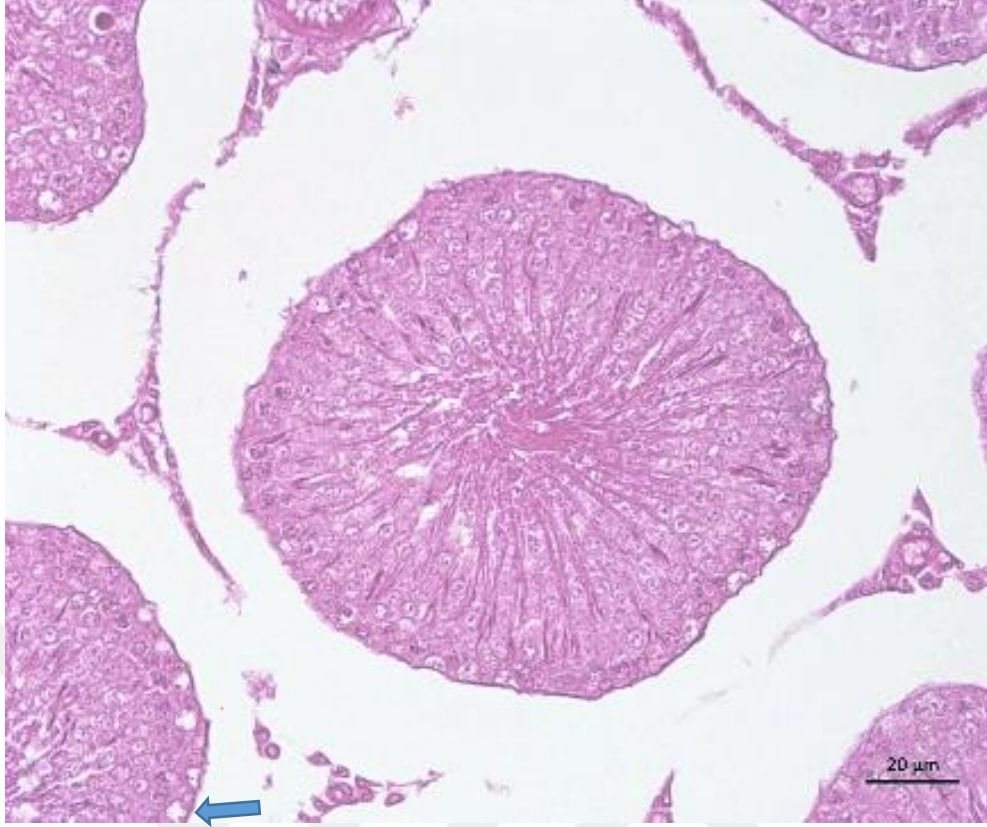
Şekil 14 Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, Hematoksilen-Eozin 40x



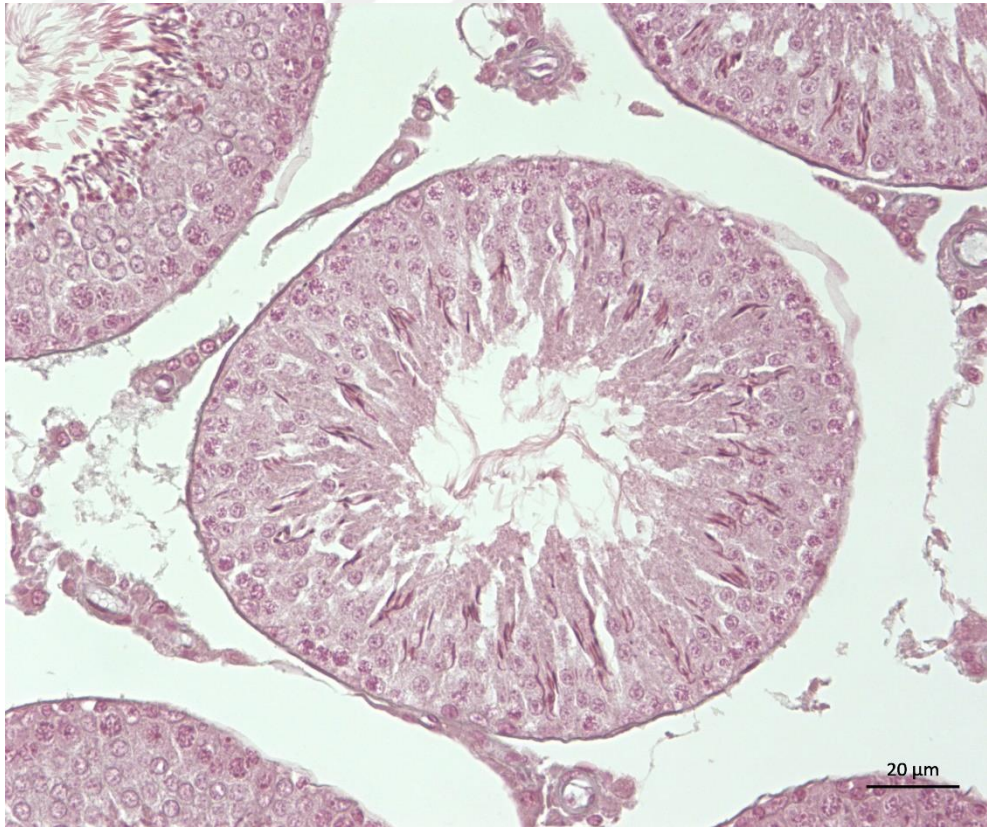
Şekil 15 HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, Hematoksilen-Eozin 40x



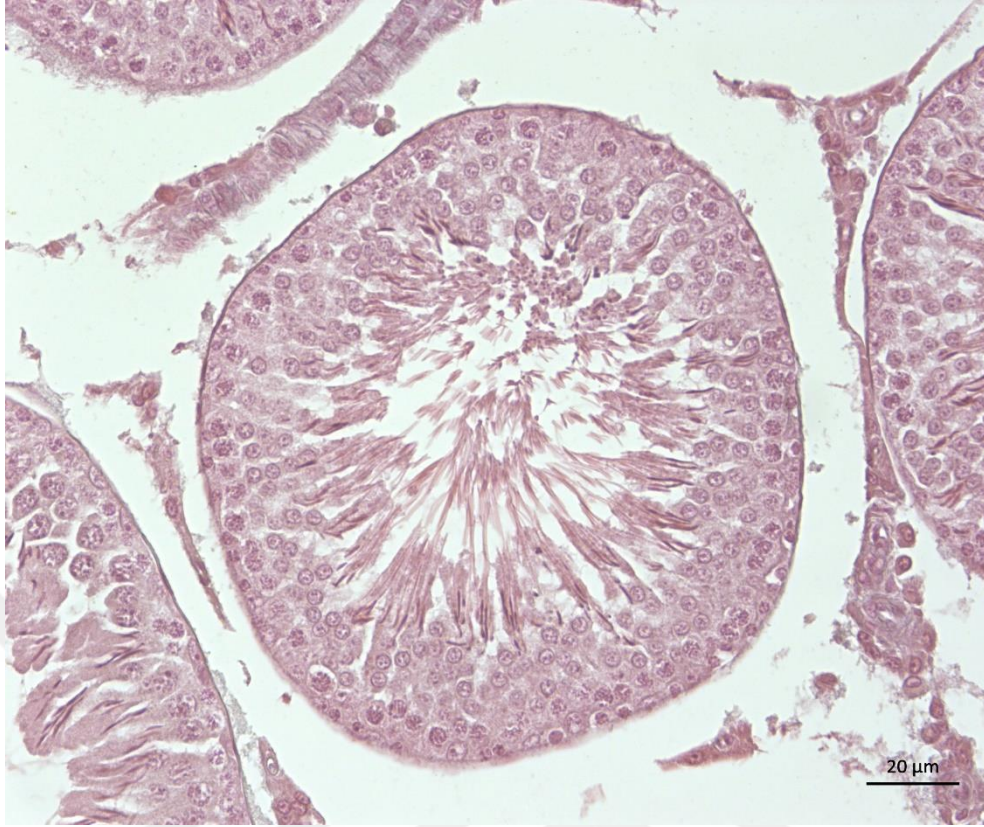
Şekil 16 STZ grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, Hematoksilen-Eozin 40x .Mavi ok: vakuolizasyon, mavi çizgi: incelmış germinatif epitel



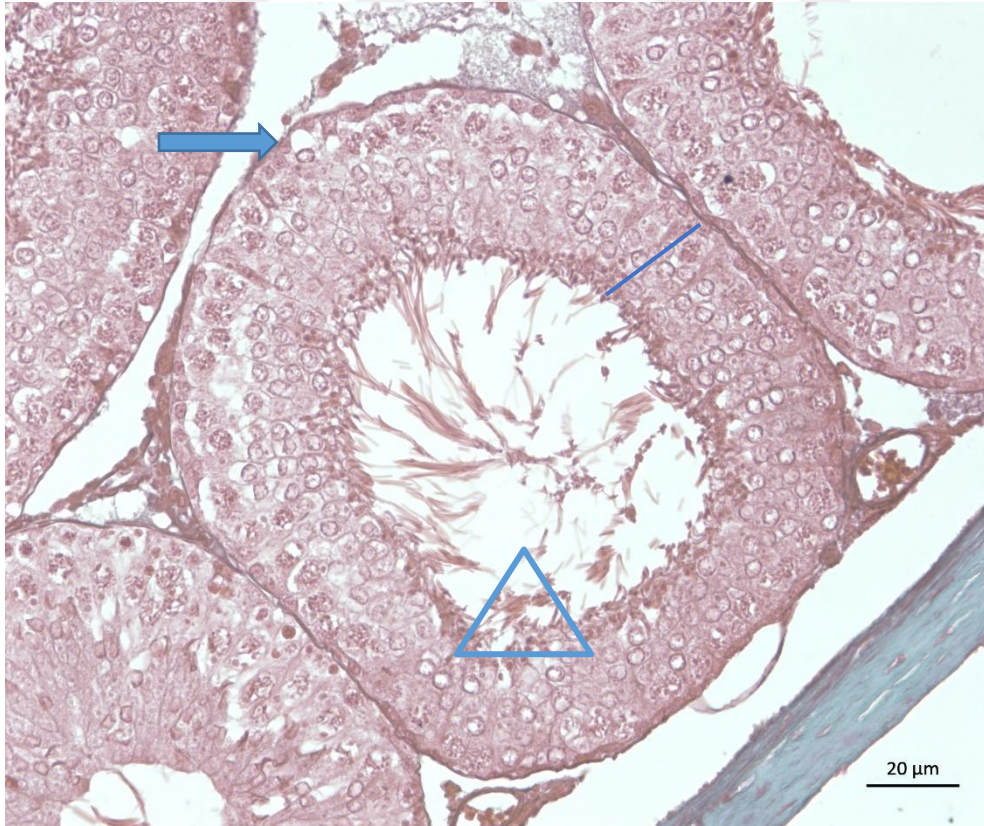
Şekil 17 STZ-HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, Hematoksilen-Eozin 40x Mavi ok: vakuolizasyon.



