DÜZCE ÜNİVERSİTESİ | LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

STZ İLE İNDÜKLENMİŞ TİP 1 DİYABET SIÇANLARDA HİDROKSİTİROZOL'ÜN TESTİKÜLER TSSK6 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

EDA NUR ALMALI

YÜKSEK LİSANS
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi HAKAN SOYLU

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

STZ İLE İNDÜKLENMİŞ TİP 1 DİYABET SIÇANLARDA HİDROKSİTİROZOL'ÜN TESTİKÜLER TSSK6 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Eda Nur ALMALI tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU
Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri
Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU
Düzce Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR
Düzce Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZBEY ÜNLÜ
Akdeniz Üniversitesi
_____

Tez Savunma Tarihi: 22/06/2023

BEYAN

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

22 Haziran 2023

Eda Nur ALMALI

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji bölümünde almış olduğum Yüksek Lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini paylaşan, sorduğum her soruda zaman ayırıp ilgilenen ve tez çalışmasının yapılmasında ve yürütülmesinde desteğini hiç esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU'ya; eğitim ve tez sürecinin her aşamasında desteği, yönlendirmeleri ve bilgi paylaşımları ile bana katkıda bulunan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan Karaçor'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans eğitim süresi boyunca zorlandığım her anımda bana yardımcı olan, tez çalışmam süresince yardımlarını ve desteklerini hiç esirgemeyen, hayatımda önemli bir yer tutan bölüm arkadaşlarımDr. Nagehan Ulaş ve Dr. Damla Irmak'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda desteklerini ve sonsuz sevgilerini esirgemeyen, her zaman arkamda duran canım babamSalih ALMALI ve canım annem Emine ALMALI'ya, eğitim süresince desteklerini her zaman hissettiren canım kardeşlerim Sedanur ALMALI, Hamza ALMALI ve Rümeysa ALMALI'ya çok teşekkür ederim.

Deney hayvanı uygulamalarındaki katkılarından dolayı Defne Rana OĞUZ ve Nur Hilal ELCİYAR'a teşekkür ederim.

22 Haziran 2023 **Eda Nur ALMALI**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ vii
ÇİZELGE LİSTESİ viii
KISALTMALAR ix
SİMGELER x
ÖZET xi
ABSTRACT xii
1. GİRİŞ 1
2. MATERYAL VE YÖNTEM 3
2.1. DENEY HAYVANLARI 3
2.2. DENEY GRUPLARI 3
2.3. STREPTOZOTOSİN 4
2.4. DİYABET MODELİ 5
2.5. HİDROKSİTİROZOLÜN HAZIRLANMASI 5
2.6. BOUİN FİKSATİFİNİN HAZIRLANMASI 5
2.7. İNTRAPERİTONEAL ENJEKSİYON UYGULAMASI 5
2.8. IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEMELER 6
2.9. HEMATOKSİLEN & EOZİN BOYAMASI 6
2.10. GOMORİ TRİKROM BOYAMASI 7
2.11. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA 7
2.12. İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARININ İMAGEJ PROGRAMI İLE ANALİZİ 8
2.13. WESTERN BLOT YÖNTEMİ 9
2.14. İSTATİKSEL ANALİZ 13
3. GENEL BİLGİLER 14
3.1. TESTİSİN ANATOMİSİ 14
3.2. TESTİS FİZYOLOJİSİ 15
3.3. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ 16
3.4. TESTİS HİSTOLOJİSİ 18
3.4.1. Sertoli Hücreleri 22
3.4.2. Spermatogenik Seri Hücreler 23
3.4.2.1. Spermatogenez *23*
3.4.2.2. Spermiyogenez *24*
3.5. İNTRATESTİKÜLER KANALLAR 27
3.6. DİABETES MELLİTUS 28
3.7. DİABETES MELLİTUS İLE TESTİS İLİŞKİSİ 30
3.8. HİDROKSİTİROZOL 31
3.9. DİABETES MELLİTUS İLE HİDROKSİTİROZOL İLİŞKİSİ 32
3.10. TSSK6 33
3.11. TSSK6 İLE TESTİS İLİŞKİSİ 34

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 35
4.1. BULGULAR 35
4.1.1. Kan Glukoz Ölçüm Bulguları 35
4.1.2. Histopatolojik Bulgular 36
4.1.3. İmmünohistokimyasal Bulgular 38
4.1.4. Western Blot Bulguları 41
4.2. TARTIŞMA 42
5. SONUÇ 46
6. KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 58

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Testis anatomik yapısı [17]..... 14
Şekil 3.2. A: 3 haftalık embriyoda yolk kesesinin allontaise yakın yerde bulunan primordial germ hücreleri. B: Primordial germ hücrelerinin genital kabartıya doğru göçü [22]. 17
Şekil 3.3. Erkek üreme sistemini gösteren çizim [17]. 19
Şekil 3.4. Testisin histolojik katmanları [17]..... 21
Şekil 3.5. Seminifer tübülün bir parçasını gösteren şematik çizim. Seminifer epitel spermatogenik seri hücreleri ve setoli hücreleri olmak üzere iki farklı hücre tipinden oluşur [17]. 24
Şekil 3.6. Germ hücrelerinin klonal özelliğini gösteren çizim [17]..... 27
Şekil 3.7. Hidroksitirozolün kimyasal yapısı [89]. 32
Şekil 4.1. Grupların deney süresince kan-glukoz seviyeleri. Deney sonucunda kan-glukoz seviyelerinin analizi karşılaştırıldığında; Kontrol ile HT grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0.05$). STZ ile STZ+HT grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0.05$). STZ grubu, Kontrol ve HT grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0.05$). (a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı, b ise STZ'ye göre anlamlılığı gösterir.)..... 35
Şekil 4.2. Farklı grupların testis dokusunun hematoksilen&eozin boyaması temsili fotoğrafları. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. Yeşil ok; spermatogonyum hücresi, kırmızı ok; sertoli hücresi, siyah ok; primer spermatosit, pembe ok; erken spermatid ve mavi ok; geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir. 37
Şekil 4.3. Farklı grupların testis dokusunun gomori trikrom boyaması temsili fotoğrafları. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. Yeşil ok; spermatogonyum hücresi, kırmızı ok; sertoli hücresi, siyah ok; primer spermatosit, pembe ok; erken spermatid,ve mavi ok; geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir. 38
Şekil 4.4.Farklı gruplardaki Tssk6 immunohistokimyasal boyamasının temsili fotoğrafları. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. Yeşil ok; spermatogonyum hücresi, kırmızı ok; sertoli hücresi, Siyah ok; primer spermatosit, pembe ok; erken spermatid, ve mavi ok; geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir. 40
Şekil 4.5. Testis dokusunda Tssk6 proteinin immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği.a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı,b ise STZ'ye göre anlamlılığı gösterir. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. 41
Şekil 4.6. Tssk6 protein seviyesinin Western blot analizi. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı gösterir. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin..... 42

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Diyabetik rat modeli, deney grupları, maddeler ve veriliş yolları. 4
Çizelge 2.2. Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar. 12

KISALTMALAR

Ad	Tip A koyu spermatogonium
AMH	Anti Müllerian Hormon
AMPK	Adenozin monofosfatla aktive olan protein kinaz
Ap	Tip A açık spermatogonium
APS	Amonyum Persülfat
dH_2O	Distile su
DAB	Di-Amino-Benzidin
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DÜDAM	Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GDM	Gestasyonel Diabetes Mellitus
GnRH	Gonadotropin Salıcı Hormon
H1	Bağlayıcı Histon Proteini H1
H2A	Bağlayıcı Histon Proteini H2A
H2AX	Bağlayıcı Histon Proteini H2AX
H3	Bağlayıcı Histon Proteini H3
hCG	İnsan Koryonik Gonodotropin
HPT	Hipotalamus-Hipofiz Testis
HT	Hidroksitirozol
İp	İntroperitoneal
kDa	Kilodalton
LH	Luteinizan Hormon
MD	Akdeniz Diyeti
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PIK	Proteaz İnhibitör Kokteyli
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
S	Standart
SDS	Dodecylsulfate-Na-Salt
SRY	Cinsiyet Belirleyici Faktör
STZ	Streptozotosin
T1DM	Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
TBS	Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
TBS-T	Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi Tween 20
TDF	Testis Belirleyici Faktör
Tssk	Testis Spesifik Serin Kinaz
Tssk6	Testis Spesifik Serin Kinaz 6