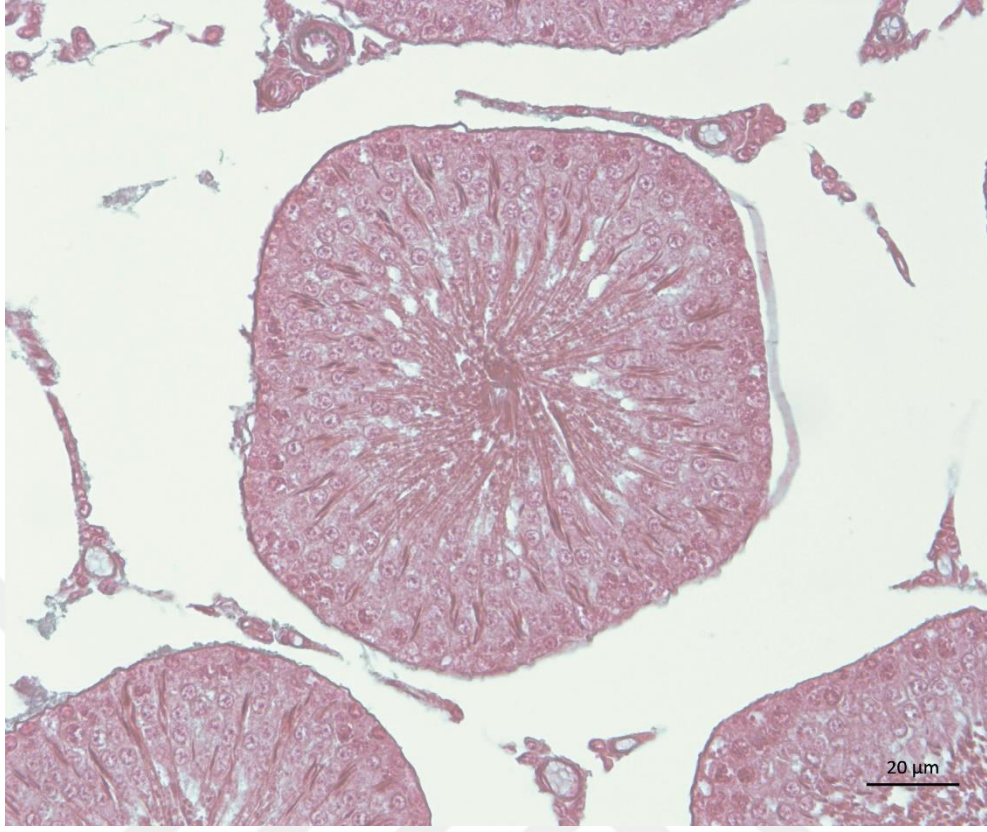
Şekil 18 Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, Gomori Trikróm 40x



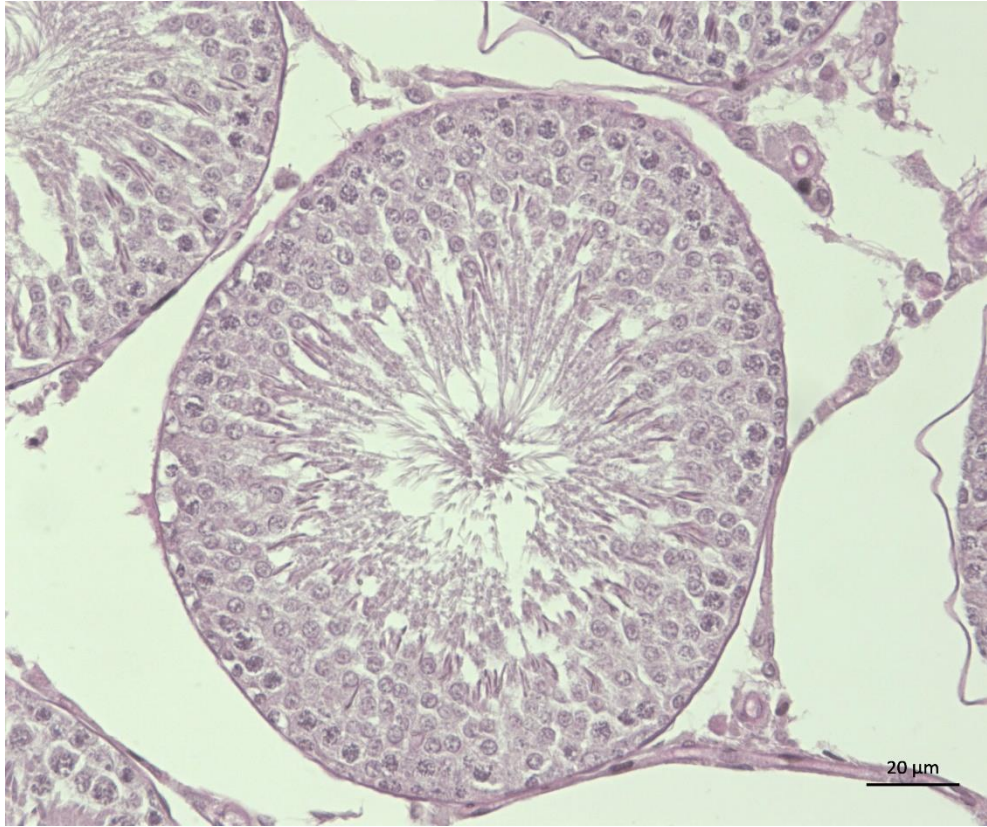
Şekil 19 HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, Gomori Trikróm 40x



Şekil 20 STZ grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, Gomori Trikróm 40x Mavi ok: vakuolizasyon, Mavi çizgi: incelmış germinatif epitel, Üçgen alan: seminifer tübül lümeninde hücre döküntüsü



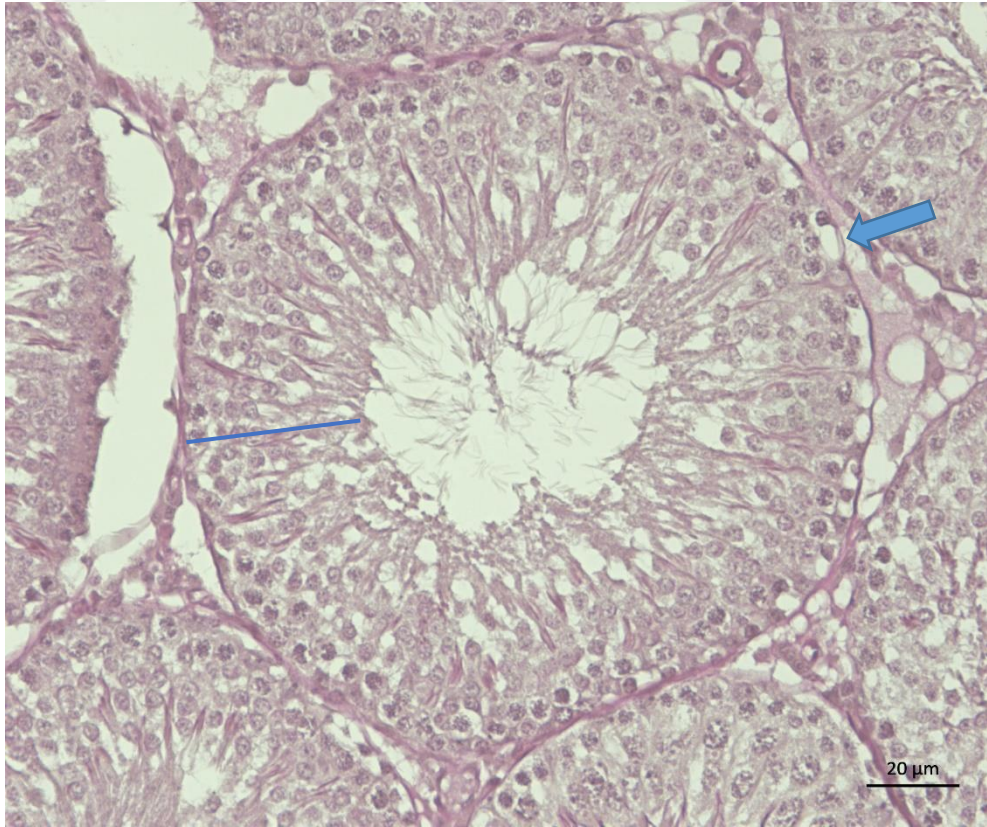
Şekil 21 STZ+HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, Gomori Trichrom 40x



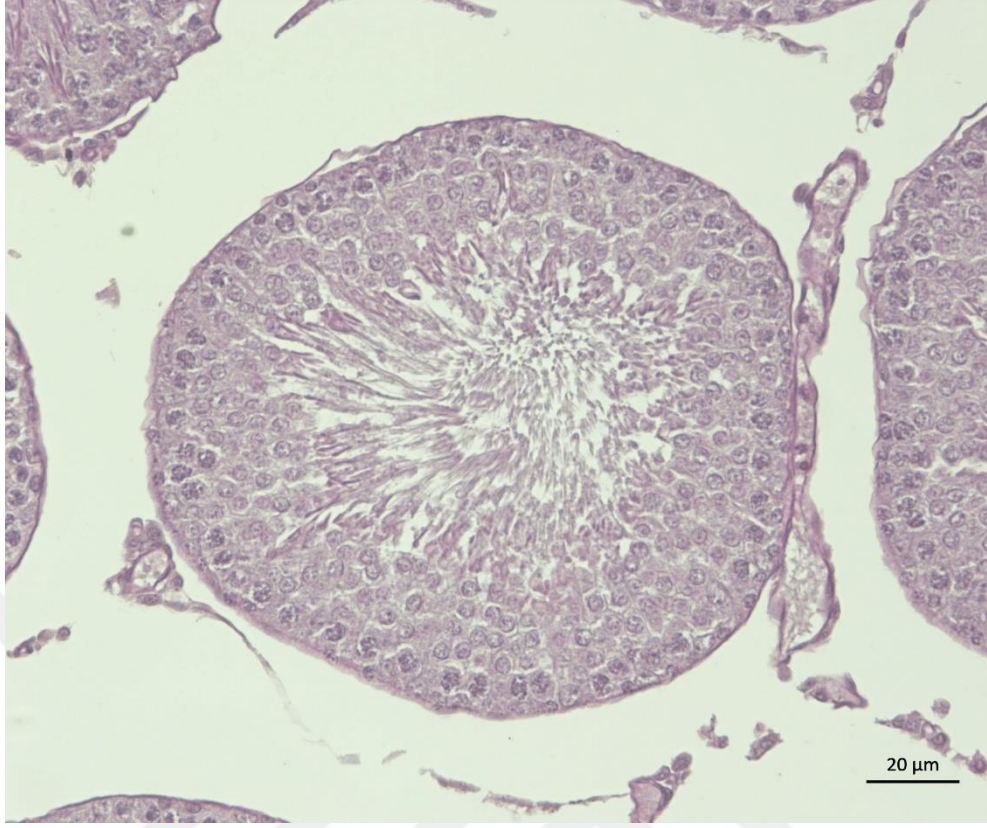
Şekil 22 Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, PAS 40x