SİMGELER

cm	Santimetre
dL	Desilitre
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidrojen Klorür
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	nanogram
p	anlamlılık
XY	Erkek cinsiyet Kromozomları
℃	Derece
%	Yüzde
µm	Mikrometre
α	Alfa
ϒ	Gamma

ÖZET

STZ İLE İNDÜKLENMİŞ TİP 1 DİYABET SIÇANLARDA HİDROKSİTİROZOL'ÜN TESTİKÜLER TSSK6 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Eda Nur ALMALI
Düzce Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU
Haziran 2023, 57 sayfa

Diabetes mellitus, spermatogenezin endokrin kontrolünü, üremeyi ve ejakülasyonu etkileyerek erkek fertilitesini etkileyen önemli bir metabolik hastalıktır. Biz bu çalışmada testiküler hasarı önleyici etkinliği bilinen polifenolik bir bileşik olan hidroksitrozolün, spermatogenezde ve erkek fertilitesinde önemli rol alan Tssk6 proteini ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. Çalışmada kullanılan ratlar kontrol, hidroksitirozol, streptozotosin ve streptozotosin+hidroksitirozol olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Çalışmada streptozotosin tek doz 55 mg/kg ve hidroksitirozol 30 gün 10 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Çalışmada kan glukoz değerleri rutin olarak ölçüldü ve çalışma sonu alınan dokularda histopatolojik inceleme, Tssk6 proteini immunohistokimyası ve Western blot yöntemleri uygulandı. Streptozotosin ve streptozotosin+hidroksitirozol grupları kan glukoz seviyeleri kontrol ve hidroksitirozol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde arttı. Streptozotosin+hidroksitirozol grubunda ise kan glukoz değerleri streptozotosin grubuna göre anlamlı şekilde azaldı. Histolojik incelemelerde, streptozotosin grubunda gözlenen morfolojik bozulmaların, streptozotosin+hidroksitirozol grubunda düzeldiği gözlendi. Streptozotosin ve streptozotosin+hidroksitirozol gruplarının Tssk6 ekspresyonu kontrol ve hidroksitirozol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde azaldı. Streptozotosin grubunda azalan Tssk6 protein ekspresyonunun streptozotosin+hidroksitirozol grubunda istatiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını gözlemledik. Hidroksitirozol'ün, tip 1 diyabet modelinde artmış kan glukoz seviyesini düşürdüğünü, testiste oluşan hasarı azaltıcı etki gösterdiğini ve spermatogenezin tamamlanabilmesi ve sperm hareketliliği için önemli olan Tssk6 ekspresyonunu arttırdığını belirledik. Sonuç olarak akdeniz diyetinin en önemli parçası olan zeytin ve zeytinyağında bol bulunan hidroksitirozol, diyabet hastalarında kan glukoz seviyesini düzenleyerek ve erkek fertilitesinde önemli rol alan Tssk6 ekspresyonunu artırarak diyabete bağlı infertiliteyi azaltabilir.

Anahtar Sözcükler: Diabetes mellitus, Hidroksitirozol, Streptozotosin, Testis, Tssk6.

ABSTRACT

INVESTİGATİON OF THE EFFECT OF HYDROXYTYROSOL ON TESTİCULAR TSSK6 EXPRESSİON İN STZ-İNDUCED TYPE 1 DİABETES RATS

Eda Nur ALMALI
Düzce University
Graduate School, Department of Histology and Embriyology
Master Thesis
Supervisor: Dr. Hakan SOYLU
June 2023, 57 pages

Diabetes mellitus is an important metabolic disease that affects male fertility by affecting endocrine control of spermatogenesis, reproduction and ejaculation. In this study, we investigated the effect of hydroxytyrosol, a polyphenolic compound known to prevent testicular damage, on the expression of Tssk6 protein, which plays an important role in spermatogenesis and male fertility. The rats used in the study were divided into 4 groups as control, hydroxytyrosol, streptozotocin and streptozotocin hydroxytyrosol. In the study, streptozotocin was administered as a single dose of 55 mg/kg and hydroxytyrosol was administered intraperitoneally at a dose of 10 mg/kg for 30 days. In the study, blood glucose values were measured routinely and histopathological examination, Tssk6 protein immunohistochemistry and Western blot methods were applied in the tissues taken at the end of the study. Blood glucose levels of streptozotocin and streptozotocin+hydroxytyrosol groups increased significantly compared to control and hydroxytyrosol groups. In the streptozotocin + hydroxytyrosol group, blood glucose levels were significantly decreased compared to the streptozotocin group. In histological examinations, it was observed that the morphological deteriorations observed in the streptozotocin group were improved in the streptozotocin+hydroxytyrosol group. Tssk6 expression was significantly decreased in streptozotocin and streptozotocin+hydroxytyrosol groups compared to control and hydroxytyrosol groups. We observed that Tssk6 protein expression, which was decreased in the streptozotocin group, increased statistically significantly in the streptozotocin+hydroxytyrosol group. We determined that hydroxytyrosol lowers the increased blood glucose level in the type 1 diabetes model, reduces the damage to the testis, and increases the expression of Tssk6, which is important for the completion of spermatogenesis and sperm motility. As a result, hydroxytyrosol, which is abundant in olive and olive oil, which is the most important part of the Mediterranean diet, can reduce diabetes-related infertility by diabetic patients regulating blood glucose levels and increasing Tssk6 expression, which plays an important role in male fertility.

Keywords: Diabetes mellitus, Hydroxytyrosol, Streptozotocin, Testis, Tssk6.

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), dünya nüfusunu etkileyen, dünya genelinde oldukça yaygın olan insülinin eksikliğine veya yokluğuna bağlı olarak gelişen metabolik bir hastalıktır [1, 2]. Bu hastalık yaş, cinsiyet ve ırk ile ilişkisi olmayan ciddi bir sağlık sorunudur [3]. DM, sinsi ve kronik seyretmesi nedeniyle yaşam kalitesini büyük oranda düşürmektedir. Bu hastalığın etkilediği önemli sistemlerden biri de erkek genital sistemdir ve en önemli komplikasyonlarından biri spermatogenik fonksiyon bozukluğudur [4]. Morfolojik olarak farklılaşmış spermatogonyumların spermlere dönüşme sürecine spermatogenez denilmektedir [5]. Spermatogenezde meydana gelen bozukluk, azospermi veya oligozoospermiye yol açarak erkeklerde infertiliteye neden olmaktadır [6]. Artan diyabet insidansı, üreme çağındaki erkeklerde özellikle de genç ve orta yaşlı erkeklerde infertilite prevalansının artmasına yol açmaktadır [4]. Diyabet hastası erkeklerdeki infertilitenin belirtileri; testis yapısının bozulması, testosteron seviyelerinin azalması, anormal spermatogenez, sertoli hücrelerinde glukoz metabolizma seviyesinin düşmesi, sperm sayısının azalması, bozulmuş hipotalamus-hipofiz-testis ekseni ve sperm hareketliliğindeki değişikliklerdir [7]. Zeytin ve zeytinyağında bulunan hidroksitirozol, oleuropeinin hidrolizinden elde edilir. Hidroksitirozol en aktif biyolojik ekstrat ve polifenolik antioksidan bir bileşiktir [8, 9]. Hidroksitirozolün hem *in vivo* hem de *in vitro*'da serbest radikalleri temizleme, lipid peroksidasyonunu önleme gibi etkili antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikler gösterdiği bildirilmiştir [10, 11]. Ayrıca hidroksitirozolün, diyabete bağlı testislerde meydana gelen spermatogenik fonksiyon hasarını azalttığı ve bu hasara karşı koruyucu olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [8]. Serin kinaz protein ailesinin en küçük üyesi olan testis-spesifik serin kinaz 6 (Tssk6), testis dokusuna aittir [12]. Tssk6, spermatogenez sırasında düzenlenir ve üremede önemli bir rol oynar [5]. Tssk6, spermatidlerde ekspresyon gösterir [6]. Daha önce yapılan tüm çalışmalar tarandığında DM'de testiküler hasarı önleyici bir rol alan hidroksitrozol'ün, spermatit ve spermlerde varlığı bilinen ve sperm fertilitesi için önemli olan Tssk6 proteini ekspresyonu üzerine etkisi bilinmemektedir.

Bu çalışma ile streptozotosin ile indüklenmiş tip 1 diyabet modelinde, diyabetin neden olduğu testiküler hasarı azalttığı bilinen hidroksitirozolün normal sperm yapısı ve

fertilitesi için önemli olan Tssk6 proteinin immünohistokimyasal ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

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.