Şekil 23 HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, PAS 40x

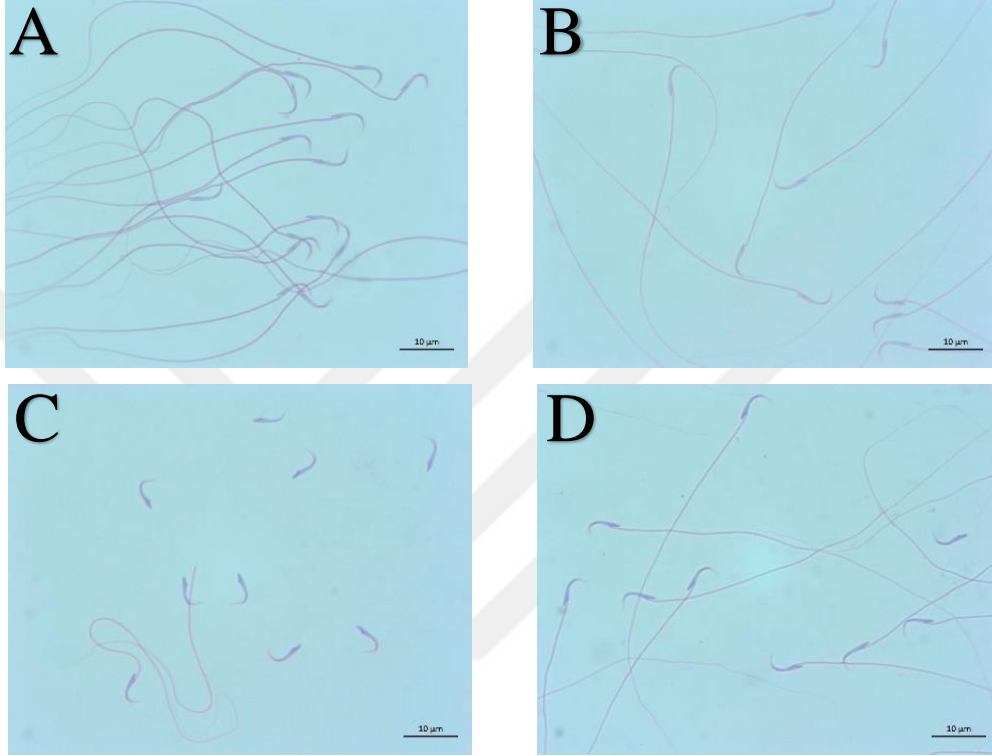


Şekil 24 STZ grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, PAS 40x Mavi ok: vakuolizasyon, Mavi çizgi: incelmış germinatif epitel



Şekil 25 STZ+HT grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü, PAS 40x

Spermlerin morfolojisi incelendiğinde STZ grubundaki sıçanların spermelerinde çok sayıda kuyuksuz başlar ve kuyuklarında kıvrılma görüldü. Bu durum daha az olmak kaydıyla, yer yer STZ + HT grubunda da gözlemlendi. Ancak kontrol ve HT grubunda herhangi bir morfolojik değişiklik olmadığı ve spermelerin normal görüldüğü tespit edildi. Elde edilen bulgular Şekil 24’de gösterilmiştir.



Şekil 26 Gruplara ait sperm görüntüleri Hematoksilen-Eozin 100x A: Kontrol Grubu, B: HT Grubu, C: STZ Grubu, D: STZ+HT Grubu

4.6.2. İmmünohistokimyasal bulgular

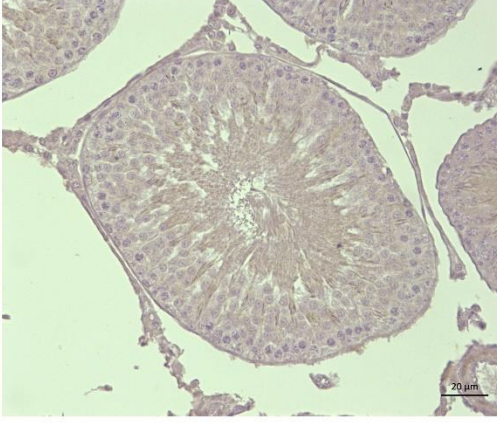
Grupların testis dokularında hidroksitirozolün Diabetes Mellitus ve onun indüklediği oksidatif stres üzerindeki etkisini belirlemek için immünohistokimyasal olarak Nrf2 ekspresyonuna bakıldı ve One-Way Anova ile sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Grafik 8’de özetlendi.

Kontrol ve diyabet gruplarına ait testis dokuları kıyaslandığında diyabet grubunda kontrol grubuna göre Nrf2 ekspresyonunda bir artış olduğu görüldü ($p < 0.0001$). HT grubu ile kontrol grubunda benzer Nrf2 ekspresyon düzeyi gözlemlendi ($p < 0.1698$). Kontrol ile HT uygulanmış diyabet grubu incelendiğinde istatistiksel olarak bir anlamlı bir fark elde edildi ($p < 0.0001$). Diyabet grubu ile HT uygulanmış diyabet grubu karşılaştırıldığında ise Nrf2 ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p < 0.0001$).

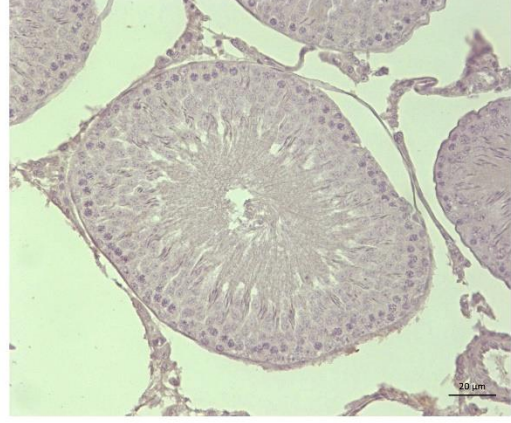
İmmünohistokimyasal Boyama

Kontrol

Nrf2

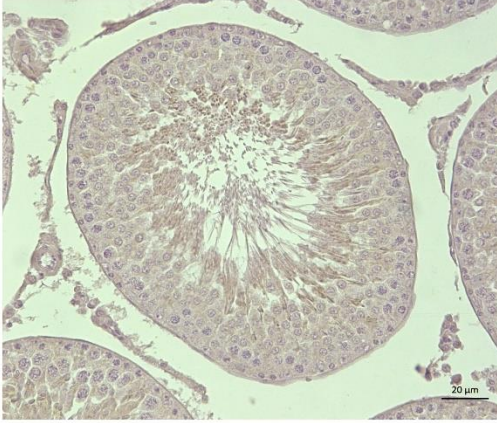


Negatif Kontrol

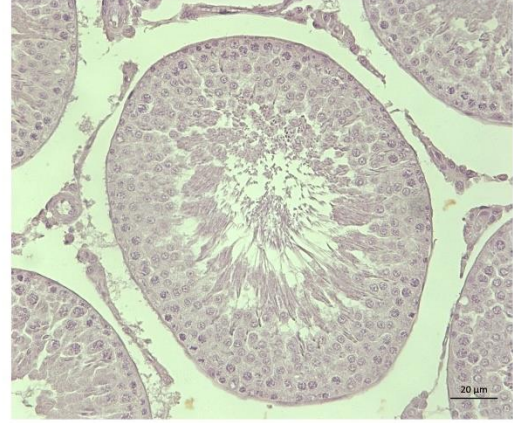


HT

Nrf2



Negatif Kontrol

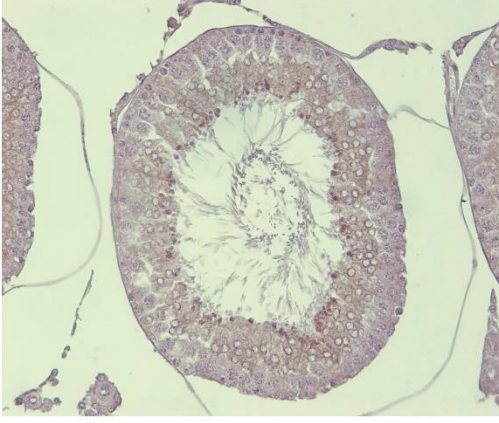


Şekil 27 A. Tüm gruplara ait testis, Nrf2 immün işaretleme, 40x

İmmünohistokimyasal Boyama

STZ

Nrf2

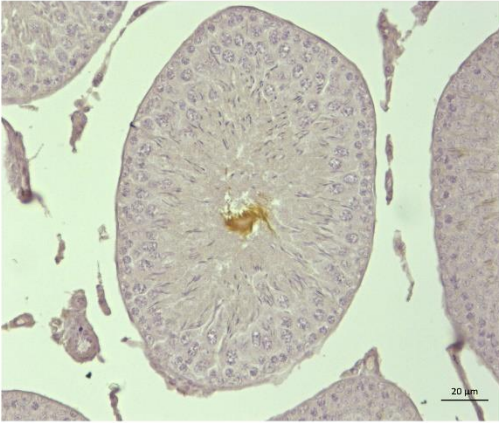


Negatif Kontrol

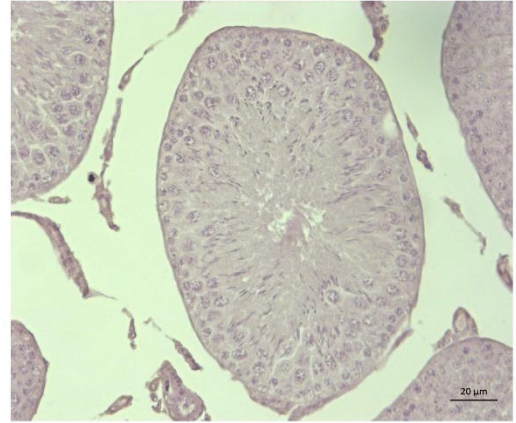


STZ+HT

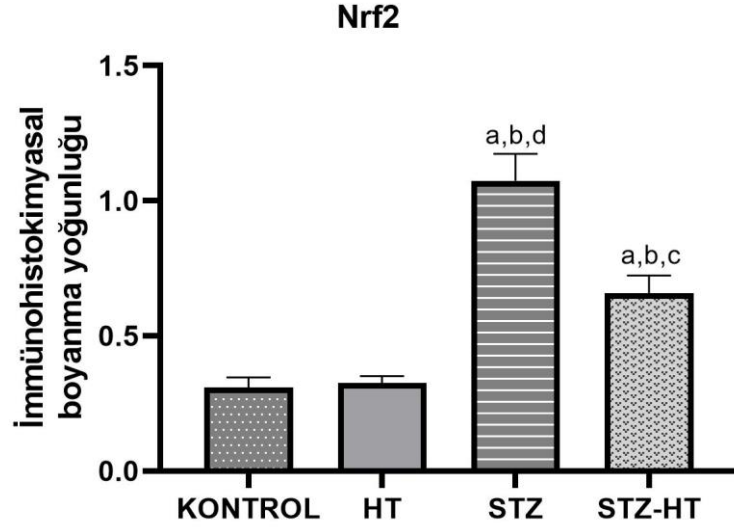
Nrf2



Negatif Kontrol



Şekil 27 B. Tüm gruplara ait testis, Nrf2 immün işaretleme, 40x



Grafik 8 Testisin İmmünohistokimyasal Boyanma Yoğunluğu

4.6.3. Biyokimyasal bulgular

Satın alınan kitler de yaşanan bir olumsuzluk nedeniyle, yapılan enzim bağlı immünosorbent testi (ELİSA) sonucunda bir veriye ulaşılamadı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Diabetes Melitus, yetersiz insülin sekresyonu veya hedef dokulardaki insülin direncine bağlı olarak çoklu organlarda hasara sebebiyet veren, hiperglisemi ve glikozüriyle kendini gösteren metabolik bir hastalıktır^{1,107,200}. Kronik bir hastalık olan DM, glukoz toleransını önemli ölçüde bozar ve bunu uzun süreli komplikasyonlar izler⁴⁵. Modern toplumlarda en önemli halk sağlığı sorunlarından biri olan ve multifaktöryel etkenlerle meydana gelen bu hastalığın, insidans oranı her geçen gün artmaktadır^{44,201}. Diyabet farklı organ sistemlerinde morfolojik ve fonksiyonel hasarlara sebep olur³⁹. Zimmet ve ark.'na göre DM, son 25 yıl içerisinde dünyanın en ölümcül veya yaşam kalitesini düşürücü hastalığıdır²⁰². Hiperglisemi, diyabetik nefropati, diyabetik retinopati, koroner kalp hastalıkları, nörolojik komplikasyonlar ve karaciğer hastalıkları gibi birçok hastalıkla ilişkilidir^{1,39}.