2.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DÜDAM) temin edildi ve 22-25 ºC oda ısısında, 60± 5% nem ve 12:12 aydınlık/karanlık döngüsünde optimal değerlerde tutulan bir ortamda özel olarak hazırlanmış kafeslerdeher gün altları temizlenerek deney süresi boyunca bakıldı. Hayvanlar ad libitum olarak kafeslerin üst bölmelerinde bulunan yerlere yemleri yerleştirilerek beslendi. Su ise günlük olarak çelik kapaklı cam biberonlarda verildi. Çalışmada 36 adet 2 - 3 aylık ve 230±30 gr ağırlığında sağlıklı erkek Wistarratlar kullanıldı.

2.2. DENEY GRUPLARI

Çalışmada 36 adet rat kullanıldı. Deneye başlamadan önce ratların kan glukoz değerleri ölçüldü ve normal değerlere sahip hayvanlar çalışmaya dahil edildi. Ratlar, birinci günde tartımları yapılarak ağırlıkları belirlendi ve deney grupları 4 gruba ayrıldı; grup 1;kontrol grubu (n=9), grup 2; hidroksitirozol kontrol grubu (HT) (n=9), grup 3;streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik grup (STZ) (n=9), grup 4; streptozotosin ile diyabet oluşturulan ve hidroksitirozol ile tedavi edilen grup (STZ+HT) (n=9) (Çizelge2.1).Streptozotosin (STZ) (Sigma Aldrich, #18883-66-4), steril distile su içerisinde eritilerek tek doz 55 mg/kg intraperitoneal (ip) olarak Grup 3 ve 4'ü oluşturan sıçanlara STZ enjeksiyonu yapıldı. STZ deneysel diyabetik oluştumak için kullanıldı. Enjeksiyonundan 48 saat sonra, ratların kuyruk ucundan lansetle kan örneği alınarak diyabet olup olmadıkları hızlı kan glukoz ölçüm cihazı ile belirlendi. Kan glukoz değerleri 250 mg/dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Böylece diyabetik olan grup 4'e 30 gün süreyle günde bir kez hidroksitirozol (HT) 10 mg/kg

dozunda intraperitoneal (ip) enjeksiyon yoluyla verildi (Çizelge 2.1). 30 günün sonunda, tüm gruplardaki sıçanlar tartıldı ve açlık şekerleri ölçüldü. Yapılan ölçümler sonrasındaketamin (90 mg/kg) ile birlikte xylazine (10 mg/kg) ip uygulama ile hayvanlar anestezi altına alındı. Anestezi altında olan hayvanlar servikal dislokasyon ile ötenazi edilerek deney bitirildi. Ardından sıçanların testis dokuları hızla çıkarıldı ve yarısı histolojik çalışma yapabilmek için 24 saat süreyle bouin solüsyonunda tespit edildi. Diğer yarısı ise Western blot için -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Çizelge 2.1. Diyabetik rat modeli, deney grupları, maddeler ve veriliş yolları.

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

2.3. STREPTOZOTOSİN

Streptozotosinin (STZ), 1963 yılında Streptomyces achromogens bakterisi tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir. STZ, antibiyotik, antitümör, diyabetojenik ve antineoplastik özellikler sergileyen kimyasal bir bileşiktir [13, 14]. Deney hayvanlarında diyabeti indüklemek için streptozotosin kullanılır [15]. Fakat ≥40 mg/kg konsantrasyonlarda uygulandığında etkili olduğu bildirilmiştir [13, 16].

2.4. DİYABET MODELİ

Streptozotosin (STZ) (Sigma Aldrich, Cat#18883-66-4) deneysel diyabet oluşturmak amacıyla kullanıldı. Ratlar STZ enjeksiyonundan 12 saat önceaç bırakılarak tartıldılar. Sonraki gün ratların kuyruk ucu lansetle delindi ve açlık kan glukoz değerleriAccu-Chek Nano Performacihazı ile ölçüldü. Sonra sıçanların vücut ağırlığına göre STZ çözelti miktarı hesaplanarakSTZ steril distile su (dH_2O) içinde çözülerek hazırlandı. Tek doz 55 mg/kg STZ ip olarak uygulandı. Enjeksiyondan 48 saat sonra tekrardan sıçanların kan glukoz değerleri ölçüldü ve diyabet tayini yapıldı. Eğer ki kan glukoz değeri 250 mg/ dl ve üzeri ise ratlar diyabetik olarak kabul edildi.