Agbaje ve ark. ve Sajadi ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmalarda Diabetes Mellitus'un, diyabetik hastaların ve hayvanların doğurganlığı üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu etkiler doğrultusunda gonadal fonksiyonları değiştirerek, düşük testosteron düzeyi, testiküler disfonksiyon, yetersiz spermatogenez, düşük sperm kalitesi ve azalmış libido ile kısırlığa neden olabilir^{203,204}. Cinsel işlev bozukluğu ve üreme bozukluklarının diyabetik erkeklerde sık görülen komplikasyonlar olduğu günümüzde kabul edilmektedir⁴⁵. Ayrıca, Barsiah ve ark. tarafından, diyabetin nükleer DNA parametresi, semen parametreleri ve kromatin kalitesi üzerinde zararlı etkileri olduğu doğrulanmıştır. Diyabet hastalarının sperm örneklerinde, nükleer ve mitokondriyal DNA'da yapısal hasar mevcuttur. Hipergliseminin stimüle ettiği oksidatif stres ve artmış glikozlizasyonun, sperm DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle düşük implantasyon oranına, azalan embriyo kalitesine ve belki de bazı çocukluk hastalıklarının başlamasına yol açmaktadır⁴⁹.

Gelişmekte olan teknoloji, çevre kirliliği, X- UV ışınları, ilaçlar, sigara gibi pek çok etken oksidatif stres oluşturan maddelerle karşı karşıya kalmamıza neden olmaktadır. Bu etkiler kendini serbest radikal oluşumuyla gösterir. Serbest radikaller ise hücre yapısındaki lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlerde oksidatif hasar yapmakta ve hücre içindeki yapıları bozarak DNA'ya zarar vermektedir. Vücutta artmış serbest radikal düzeyleri, koroner hastalıklar, kanser, karaciğer tahribatı, katarakt gibi çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir^{205,206}. Son yıllarda yapılan çalışmalar göz önüne

alındığında, serbest radikal oluşumu ile bunları ortadan kaldırmakla görevli enzimlerin yer aldığı antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan oksidatif stres, diyabetin neden olduğu komplikasyonların gelişmesinde en önemli faktör olarak gösterilmiştir^{142,207}.

Oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu ve erkek üreme sistemini olumsuz etkilediği, deneysel olarak diyabet yapılan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda Pitkanen ve ark. ve Jangir ve ark. tarafından saptanmıştır^{107,201}. Ayrıca diyabetik dokularda oksidatif stresle ilişkili mitokondriyal DNA mutasyonları bildirilmiştir²⁰⁸. Dolayısıyla diyabet nedeniyle oluşan oksidatif stres, hücrenin enerji üretiminin en önemli kaynağı olan mitokondri başta olmak üzere tüm hücre organellerinin ve hücrenin kalıtsal materyali olan DNA'nın zarar görmesine sebep olmaktadır²⁰⁹. Oksidatif stresle mitokondride oluşacak bir hasar, spermilerin gelişmesi için gerekli olan enerji seviyesinde düşüşe neden olabilmektedir³². Oksidatif stres sonucu oluşan genetik bozulmalar, hücre bölünmesini engellemekte ve genellikle hücreyi apoptozise götüren bir süreç başlatmaktadır. Bu olaylar erkek ve dişi üreme sistemlerinin görevlerini yerine getirememesine sebep olur⁷⁷. İnsanlarda gerçekleşen bu durumun benzeri sıçanlarda STZ enfeksiyonu ile yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir²¹⁰.

Deney hayvanlarında diyabet modeli kimyasal ajanlarla, spontan olarak veya virüs aracılığıyla yapılabilmektedir¹²⁶. Hayvan modellerinde diyabettojenik bir ajan olan streptozotosin (STZ) erkek infertilitesini içeren, çeşitli metabolik sendromların gerçek mekanizmasını araştırmak için kullanılmaktadır²¹¹. Deneysel olarak insüline bağımlı diyabet oluşturmak için yetişkin sıçanlarda i.p. yoldan 40- 60 mg/ kg arasındaki bir değer tek doz kullanımı yeterlidir²¹². Bizde çalışmamızda, deneysel Tip 1 diyabet modeli oluşturmak üzere 55 mg/ kg STZ uyguladık.

N-nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki STZ, enjeksiyondan 2 saat sonra, kan insülininin ani düşmesiyle birlikte hiperglisemi oluşturur. Yaklaşık 6 saat sonra ise, kan insülin düzeyinin yükselmesiyle hipoglisemi meydana gelir ve sonunda hiperglisemi gelişerek, kan insülin konsantrasyonu düşer.

Kan glukoz ve insülin konsantrasyonlarındaki bu değişiklikler, β hücre fonksiyonunda anormalliklere neden olmaktadır. Bolaffi ve ark. (1987) ve Nukatsuka ve ark. (1990)'nın yapmış olduğu çalışmalarda, STZ'nin glukoz oksidasyonunu bozduğu ve

insülinin biyosentezi ile salınımının azaltıldığını gösterilmiştir^{213,214}. Baynes ve ark. (1999)'na göre, diyabetin verdiği bu zarar dokularda oksidatif stresin oluşumuna bağlanmaktadır⁹⁹.

STZ ile DM oluşturulan deneysel hayvan modellerinde, seminifer tübül yapısında bozulmayla birlikte, spermatogenik seri hücrelerinde, vücut ve reproduktif organ ağırlıklarında, testislerde ve epididimlerdeki sperm sayısında azalma ile çeşitli anormallikler olduğu rapor edilmiştir^{111,114,123,133}. Bizde literatürlere paralel olarak oluşturduğumuz diyabet modelinde, kontrol grubuna göre, diyabetik sıçanlarda düzensiz şekilli seminifer tübüller, azalmış germ hücre tabakaları, vakuolizasyon ve rezidüel cisimcikler gözlemledik.

Cameron ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da testosteron seviyesindeki azalma ile testiküler atrofi, interstisyel doku içindeki kan damarlarının duvar kalınlaşması ile kapiller fonksiyonun bozulması ve tüm bunların sonucu olarak Leydig hücrelerinde dejenerasyonla birlikte disfonksiyon oluşumu görülmüştür²¹⁵. Leydig hücrelerinde meydana gelen bu fonksiyon bozukluğunun nedeninin, oksidatif stresin meydana gelmesi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir¹²³. Leydig hücrelerine ait hücre kültürü hatlarında Chen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalar göstermektedir ki bu hücre tipinde glutatyon (GSH) aktivitesinde ciddi azalma meydana gelmiştir²¹⁶. Glutatyon (GSH), hücrelerde tiyol indirgenme reaksiyon dengesinin sağlanmasında oldukça önemli bir role sahip antioksidan bir moleküldür. Hücre içi tiyol dengesi, hücrenin enerji metabolizmasıyla ilgili reaksiyonlar sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında kritik bir öneme sahiptir²¹⁷. Glutatyonun indirgenmiş formu ile yükseltgenmiş formu arasında meydana gelen geri dönüşümlü reaksiyonu içeren hücre içi GSH döngüsü, lipid ve proteinlerin enerji metabolizmasında yakılması sonucu meydana gelen hidroksil gruplarının yok edilmesinde önemli olan bir döngüdür. Bu döngü hücredeki ROS miktarı ile koruyucu enzimlerin miktarı arasındaki dengeyi sağlayan hayati bir öneme sahiptir. Diyabet gibi hastalıklarda bu denge bozulmakta ve ortaya çıkan bu stres durumunu düzeltmek amacıyla görevli enzimlerin aktivitesini artıran çeşitli antioksidan uygulamaları yapılarak sonuçları araştırılmaktadır²¹⁸. Diyabetin farmakolojik tedavisi hipoglisemik ilaçlara ve insüline dayanır. Diyabet tedavisinde geleneksel bitkisel tedavilerin sıklıkla kullanıldığı ve bitkilerin hipoglisemik etkileri konusunda bilimsel çalışmaların yapıldığı bilinmektedir. Antioksidanların, diyabette bozulmuş oksidatif stres, protein glikozilasyonu ve glukoz

metabolizmasının düzeltilmesinde ve pek çok hastalığa neden olabilecek reaksiyonların önlenmesinde önemli etkileri olması muhtemeldir²¹⁹. Bu yüzden DM tedavisinde antioksidan maddelerin kullanımı tavsiye edilmektedir²²⁰. Bugüne kadar, giderek artan bir şekilde sorgulanan antioksidan takviyelerinin, doğrudan bir antioksidan etki oluşturduğu ve dolayısıyla vücut için faydalı olduğu kesin bir eğilim vardır²²¹.

Ayrıca, diyabetin, lipit peroksidasyonunda bir artışa, glutatyon redoks durumunun değişmesine, plazmatik antioksidan seviyelerinde bir düşüşe ve antioksidan enzim aktivitelerinde bir azalmaya neden olduğu iyi bilinmektedir. Tüm bu değişiklikler, hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresi üretebilir¹⁶¹. Hamden ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış olduğu çalışma, diyabetik sıçanlara verilen HT takviyesinin, bağırsak maltaz, laktaz, sükröz, lipaz aktivitelerinde önemli bir düşüşe, SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde ve düşük glutatyon seviyelerinde bir artışa buna bağlı olarak oksidatif stres durumunun azalmasına neden olduğunu göstermiştir. Dahası, tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) seviyeleri ve laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesi HT uygulamasından sonra da azalır. Dahası, tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) seviyeleri ve laktat dehidrojenazın (LDH) aktivitesi HT uygulamasından sonra düşmektedir²²².

Literatürde kuvvetli bir antioksidan kimliğiyle öne çıkan ve çeşitli dokulardaki etkileri oldukça iyi bilinen HT zeytin ve zeytin yan ürünlerinde bulunan katma değeri yüksek bir fenolik bileşik olarak göze çarpar²²². Hem doğrudan radikal temizleme aktivitesi hem de antioksidan mekanizmaların genomik düzenlemesi gibi özelliklere sahiptir²²³. Hamden ve arkadaşlarının, 2009 yılında yaptığı çalışma ile hidroksitirozolün, immünolojik tepkinin azaltılması, insan eritrositlerinin hidrojen peroksit, anti-enflamatuar, antitrombotik ve hipokolesterolemik etkilerin neden olduğu oksidatif hasardan korunması gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu kanıtlanmıştır²²². HT, hegzokinaz, piruvat kinaz gibi glikozun fosforilasyonunu katalize eden bazı enzimleri arttırabilir. Glukoz-6-fosfatın fosforilasyonunu katalize eden enzimleri azaltarak, ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının kapanmasına ve insülin salgılanmasında kilit rol oynayan periferel glukoz alımını arttırarak voltaj bağımlı kalsiyum kanalının açılmasına neden olur. Hidroksitirozolün süperoksit anyon ve hidroksil radikalinin güçlü bir temizleyicisi olduğu Jemai ve arkadaşları tarafından 2009 yılında kanıtlanmıştır²²⁴. Allouche ve arkadaşları HT'nin, 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalinin etkili bir temizleyicisi olduğunu rapor ettiler²²². Bu antioksidan aktivite, pankreas hücrelerini

hasardan ve ölümden korur, bu da plazmadaki glikoz seviyesini azaltan insülin sekresyonunun artmasına neden olur²²². Bizde yapmış olduğumuz çalışmada, tüm bu bilgilerden yola çıkılarak sıçan testislerinde diyabet kaynaklı meydana gelen hasarın HT uygulaması ile düzeltilebilirliğini histolojik olarak gösterdik.

Diyabetik testiste spermatogenez sırasında kontrolsüz apoptozisin meydana geldiği bildirilmiştir. Bu nedenle, diyabetik erkeklerdeki testiküler fonksiyon bozukluğunun patogenezinde apoptozisin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir²²⁵. Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HT tedavisinin, oksidatif stres kaynaklı apoptozis yoluyla seçici bir şekilde öldürülmesi için hücreleri duyarlı hale getiren Akt aktivitesini artırdığını bildirdi²²⁶.

HT, zeytinyağı gibi doğal ve sağlıklı gıdaların bir parçası olmasına rağmen, HT'nin toksisitesini göstermek için birçok çalışma yapılmıştır. Bu toksisite, akut toksisite, teratojenite, mortalite, morbidite veya mutajenik etkiler değerlendirilerek hücrelerde ve hayvan modellerinde ölçülmüştür²²⁷⁻²³⁰. Günümüzde HT'nin kanser, diyabet veya kronik patolojiler gibi farklı hastalıklara karşı olası bir koruyucu bileşik olarak kullanılmasına büyük ilgi duyulmakla birlikte, HT'nin insandaki olası toksikolojik etkilerini anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir²³¹. Atta vd. 2017'deki çalışmalarında, sıçanlara 90 gün boyunca 2 g/ kg enjeksiyonunun (intravenöz, subkutanöz, intramüsküler), aşılama alanındaki lokal kızarıklığa neden olduğunu ve 48 saatten önce bu etkilerin ortadan kalktığını tarif etmişlerdir¹. Calles ve arkadaşları 2012 yılında saf hidrositrosolün toksikolojik etkilerini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada HT'nin 13 hafta boyunca günde 5 kez 5, 50 ve 500 mg/ kg/ gün dozlarında oral olarak uygulanmasının herhangi bir mikro ve makroskopik değişikliğe veya ölüme yol açmadığı görülmüştür. Toksikolojik analizde en yüksek tedavi dozuna sahip grupta, vücut ve böbrek ağırlığında anlamlı olmayan bir artış gözlenmiştir ancak organ işlevselliği veya yapısında bir değişiklik olmadığı not edilmiştir. Bu nedenle, 500 mg/ kg/ gün dozlarında hiçbir olumsuz etkinin gözlenmediği sonucuna varmışlardır¹⁶³. Ek olarak 2013 yılında Calles ve arkadaşları, HT fizyolojik konsantrasyonda in vitro modellerde kullanıldığında genotoksik ve mutajenik etki belirtileri gözlemlenmemiştir²³².

Hayvan modellerinde HT'nin subkronik toksisitesini belirlemek için yapılan son çalışmalardan biri Heilman ve arkadaşlarına aittir. Hidrositirozolü, arka arkaya 90 gün boyunca 125, 250 ve 500 mg/ kg/ gün dozlarında dişi ve erkek Wistar sıçanlarına gavaj

yoluyla uygulamışlardır. Ancak yapılan araştırmada 250 mg/kg/gün için herhangi bir toksikolojik etki bulunamamıřtır²³³. Benzer bir alışma Kirkland, Edwards, Woehrle ve Beilstein tarafından H40 özütü kullanılarak yapılmıştır. Sonuçta erkek sıçanların vücut ağırlığında bir azalma, göreceli olarak karaciğer, timus, böbrekler ve dalak ağırlığında bir artış bulunmasına rağmen ölüme rastlanılmamıřtır²³⁴.

Literatürde Hidroksitirosol için daha çeşitli toksisite çalışmaları bildirilmiştir. Hidroksitirosolün akut toksisitesi, sıçanlarda ve farelerde ölümcül dozunun 2000 mg/kg'dan daha yüksek olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar, test edilen zeytin ekstraktlarının in vivo yüksek dozlarda genotoksik olmadıkları ve insan tüketimi için güvenli olduğu sonucuna varmışlardır. Hidroksitirosol vücut üzerine diğer polifenollerle aynı etkiye sahiptir¹⁶³.

Bir takım alışmalar, ARE gibi antioksidan yolaklarla ilgili HT için farklı etki mekanizmaları önermiş olup, sonunda nükleer faktör- E2 ile ilişkili faktör- 2 (Nrf2) ve JNK-p62 / SQSTM1'in modülasyonuna yol açtığını göstermiştir^{235,236}. HT ayrıca, PPARGC1α'yı artırarak mitokondriyal biyogenez uyarıcı olarak da işlev görür²³⁵. Buna ek olarak Zrelli ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma gösterdi ki, HT, Nrf2'nin ekspresyonunu ve nükleer translokasyonunu artırır, daha sonra DNA onarım proteinleri veya faz II detoksifiye edici enzimler gibi antioksidan tepki elemanlarını (ARE) kodlayan çoklu genlerin aktivasyonunu destekler²³⁷.

Bayram vd. (2012), Liu vd. (2010), Zou vd. (2012) yapmış oldukları çalışmalarda, HT'nin endojen savunma sistemlerini aktive ederek ek antioksidan koruma sağlayabileceği fikrini desteklemişlerdir^{194,236,238}. Yakın zamanda incelenen ve önerilen mekanizmalardan biri, nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) aktivasyonu ile faz II detoksifiye edici enzimlerin HT- aracılı indüksiyonunu içermektedir¹⁶⁸.

HT'nin Keap1 / Nrf2 yolağına olan etkilerini içeren ilk araştırma Liu ve arkadaşlarındır. Bu alışma, HT'nin, mitokondriyi, retinal pigment epitel hücrelerinde akrolein kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, akroleinin neden olduğu nükleer Nrf2 ekspresyonundaki önemli düşüş, hücrelerin HT ön tedavisi ile önlenbilir²³⁸. Aynı grup daha sonra HT'nin faz II enzimlerinin (GCL, NQ1, HO-1) ekspresyonunu teşvik etmek için Nrf2'yi aktive ettiğini ve peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör gama koaktif edici 1 alfa (PPARGC1α) aktivasyonu yoluyla mitokondriyal biyogenezi uyardığını bildirmiřtir¹⁶⁸.

Bununla birlikte, diğer bilim insanları, çalışma insanlarda yapıldığında HT'nin Nrf2'yi aktive edebileceğini gösteren kanıtları bulamamıştır. Bu konuyu netleştirmek için daha fazla klinik çalışma yapılmalıdır¹⁶¹.

Bu çalışmada, streptozotosin ile indüklenen diabetes mellitusun sebep olduğu testiküler oksidatif hasara karşı hidrokstirozolün koruyucu rolü araştırılmıştır. Diyabetik sıçanların testis dokularında, seminifer tübüller içerisinde vakuolizasyon, apoptotik hücreler, germinal epitel boyunda ve hacminde azalma, intertübüler alanda bağ dokusu artışı ile genel bir dejenerasyon gözlenirken, HT ile muamele edilmiş diyabet grubundan alınan örnekler de ise normal seminifer tübüller ve genel yapısal bütünlük görüldü. İmmünohistokimyasal incelemeler sonucunda ise kontrol ve diyabet gruplarına ait testis dokuları kıyaslandığında diyabet grubunda kontrol grubuna göre Nrf2 ekspresyonunda bir artış olduğu görüldü. HT grubu ile kontrol grubunda benzer Nrf2 ekspresyon düzeyi gözlemlendi. Kontrol ile HT uygulanmış diyabet grubu incelendiğinde ise istatistiksel olarak bir anlamlı bir fark elde edildi. Diyabet grubu ile HT uygulanmış diyabet grubu karşılaştırıldığında ise Nrf2 ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi.

Elde edilen bu sonuçlar HT'nin; Nrf2 yolağını etkileyerek testis hasarını azalttığını, hipoglisemik ve antioksidan işleve sahip olduğunu göstermiştir. Diyabetik hastalarda komplikasyonların önlenmesinde etkili olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Atta, M. S. *et al.* Thymoquinone defeats diabetes-induced testicular damage in rats targeting antioxidant, inflammatory and aromatase expression. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
2. Ben Slama-Ben Salem, R. *et al.* In vitro and in vivo anti-diabetic and anti-hyperlipidemic effects of protein hydrolysates from *Octopus vulgaris* in alloxanic rats. *Food Res. Int.* **106**, 952–963 (2018).
3. Eizirik, D. L., Colli, M. L. & Ortis, F. The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **5**, 219–226 (2009).
4. Diabetes, D. O. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **32**, (2009).
5. Lorian, K. *et al.* Long-term NaHS administration reduces oxidative stress and apoptosis in a rat model of left-side varicocele. *Andrologia* 1–12 (2019) doi:10.1111/and.13496.
6. Merri, E., Calzaretto, G., Bobba, A., Storelli, M. M. & Casalino, E. Antioxidant role of hydroxytyrosol on oxidative stress in cadmium-intoxicated rats: Different effect in spleen and testes. *Drug Chem. Toxicol.* **37**, 420–426 (2014).
7. Kedechi, S. *et al.* Antioxidant effect of hydroxytyrosol on human sperm quality during in vitro incubation. *Andrologia* **49**, 1–5 (2017).
8. Bhakkiyalakshmi, E. *et al.* Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1747–1757 (2014).
9. Valenzuela, R. *et al.* Molecular adaptations underlying the beneficial effects of hydroxytyrosol in the pathogenic alterations induced by a high-fat diet in mouse liver: PPAR- α and Nrf2 activation, and NF- κ B down-regulation. *Food Funct.* **8**, 1526–1537 (2017).
10. P., L. & Jlh, G. *Concise Histology*. (Elsevier, 2011).
11. H., M. & WP., R. *Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2011).
12. AL, K. & LL, T. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. (Elsevier, 2012).
13. B, S. & M, C. *Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar*. (ODTÜ Yayıncılık, 2004).
14. Paulsen, F., Waschke, J. & Böckers, T. M. *Sobotta Anatomi Konu Kitabı*. (Güneş Tıp Kitapevleri, 2016).
15. A, Y., B, D. & Ö, O. *Dere Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*. (Akademisyen Kitapevi, 2018).
16. KL, M. & AMR., A. *Temel Klinik Anatomi*. (Güneş Tıp Kitabevi, 2006).
17. K, A. & A., E. *Anatomi*. (Güneş Tıp Kitabevi, 2006).
18. EP, W., H, R. & KT., S. *Vander insan fizyolojisi*. (Güneş Kitapevleri, 2014).
19. KL, M. & TVN., P. *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri*. (Güneş Tıp Kitapevleri,