2.5. HİDROKSİTİROZOLÜN HAZIRLANMASI

Hidroksitirozol (HT) (Cayman, Cat#70604), 1 gram stok hidroksitirozol steril distile suda çözüldü. Hayvanlara 30 gün boyunca 10 mg/kg dozunda hergün saat 10:00 ile 12:00 arasında ip olarak verildi.

2.6. BOUİN FİKSATİFİNİN HAZIRLANMASI

Testis dokularının tespiti için Bouin solüsyonu kullanıldı. 12.2 gram tartılan pikrik asit, 1 litre distile su içinde çözdürüldü. Bouin solüsyonu; 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi üzerine 25 ml % 37'lik formaldehit eklenerek iyice karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonra bu karışımın üzerine 1 ml glasiyal asetik asit eklendi ve tekrar karıştırılarak solüsyon elde edildi.

2.7. İNTRAPERİTONEAL ENJEKSİYON UYGULAMASI

Uygun şekilde tutulan sıçanların karın bölgesinin sağ veya sol alt bölgelerine insülin enjektörü ile 45 derecelik bir açıyla deri altında birazcık ilerledikten sonra hafif bir itme hareketi uygulayarak karın kasları geçildi. Bu işlem sırasında hiçbir organa zarar verilmeyerek enjektör ucu hafifçe yukarı kaldırıldı. Sonradaenjeksiyon gerçekleştirildi.

2.8. IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEMELER

Dokular 24 saat boyunca bouin solüsyonunda fikse edildi. Fikse edildikten sonra 3 saat boyunca normal çeşme suyunda yıkandı. Dokular düşük dereceli etil alkolden yüksek dereceli etil alkole geçirildi. Bunun için ilk olarak 15 dakika % 70'lik etil alkolde bekletilerek dehidratasyon başlatıldı.15 dakika % 80'lik etil alkolde bekletildi. 2 defa30 dakika % 90'lik etil alkolde bekletildi. 2 defa 30 dakika % 96'lik etil alkolde bekletildi. 45 dakika % 96'lik etil alkolde bekletilerek dehidratasyon sona erdi. Dokuların sertleşmesi için 45 dakika asetonda (Iso Lab, #901.023.25.01) bekletildi. Şeffaflaştırma yapmak için 10 dakika ilk Ksilen'de (Iso Lab, #990.019.2501) bekletildi. 20 dakika Ksilen 2'de bekletildi. Gömme işlemini gerçekleştirebilmek için 75°C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika parafin 1'de 30 dakika da parafin 2'de bekletildi. Takip edilen dokular metal gömme kapları içinde parafine gömülürler. Etiketlenen bloklardan mikrotom cihazı ile 4 µm kalınlığında kesitler alınarak su banyosunda düzleştirildi. Sonra gerekli olan lamlara alındı ve hematoksilen&eozin (HE), gomori trikrom veTssk6 antikoru boyamaları yapıldı.

2.9. HEMATOKSİLEN & EOZİN BOYAMASI

Kesitler, doku dışında bulunan parafinlerini bırakması için 75° C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika boyunca bekletildi.Etüvden çıkan kesitler, 15'er dakika ksilen 1 ve ksilen 2'de bekletildi.Herbirinde 10 dip olmak kaydıyla % 96, % 80 ve % 70etil alkole daldırılan dokular akan suda yıkanarak dokunun suyu tekrar geri verildi. Nükleusların boyanması için 3 dakika hematoksilende bekletildi. Sonrasında akan suda yıkandı. Çok hızlı bir şekilde 2 defa asit alkole daldırıldıktan sonra akan suda yıkandı. Dokular hızlı bir şekilde 2 defa amonyaklı suya daldırıldı.Tekrardan akan suda yıkandı.10 dip % 70'lik etil alkole daldırıldı.Sitoplazmanın boyanması için 40 saniye alkolde çözülmüş eozinde bekletildi. Ardından akan suda yıkandı.10'ardip % 70, % 80 ve % 96'lik etil alkole daldırıldı.10 dakika ksilende bekletildikten sonra 2 dakika 75° C sıcaklıktaki etüvde bekletildi velamlar entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