- 2009).
20. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. & G.Torchia, M. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. (Nobel Tıp Kitabevleri, 2016).
 21. TW, S. *Langman's Medikal Embriyoloji*. (Palme Yayıncılık, 1996).
 22. E, G. & E, K. *Embriyoloji Atlası*. (Esnaf ofset matbaacılık, 1997).
 23. Ş, K. *Histoloji*. (1986).
 24. P.Gartner, L. & Hiatt, J. L. *Hücre Biyolojisi ve Histolojisi*. (İstanbul Tıp Kitapevi, 2016).
 25. H, K., G, S. & G, T. *İnsan Embriyolojisi*. (Alfa Basım Yayım Dağıtım, 1992).
 26. VP, E. *Di Fiore's Atlas of Histology With Functional Correlations*. (Palme Yayıncılık, 2013).
 27. Mescher, A. L. *Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas*. (Nobel Tıp Kitabevleri, 2016).
 28. Hassa H. *İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuar Uygulamaları*. (Osmangazi Üniversitesi Basımevi, 2003).
 29. Pakker Ş. *Histoloji*. (Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1990).
 30. Donnell, L. O., Robertson, K. M., Jones, M. E. & Simpson, E. R. Estrogen and Spermatogenesis*. **22**, 289–318 (2001).
 31. M, E. *Genel ve Özel Histoloji*. (Pelikan Yayıncılık, 2004).
 32. Dias, T. R., Alves, M. G., Silva, B. M. & Oliveira, P. F. Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. *Mol. Cell. Endocrinol.* **396**, 37–45 (2014).
 33. Hall, J. E. & Guyton. *Guyton Tıbbi Fizyoloji*. (Nobel Tıp Kitabevleri, 2013).
 34. Urry, L. A. *et al. Campbell biology*. (Pearson, 2016).
 35. Yannasithinon, S. & Iamsaard, S. Alterations of morphology and phosphorylated protein expression in the seminal vesicles of diabetic mice. *Andrologia* **51**, 1–9 (2019).
 36. Şakul, B. U. *Tusem Anatomi*. (Tusem Tıbbi Yayıncılık, 2008).
 37. Cochard, L. R. *Netter's Atlas of Human Embryology*. (Saunders, 2012).
 38. Grogg, J. B. *et al.* A systematic review of treatment outcomes in localised and metastatic spermatocytic tumors of the testis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **145**, 3037–3045 (2019).
 39. Hosseinipour, M., Goodarzi, N. & Bakhtiari, M. Protective efficiency of Ashrasi date palm hydroalcoholic extract against diabetes-induced testicular toxicity: A biochemical and stereological study. *Andrologia* **51**, 1–12 (2019).
 40. S, T. Deneysel Tıp I Diyabetin Sıçan Periferik Sinirleri Üzerine Etkisinin Numerik Analiz Yöntemleri ile İncelenmesi. (Konya Selçuk Üniversitesi, 2008).
 41. Koloğlu, E. G. *Endokrinoloji Temel ve Klinik*. (MN Medikal&Nobel Yayınları, 2005).

42. M, B. August, 2003 DCU Book Review #1 Bliss, Michael. 1–5 (1983).
43. Bilous, R. & Donnelly, R. *Diyabet El Kitabı*. (İstanbul Tıp Kitabevi, 2013).
44. Sampannang, A., Arun, S., Burawat, J., Sukhorum, W. & Iamsaard, S. Testicular histopathology and phosphorylated protein changes in mice with diabetes induced by multiple-low doses of streptozotocin: An experimental study. *Int. J. Reprod. Biomed.* **16**, 235–246 (2018).
45. Gholizadeh, F., Dastghaib, S., Koohpeyma, F., Bayat, E. & Mokarram, P. The protective effect of Stevia rebaudiana Bertoni on serum hormone levels, key steroidogenesis enzymes, and testicular damage in testes of diabetic rats. *Acta Histochem.* **121**, 833–840 (2019).
46. Skurikhin, E. G. *et al.* Role of Sertoli and Leydig Cells in the Regulation of Spermatogonial Stem Cell and Development of Reproductive Disorders in Male C57Bl/6 Mice with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bull. Exp. Biol. Med.* **164**, 127–131 (2017).
47. Tao, Z., Shi, A. & Zhao, J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochem. Biophys.* **73**, 181–185 (2015).
48. İmamoğlu, Ş., Salman, İ., Akalın, S. & Yılmaz, C. *Geçmişten Geleceğe Diabetes Mellitus*. (Pelin Ofset Matbaacılık, 2015).
49. Barsiah, S. *et al.* Evaluation of testis hormonal and histopathological alterations in type I and type II diabetic rats. *J. Cell. Biochem.* **120**, 16775–16785 (2019).
50. De Ferranti, S. D. *et al.* Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease a scientific statement from the american heart association and american diabetes association. *Circulation* **130**, 1110–1130 (2014).
51. Garcia-Contreras, M., Brooks, R. W., Boccuzzi, L., Robbins, P. D. & Ricordi, C. Exosomes as biomarkers and therapeutic tools for type 1 diabetes mellitus. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 2940–2956 (2017).
52. Squitti, R. *et al.* Serum copper profile in patients with type 1 diabetes in comparison to other metals. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **56**, 156–161 (2019).
53. Nyenwe, E. A., Jerkins, T. W., Umpierrez, G. E. & Kitabchi, A. E. Management of type 2 diabetes: Evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* **60**, 1–23 (2011).
54. Ekoé, J. M., Ghadirian, P., Simard, A., Baillargeon, J. & Perret, C. [Diabetes mellitus and pancreatic cancer: a case-control study in greater Montreal, Quebec, Canada]. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* **40**, 447–53 (1992).
55. Zinman B, Gerich J, Buse JB, Lewin A, Schwartz S, Raskin P, Hale PM, Zdravkovic M, B. L. Efficacy and Safety of the Human Liraglutide in Combination With Metformin and Thiazolidinedione in Patients With. *Diabetes Care* **32(7)**, 1224–30 (2009).
56. Buse, J. B. *et al.* Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet* **374**, 39–47

- (2009).
57. PC, C. & RA, H. *Biyokimya*. (Nobel Tıp Kitabevleri, 1997).
 58. Andrali, S. S., Smapley, M. L., Vanderford, N. L. & Özcan, S. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells. *Biochem. J.* **415**, 1–10 (2008).
 59. Bell, G. I. *et al.* Sequence of the human insulin gene. *Nature* **284**, 26–32 (1980).
 60. HOLT, R. I. G., COCKRAM, C. S., FLYVBJERG, A. & GOLDSTEIN, B. J. *Textbook of Diabetes*. (Blackwell Publishing, 2010).
 61. Katzung, B. G. *Basic & Clinical Pharmacology*. (McGraw-Hill Education, 2018).
 62. De Vos, A. *et al.* Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J. Clin. Invest.* **96**, 2489–2495 (1995).
 63. Van Schaftingen, E. Short-term regulation of glucokinase. *Diabetologia* **37 Suppl 2**, S43-7 (1994).
 64. Cook, D. L. & Hales, N. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**, 271–273 (1984).
 65. N, B. *Temel Biyokimya*. (Firat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 1979).
 66. Westermeier, F. *et al.* Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase is expressed in α -cells from human and murine pancreas. *J. Cell. Physiol.* **235**, 166–175 (2020).
 67. Gromada, J., Franklin, I. & Wollheim, C. B. A-Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research But the Enigma Remains. *Endocr. Rev.* **28**, 84–116 (2007).
 68. Bucci, D. *et al.* Gluts and mammalian sperm metabolism. *J. Androl.* **32**, 348–355 (2011).
 69. Angulo, C. *et al.* Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: Cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J. Cell. Biochem.* **71**, 189–203 (1998).
 70. Boussouar, F. & Benahmed, M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol. Metab.* **15**, 345–350 (2004).
 71. Thun, M. J. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org on March 29, 2011. For personal use only. No other uses without permission. *N. Engl. J. Med.* **329**, 977–986 (1991).
 72. Ramlau-Hansen, C. H. *et al.* Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum. Reprod.* **22**, 188–196 (2007).
 73. Kort, H. I. *et al.* Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J. Androl.* **27**, 450–452 (2006).
 74. Ayers, K. *et al.* Familial bilateral cryptorchidism is caused by recessive variants in RFXP2. *J. Med. Genet.* 727–733 (2019) doi:10.1136/jmedgenet-2019-106203.

75. Aitken, R. J. & Roman, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **1**, 15–24 (2008).
76. Khaki, A. *et al.* Protective effects of Quercetin on spermatogenesis in streptozotocin- induced diabetic rat. *J. Med. Plants* **8**, 57–64 (2009).
77. Sexton, W. J. & Jarow, J. P. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* **49**, 508–513 (1997).
78. Kamaldeep Singh, S. Diabetes Associated Male Reproductive Dysfunctions: Prevalence, Diagnosis and Risk Factors. *Int. J. Drug Dev. Res.* **8**, 7–10 (2016).
79. Kefer, J. C., Agarwal, A. & Sabanegh, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int. J. Urol.* **16**, 449–457 (2009).
80. Sanocka, D. & Kurpisz, M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**, 1–7 (2004).
81. Ochsendorf, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update* **5**, 399–420 (1999).
82. Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S. & Floyd, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1456–1462 (2000).
83. Jang, Y. Y., Song, J. H., Shin, Y. K., Han, E. S. & Lee, C. S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol. Res.* **42**, 361–371 (2000).
84. T, O., K, E. & EY, S. *İnsan Biyokimyası*. (Palme Yayıncılık, 2002).
85. Becker, L. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc. Res.* **61**, 461–470 (2004).
86. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40 (2006).
87. Inoue, M. *et al.* Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2495–2505 (2005).
88. Cadenas, E. & Davies, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222–230 (2000).
89. Conner, E. M. & Grisham, M. B. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition* **12**, 274–277 (1996).
90. Halliwell, B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 33–50 (1996).
91. Guérin, P., El Mouatassim, S. & Ménézo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* **7**, 175–189 (2001).
92. Bansal, A. K. & Bilaspuri, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions.

- Vet. Med. Int.* **2011**, (2011).
93. Agarwal, A. & Prabakaran, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J. Exp. Biol.* **43**, 963–974 (2005).
 94. Sikka, S. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Curr. Med. Chem.* **8**, 851–862 (2012).
 95. Darley-Usmar, V., Wiseman, H. & Halliwell, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* **369**, 131–135 (1995).
 96. Harman, D. The Free Radical Theory of Aging. *Antioxidants Redox Signal.* **5**, 557–561 (2003).
 97. Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* **31**, 261–272 (1999).
 98. Baynes, J. W. & Thorpe, S. R. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **3**, 277–284 (1996).
 99. Zhang, H. *et al.* Linderane protects pancreatic β cells from streptozotocin (STZ)-induced oxidative damage. *Life Sci.* **233**, 116732 (2019).
 100. Wolff, S. P. Diabetes mellitus and free radicals. *Br. Med. Bull.* **49**, 642–652 (1993).
 101. Manuscript, A. Oxidative stress, inflammation, and cancer. **49**, 1603–1616 (2011).
 102. McGuinness, A. & Sapey, E. Oxidative Stress in COPD: Sources, Markers, and Potential Mechanisms. *J. Clin. Med.* **6**, 21 (2017).
 103. David, J. A., Rifkin, W. J., Rabbani, P. S. & Ceradini, D. J. The Nrf2/Keap1/ARE Pathway and Oxidative Stress as a Therapeutic Target in Type II Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* **2017**, (2017).
 104. Dinçel, A. S. Derleme Makale [Review Article] Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. **31**, 51–56 (2006).
 105. Lipinski, B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications* **15**, 203–210 (2001).
 106. Giacco, *et al.* Oxidative stress and diabetic complications Ferdinando NIH Public Access. *NIH Public Access Author Manuscr.* **107**, 1058–1070 (2011).
 107. Jangir, R. & Jain, G. Diabetes Mellitus Induced Impairment of Male Reproductive Functions: A Review. *Curr. Diabetes Rev.* **10**, 147–157 (2014).
 108. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. & Grodsky, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **23**, 599–622 (2002).
 109. Pop-Busui, R., Sima, A. & Stevens, M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **22**, 257–273 (2006).

110. Agarwal, A., Saleh, R. A. & Bedaiwy, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* **79**, 829–843 (2003).
111. Steger, R. W. *et al.* Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. *Endocrinology* **124**, 1737–1743 (1989).
112. Kilarkaje, N., Al-Hussaini, H. & Al-Bader, M. M. Diabetes-induced DNA damage and apoptosis are associated with poly (ADP ribose) polymerase 1 inhibition in the rat testis. *Eur. J. Pharmacol.* **737**, 29–40 (2014).
113. Ding, G. L. *et al.* The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian J. Androl.* **17**, 948–953 (2015).
114. Ikeda, M. *et al.* Role of Radical Oxygen Species in Rat Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Heat Stress. *Biol. Reprod.* **61**, 393–399 (1999).
115. Glenn, D. R. J., McClure, N. & Lewis, S. E. M. The hidden impact of diabetes on male sexual dysfunction and fertility. *Hum. Fertil.* **6**, 174–179 (2003).
116. Khaki, A., Khaki, A. A., Hajhosseini, L., Golzar, F. S. & Ainehchi, N. Diabetes Rats . **11**, 1–8 (2014).
117. Ballester, J. *et al.* Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J. Androl.* **25**, 706–719 (2004).
118. Bru, J. C., Gautam, D. & Burks, D. J. Role of Brain Insulin Receptorin Control of Body Weight andReproduction. **289**, 1–4 (2012).
119. Pitteloud, N. *et al.* Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 2636–2641 (2005).
120. Peltola, V., Huhtaniemi, I. & Ahotupa, M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J. Androl.* **13**, 450–5.
121. Tez, U. & Kuru, R. E. Diyabetik nefropati oluşturulmuş ratlarda pioglitazonun antioksidan parametrelere ve patolojik süreçlere etkileri. (2009).
122. Macleod, J. SPERMATOZOA. 512–518 (1943).
123. Ricci, G. *et al.* Diabetic rat testes: Morphological and functional alterations. *Andrologia* **41**, 361–368 (2009).
124. El-Missiry, M. A. & Shalaby, F. Role of β -carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **14**, 238–243 (2000).
125. La Vignera, S., Condorelli, R., Vicari, E., D'Agata, R. & Calogero, A. E. Diabetes mellitus and minireview sperm parameters. *J. Androl.* **33**, 145–153 (2012).
126. Kurçer, Z. & Karaoğlu, D. Deneysel Diyabet Modellerinde Alloksan ve Streptozotosin Kullanımı. *Turkish J. Endocrinol. Metab.* **16**, 34–40 (2012).
127. Bonnevie-nielsen, V., Steffes, M. W. & Lernmark, A. K. E. Given Multiple Low Doses of

- Streptozotocin. **30**, (1981).
128. Diabetes, V., Evaluation, Q., Population, I. C. & Technique, I. *Diabetologia*. **401**, 395–401 (1978).
 129. Dunn, J. S., Kirkpatrick, J., McLetchie, N. G. B. & Telfer, S. V. Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. *J. Pathol. Bacteriol.* **55**, 245–257 (1943).
 130. Srivastava, L. M., Bora, P. S. & Bhatt, S. D. Diabetogenic action of streptozotocin. *Trends Pharmacol. Sci.* **3**, 376–378 (1982).
 131. Agarwal, M. K. Streptozotocin: mechanisms of action: Proceedings of a workshop held on 21 June 1980, Washington, DC. *FEBS Lett.* **120**, 1–3 (1980).
 132. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* **50**, 537–546 (2001).
 133. Kanter, M., Uysal, H., Karaca, T. & Sagmanligil, H. O. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic β -cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch. Toxicol.* **80**, 362–369 (2006).
 134. Schnedl, W. J., Ferber, S., Johnson, J. H. & Newgard, C. B. STZ transport and cytotoxicity: Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* **43**, 1326–1333 (1994).
 135. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* **51**, 216–226 (2008).
 136. Gülinnaz, A. & İRER, S. V. Deneysel Diyabet Modelleri Experimental Models of Diabetes Mellitus. *Türk Klin. Biyokim. Derg* **2**, 127–136 (2004).
 137. Murata, M., Takahashi, A., Saito, I. & Kawanishi, S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: Induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 881–887 (1999).
 138. Altay, B., Çetinkalp, Ş., Doğanavşargil, B., Hekimgil, M. & Semerci, B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil. Steril.* **80**, 828–831 (2003).
 139. Baccetti, B. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum. Reprod.* **17**, 2673–2677 (2002).
 140. Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A. & Oter, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol. Res.* **51**, 117–123 (2005).
 141. Rjasekaran, S., Sivagnanam, K. & Subramanian, S. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol. Reports* **57**, 90–96 (2005).
 142. Shrilatha, B. & Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences. *Reprod. Toxicol.* **23**, 578–587 (2007).

143. Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y. W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9926–9930 (1994).
144. Uruno, A., Yagishita, Y. & Yamamoto, M. The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.* **566**, 76–84 (2015).
145. Kimura, M. *et al.* Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of Nrf2-Maf heterodimer from that of Maf homodimer. *J. Biol. Chem.* **282**, 33681–33690 (2007).
146. Thimmulappa, R. K. *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* **62**, 5196–5203 (2002).
147. Dinkova-Kostova, A. T. *et al.* Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11908–11913 (2002).
148. Kaspar, J. W., Niture, S. K. & Jaiswal, A. K. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *J. Cell Sci.* **125**, 1027–1038 (2012).
149. van Roon-Mom, W. M. C. *et al.* Mutant huntingtin activates Nrf2-responsive genes and impairs dopamine synthesis in a PC12 model of Huntington's disease. *BMC Mol. Biol.* **9**, (2008).
150. Carmona-Aparicio, L. *et al.* Overview of Nrf2 as therapeutic target in epilepsy. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 18348–18367 (2015).
151. Gasiorek, J. J. & Blank, V. Regulation and function of the NFE2 transcription factor in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 2323–2335 (2015).
152. Taguchi, K., Motohashi, H. & Yamamoto, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* **16**, 123–140 (2011).
153. Salerno, L. *et al.* Heme oxygenase-1: A new druggable target in the management of chronic and acute myeloid leukemia. *Eur. J. Med. Chem.* **142**, 163–178 (2017).
154. Pi, J. *et al.* Degradation : Role of Sequential Phosphorylation By. **42**, 1797–1806 (2007).
155. Itoh, K. *et al.* Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to Cells* **8**, 379–391 (2003).
156. Dringen, R., Pawlowski, P. G. & Hirrlinger, J. Peroxide detoxification by brain cells. *J. Neurosci. Res.* **79**, 157–165 (2005).
157. Hartley, T., Brumell, J. & Volchuk, A. Emerging roles for the ubiquitin-proteasome system and autophagy in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **296**, (2009).
158. Theodore, M. *et al.* Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **283**, 8984–8994 (2008).
159. Yagishita, Y. *et al.* Nrf2 protects pancreatic β -cellss from oxidative and nitrosative stress in

- diabetic model mice. *Diabetes* **63**, 605–618 (2014).
160. Uruno, A. *et al.* The Keap1-Nrf2 System Prevents Onset of Diabetes Mellitus. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2996–3010 (2013).
 161. Robles-Almazan, M. *et al.* Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res. Int.* **105**, 654–667 (2018).
 162. Gonçalves, I. *et al.* Direct association between diet and the stability of human atherosclerotic plaque. *Sci. Rep.* **5**, 1–7 (2015).
 163. Heilman, J. *et al.* Toxicological evaluation of an olive extract, H35: Subchronic toxicity in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **84**, 18–28 (2015).
 164. Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M. & Boskou, D. G. Biophenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3688–3692 (2002).
 165. Pérez-Bonilla, M., Salido, S., Van Beek, T. A. & Altarejos, J. Radical-scavenging compounds from olive tree (*Olea europaea* L.) wood. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 144–151 (2014).
 166. Covas, M. I., De La Torre, R. & Fitó, M. Virgin olive oil: A key food for cardiovascular risk protection. *Br. J. Nutr.* **113**, S19–S28 (2015).
 167. Charoenprasert, S. & Mitchell, A. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J. Agric. Food Chem.* **60**, 7081–7095 (2012).
 168. Rodríguez-Morató, J. *et al.* Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules* **20**, 4655–4680 (2015).
 169. Oliver, J. *OLIVE OIL Minor Constituents and Health. Journal of Chemical Information and Modeling* vol. 53 (2013).
 170. Romero, C. *et al.* Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 479–484 (2004).
 171. Di Tommaso, D., Calabrese, R. & Rotilio, D. Identification and quantitation of hydroxytyrosol in Italian wines. *HRC J. High Resolut. Chromatogr.* **21**, 549–553 (1998).
 172. Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B. & Cantos-Villar, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* **130**, 797–813 (2012).
 173. Peng, S., Zhang, B., Yao, J., Duan, D. & Fang, J. Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food Funct.* **6**, 2091–2100 (2015).
 174. Medina, E., De Castro, A., Romero, C. & Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4954–4961 (2006).
 175. Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P. & Ramirez-Tortosa, M. C. Hydroxytyrosol: From laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr. Rev.*

- 68**, 191–206 (2010).
176. Rubió, L. *et al.* Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites. *Food Chem.* **135**, 2922–2929 (2012).
177. Suárez, M. *et al.* Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. *Br. J. Nutr.* **106**, 1691–1701 (2011).
178. Miro-Casas, E. *et al.* Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin. Chem.* **49**, 945–952 (2003).
179. Roowi, S., Mullen, W., Edwards, C. A. & Crozier, A. Yoghurt impacts on the excretion of phenolic acids derived from colonic breakdown of orange juice flavanones in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 68–75 (2009).
180. Domínguez-Perles, R., Auñón, D., Ferreres, F. & Gil-Izquierdo, A. Physiological linkage of gender, bioavailable hydroxytyrosol derivatives, and their metabolites with systemic catecholamine metabolism. *Food Funct.* **8**, 4570–4581 (2017).
181. Serra, A. *et al.* Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 486–496 (2012).
182. De La Torre, R., Covas, M. I., Pujadas, M. A., Fitó, M. & Farré, M. Is dopamine behind the health benefits of red wine? *Eur. J. Nutr.* **45**, 307–310 (2006).
183. Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J. C., Leenen, R. & Katan, M. B. Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *J. Nutr.* **132**, 409–417 (2002).
184. Bai, C., Yan, X., Takenaka, M., Sekiya, K. & Nagata, T. Determination of Synthetic Hydroxytyrosol in Rat Plasma by GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3998–4001 (1998).
185. Domínguez-Perles, R., Auñón, D., Ferreres, F. & Gil-Izquierdo, A. Gender differences in plasma and urine metabolites from Sprague–Dawley rats after oral administration of normal and high doses of hydroxytyrosol, hydroxytyrosol acetate, and DOPAC. *Eur. J. Nutr.* **56**, 215–224 (2017).
186. Fernández-Ávila, C. *et al.* Fast determination of virgin olive oil phenolic metabolites in human high-density lipoproteins. *Biomed. Chromatogr.* **29**, 1035–1041 (2015).
187. Granados-Principal, S. *et al.* Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* **90**, 25–33 (2014).
188. Visioli, F. *et al.* Nutrient metabolism - research communication hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J. Nutr.* **133**, 2612–2615 (2003).
189. Rodríguez-Morató, J. *et al.* Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metab. Rev.* **48**, 218–236 (2016).
190. Chashmi, N. A., Emadi, S. & Khastar, H. Protective effects of hydroxytyrosol on gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 1427–1429 (2017).