2.10. GOMORİ TRİKROM BOYAMASI

Parafin kesitler 75°C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika bekletildi.20 dakika ksilende deparafinize edilen kesitlerherbirinde 10 dip olmak kaydıyla % 96,% 80 ve % 70'lik etil alkolden geçirildi.Normal çeşme suyunda yıkandı.Bouin solüsyonunda 75°C sıcaklıktaki etüvde 35 dakika bekletildi.3 ayrı kapta bol su ile yıkandı.Hematoksilen'de 2 dakika bekletildi.Tekrardan 3 ayrı kapta bol su ile yıkandı.Trikrom solüsyonunda 25 dakika bekletildi.% 0.5'lik asetik asitle diferansiye edildi ve akabinde normal çeşme suyunda yıkandı.% 70'lik, % 80'lik ve % 96'lik etil alkole 10'ar defa daldırıldı.Ksilende 10 dakika bekletildikten sonra 2 dakika 75° C sıcaklıktaki etüvde bekletilerek kurutuldu.Lamlar entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

2.11. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)

2,85 gram di sodyum hidrojen fosfat (Carlo Erba, #480141), 16 gram sodyum klorür (Iso Lab, #969.036.1000) ve 0,8 gram potasyum dihidrofosfat (Iso Lab, #960.066.1000) 2 litre distile su (dH_2O)içine eklenerek çözdürüldü. Daha sonra pH değerine bakıldı. pH 7.2 ile 7.4 arasında olmalıdır.

Sitrat Tamponu

2,10 gram sitrik asit (Iso Lab, #910.046.1000) 900 ml distile su (dH_2O) içine atılarak çözdürüldü. Daha sonra pH değerine bakıldı. Genellikle pH değeri 2.80 çıkan sitrat tamponu NaOH ile pH 6'ya ayarlandı.

%3 H_2O_2 Hazırlanması

63 ml methanol (Carlo Erba, #412722) üzerine 7 ml %35 hidrojen peroksit (H_2O_2) (Iso Lab, #932.122.2500)eklendi.

DAB Hazırlama

1500 µl DAB substrat'a 30µl DAB kromojen eklenmesi ile hazırlandı.

Tüm grupların parafin bloklarından immün lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı.Parafin kesitler 75° C'deki etüvde 40 dakika bekletildi. Etüvden sonra deparafinizasyon için ksilen 1'de 10 dakika, ksilen 2'de 5 dakika bekletildi.Daha sonra kesitler herbirinde 5 dakika olmak kaydıyla % 100, % 90, % 80,% 70'lik etil alkol

serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Kesitler distile suda (dH_2O) 5 dakika bekletildi.Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 0.01 M sitrat tamponuna (pH:6.0) konularak mikrodalga fırında 8 dakika 750 Watt'ta kaynatıldı ve sonra 20 dakika boyunca oda ısısında soğumaya bırakıldı.Fosfat tamponlu tuz (PBS) (pH: 7.2 - 7.4) çözeltisinde 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı.Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler % 3' lük H_2O_2 ile 15 dakika inkübe edildi.3 kez 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı.Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle (Pap-pen) çizildi.Kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin G (IgG) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu ile 7 dakika muamele edildi.Kesitlere, Tssk6(Bioss, #bs-9734R) (1:500)primer antikorudamlatıldı.Kesitler nem kutusunda +4° C'de gece boyu inkübe edildi.İkinci gün kesitler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Daha sonra, 1 saat biyotinlenmiş sekonder antikor ile oda ısısında nemli ortamda inkube edildi.3 kez 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı.Sonrasında 20 dakika HRP-konjuge streptavidin kompleksi ile oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi.PBS ile 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı. Görüntüyü geliştirmek için dokular 4 dakika di-amino-benzidin (DAB) (ScyTek, #ACK125) kromojeni ile muamele edildi ve distile suda yıkandı. Kesitlere Mayer's hematoksilen (ScyTek, #800-729-8350) ile 1 dakika zıt boyama yapıldı. Normal çeşme suyunda yıkanan kesitler herbirinde 10 dip olmak kaydıyla% 70,% 80, % 90'lık etil alkol serilerinden geçirildi. % 100'luk alkolde 4 dakika bekletilerek dehidrate edildi.Çıkış ksileni 1 veksilen 2'de 5'er dakika bekletilerekentellan kapatma solüsyonu ile lamlar kapatıldı.