191. Zwane, R. E., Parker, A., Kudanga, T., Davids, L. M. & Burton, S. G. Novel, biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11509–11517 (2012).
192. Li, J. *et al.* The protective effects of hydroxytyrosol against ortho-phenylphenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicol. Mech. Methods* **22**, 432–437 (2012).
193. Visioli, F., Bellomo, G. & Galli, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 60–64 (1998).
194. Zou, X. *et al.* Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: Activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 994–1006 (2012).
195. Konstantinidou, V., Covas, M. I., Sola, R. & Fitó, M. Up-to date knowledge on the in vivo transcriptomic effect of the Mediterranean diet in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 772–783 (2013).
196. Konstantinidou, V. *et al.* In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: A randomized controlled trial. *FASEB J.* **24**, 2546–2557 (2010).
197. Kobayashi, M. & Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* **46**, 113–140 (2006).
198. Suzuki, T., Motohashi, H. & Yamamoto, M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 340–346 (2013).
199. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76–86 (1999).
200. 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.* **279**, 198–210 (2014).
201. Press, P. Life Sciences, Vol. 53, pp. 961-967 Printed in the USA Pergamon Press. *Pharmacology* **53**, 961–967 (1993).
202. Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782–787 (2001).
203. Agbaje, I. M. *et al.* Insulin dependant diabetes mellitus: Implications for male reproductive function. *Hum. Reprod.* **22**, 1871–1877 (2007).
204. Sajadi, E. *et al.* Impaired spermatogenesis associated with changes in spatial arrangement of Sertoli and spermatogonial cells following induced diabetes. *J. Cell. Biochem.* **120**, 17312–17325 (2019).
205. Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M. & Bast, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* **585**, 325–337 (2008).

206. Nizamlioğlu, N. M. & Nas, S. Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler ; Yapıları ve Önemleri The Phenolic Compounds in Vegetables and Fruit ; Structures and Their Importance. *Elektronik* **2010**, 20–35 (2010).
207. Vural, H., Sabuncu, T., Oktay Arslan, S. & Aksoy, N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J. Pineal Res.* **31**, 193–198 (2001).
208. Ramalho-Santos, J., Amaral, S. & Oliveira, P. Diabetes and the Impairment of Reproductive Function: Possible Role of Mitochondria and Reactive Oxygen Species. *Curr. Diabetes Rev.* **4**, 46–54 (2008).
209. Shrilatha, B. & Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *Int. J. Androl.* **30**, 508–518 (2007).
210. Scarano, W. R., Messias, A. G., Oliva, S. U., Klinefelter, G. R. & Kempinas, W. G. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int. J. Androl.* **29**, 482–488 (2006).
211. Anderson, L. C. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. *Am. J. Physiol.* **245**, 431–437 (1983).
212. Green, A., Sjølie, A. K. & Eshøj, O. Trends in the epidemiology of IDDM during 1970–2020 in Fyn County, Denmark. *Diabetes Care* **19**, 801–806 (1996).
213. Bolaffi, J. L., Nagamatsu, S., Harris, J. & Grodsky, G. M. Protection by thymidine, an inhibitor of polyadenosine diphosphate ribosylation, of streptozotocin inhibition of insulin secretion. *Endocrinology* **120**, 2117–2122 (1987).
214. Nukatsuka, M., Yoshimura, Y., Nishida, M. & Kawada, J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic β cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J. Endocrinol.* **127**, 161–165 (1990).
215. Cameron, D. F., Murray, F. T. & Drylie, D. D. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat. Rec.* **213**, 53–62 (1985).
216. Chen, H. *et al.* Effect of glutathione redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress. *Mol. Cell. Endocrinol.* **323**, 147–154 (2010).
217. Liebert, M. A. & Jones, D. P. Clinical Measures of the Balance. **8**, (2006).
218. Jiang, Y. J. *et al.* Ability of alpha-lipoic acid to reverse the diabetic cystopathy in a rat model. *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 713–719 (2008).
219. Öntürk, H. & Özbek, H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Derg* **17**, 231–236 (2007).
220. Düzce Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi The Role of Free Radicals and the Effect of Antioxidants in Diabetes. *Diyabette Serbest Radikaller ve Antioksidanlar* **3**, 30–39 (2005).

221. Bjelakovic, G., Nikolova, D. & Gluud, C. Antioxidant supplements and mortality. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **17**, 40–44 (2014).
222. Hamden, K., Allouche, N., Damak, M. & Elfeki, A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem. Biol. Interact.* **180**, 421–432 (2009).
223. Scoditti, E. *et al.* Hydroxytyrosol modulates adipocyte gene and mirna expression under inflammatory condition. *Nutrients* **11**, 1–29 (2019).
224. Jemai, H., Feki, A. E. L. & Sayadi, S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 8798–8804 (2009).
225. Cai, L. *et al.* Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: Prevention by endothelin antagonism. *Urol. Res.* **28**, 342–347 (2000).
226. Sun, L., Luo, C. & Liu, J. Hydroxytyrosol induces apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation. *Food Funct.* **5**, 1909–1914 (2014).
227. Auñon-Calles, D., Canut, L. & Visioli, F. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 498–504 (2013).
228. Christian, M. S. *et al.* The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug Chem. Toxicol.* **27**, 309–330 (2004).
229. Lee, Y. Y. *et al.* Extra Virgin Olive Oil Reduced Polyunsaturated Fatty Acid and Cholesterol Oxidation in Rodent Liver: Is This Accounted for Hydroxytyrosol-Fatty Acid Conjugation? *Chem. Res. Toxicol.* **29**, 1689–1698 (2016).
230. Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M. & Crea, R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 903–915 (2006).
231. Babich, H. & Visioli, F. In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Farmaco* **58**, 403–407 (2003).
232. Auñon-Calles, D., Giordano, E., Bohnenberger, S. & Visioli, F. Hydroxytyrosol is not genotoxic in vitro. *Pharmacol. Res.* **74**, 87–93 (2013).
233. Heilman, J. *et al.* Toxicological evaluation of an olive extract, H35: Subchronic toxicity in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **84**, 18–28 (2015).
234. Kirkland, D., Edwards, J., Woehrle, T. & Beilstein, P. Investigations into the genotoxic potential of olive extracts. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **777**, 17–28 (2015).
235. Zhu, L. *et al.* Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 1089–1098 (2010).

236. Bayram, B. *et al.* A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuvenation Res.* **15**, 71–81 (2012).
237. Zrelli, H. *et al.* Hydroxytyrosol induces proliferation and cytoprotection against oxidative injury in vascular endothelial cells: Role of Nrf2 activation and HO-1 induction. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 4473–4482 (2011).
238. Liu, Z. *et al.* Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Neurochem.* **0**, (2007).



Dizin Kaynakları

Şekil 1. VP E. Di Fiore's Atlas of Histology With Functional Correlations. 12th ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2013. 477–501 p.

Şekil 2. Şakul BU. Tusem Anatomi. 2nd ed. Ankara: Tusem Tıbbi Yayıncılık; 2008. 200–204 p.

Şekil 3. VP E. Di Fiore's Atlas of Histology With Functional Correlations. 12th ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2013. 477–501 p.

Şekil 5. HOLT RIG, COCKRAM CS, FLYVBJERG A, GOLDSTEIN BJ. Textbook of Diabetes. 4th ed. Blackwell Publishing; 2010. 90 p.

Şekil 6. HOLT RIG, COCKRAM CS, FLYVBJERG A, GOLDSTEIN BJ. Textbook of Diabetes. 4th ed. Blackwell Publishing; 2010. 94 p.

Şekil 7. Dias TR, Alves MG, Silva BM, Oliveira PF. Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 2014;396(1–2):37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.08.005>

Şekil 8. Carmona-Aparicio L, Pérez-Cruz C, Zavala-Tecuapetla C, Granados-Rojas L, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, et al. Overview of Nrf2 as therapeutic target in epilepsy. Int J Mol Sci. 2015;16(8):18348–67.

Şekil 9. Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, et al. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. Food Res Int. 2018;105(November 2017):654–67.

7. EKLER

7.1. EK-1

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
ETİK KURUL BAŞVURU KARARI

Prof. Dr. Meryem ÇAM tarafından kurulumuza sunulan "Sığırcılarda Streptozotosin ile İndüklenen Diabetes Mellitusun Sebep Olduğu Testiküler Oksidatif Hasara Karşı Hidroksitirozolün Koruyucu Rolünün Araştırılması " isimli araştırma başvuru projesi etik yönden değerlendirilmiş olup; yönergemiz ilkelerine göre proje etiği açısından "UYGUN OLDUĞUNA" oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Toplantı Tarihi: 07/11/2018	Karar No: 2018/5/2	
UNVAN, ADI, SOYADI, GÖREVİ	KARAR	İMZA
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA Başkan	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Murat KABAKLIOĞLU Başkan Vekili		Toplantıya katılmamıştır.
Ali GÖK Veteriner	UYGUNDUR	
Prof. Dr. Şerif DEMİR Üye	UYGUNDUR	
Doç. Dr. Şengül CANGÜR Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Akif KETEN Üye		Toplantıya katılmamıştır.
Dr. Öğr. Üyesi Meral KEKEÇOĞLU Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÖÇ RASGELE Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Emel ÇALIŞKAN Üye		Toplantıya katılmamıştır.
İzzet GÜÇLÜ Üye	UYGUNDUR	
Merve UĞUR Üye	UYGUNDUR	

Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu
Düzce Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi,
Konuralp Yerleşkesi, Merkez, 81620, Düzce.
0380 5421416 – Dahili: 4171 Faks: 0380 5421302

ÖZGEÇMİŞ

24.01.1993 yılında Esslingen/F.Almanya’da doğdum. Ahmet Baldöktü İlköğretim okulunu bitirdikten sonra lise eğitimimi Ahmet Erdem Anadolu Ticaret Meslek Lisesi’nde tamamladım. 2011 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2012 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Bakteriyoloji Bölümünde, 2013 yılında Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarında, 2014 yılında Kayseri Kadın Doğum Hastanesi Laboratuvarında staj yaptım. 2015 yılında Biyoloji bölümünden bölüm ikincisi olarak mezun oldum. 2017 yılında Düzce Üniversitesi’nde Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji -Embriyoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.