2.12. İMMÜNOHİSTOKİMYA SONUÇLARININ İMAGEJ PROGRAMI İLE ANALİZİ

Olympus BX50 mikroskobu ile Zeiss Axiocam ICc5 kamera kullanılarak kontrol, HT, STZ ve STZ+HT hücre yapılarının fotoğrafları çekildi ve İmageJ programı kullanılarak immünohistokimyasal boyama yoğunlukları değerlendirildi. Kontrol, HT, STZ ve STZ+HT gruplarından her kesitten 10 fotoğraf alınarak değerlendirmeye dahil edildi. Öncelikle boyanan alanın tamamı (hematoksilen + DAB) seçilecek şekilde ayarlandı. Ardından, hücrenin boyanma yoğunluğunu seçmek için yalnızca DAP-pozitif alanlar seçildi. Boyanma yoğunluğu, DAB-pozitif alanın yoğunluğunun, toplam boyanma yoğunluğuna bölünmesi ve çıkan sonucun 100 ile çarpımı yoluyla belirlendi. Sonuç olarak, ortalama yoğunluk yüzde olarak 0-100 aralığında ifade edildi.

2.13. WESTERN BLOT YÖNTEMİ

0.1 M Tris

0.6 gram Tris (Serva, #37190.02) 40 ml distile su (dH_2O) içerisinde çözdürüldü. HCl ile pH 7.4'e ayarlandı. Daha sonra dilüsyon distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Tris Buffer

10ml 0.1 M Tris (pH 7.4), 1ml Na-orthovanadate, 1gr SDS 90 ml distile su (dH_2O) içerisinde çözdürüldü.

%30 Akrilamid – Bisakrilamid Solüsyonu

15,4 gram Akrilamid-bisakrilamid (Bio Basic, #A800011-0500) 40 ml distile su (dH_2O) içine atılarak çözdürüldü. Daha sonra ependorf tüpünün etrafı alüminyum folyo kaplanarak +4°C'de saklandı.

4x Tris – HCL /SDS (pH=8.8) Hazırlanışı

9 gram Tris 20 ml distile su (dH_2O) içerisinde çözdürüldü.Daha sonra pH değerine bakıldı. Genellikle pH değeri 10.30 çıkan solüsyonunun pH'sı HCl (Merck, #1.00314) ile 8.8 olarak ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra çözelti distile su (dH_2O) ile 50 ml'ye tamamlanarak üzerine 0,2 gram Na-dodesilsülfat (SDS) (Serva, #20765.01) eklendi.

4x Tris – HCL /SDS (pH=6.8) Hazırlanışı

3,025 gram Tris 20 ml distile su (dH_2O) içerisinde çözdürüldü.Daha sonra pH değerine bakıldı. Genellikle pH değeri 11.20 çıkan solüsyonu HCl ile pH 6.8 olarak ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra çözelti distile su (dH_2O) ile 50 ml'ye tamamlanarak üzerine 0,2 gram SDS eklendi.

%10'luk APS

0,1 gram Amonyum-persülfat (APS) (Serva, #13375.05) 1 ml distile su (dH_2O) içine atılarak çözdürüldü. Daha sonra ependorf tüpünün etrafı alüminyum folyo ile sarıldı.

Ayrıştırıcı Jel

Belirlenen jelin miktarları doğrultusunda epondorf tüpün içerisine sırasıyla %30 Akrilamid/Bisakrilamid, 4x Tris-Cl/SDS (pH:8,8), H_2O, %10'luk APS ve Temed (Bio-Rad, #161-0801) eklenerek hazırlandı.

Toplayıcı Jel

Belirlenen jelin miktarları doğrultusunda epondorf tüpün içerisine sırasıyla %30 Akrilamid/Bisakrilamid, 4x Tris-Cl/SDS (pH:6,8), H_2O eklenir ve 15 dakika oda ısısında bekletilir. Daha sonra %10'luk APS ve Temed eklenerek hazır hale geldi.

10x TBS Stok Hazırlama

60,55 gram Tris ve 87,66 gram Sodyum Klorür (NaCl) (Iso Lab, #969.036.1000) 800ml distile su (dH_2O) içerisine atılarak çözdürüldü. Solüsyonun pH değeri 10.84 çıktı. Daha sonra HCl ile pH değeri 7.4 olarak ayarlandı.

TBS –T Hazırlama

900 ml distile su (dH_2O) içerisine 100 ml 10x TBS stok eklendi. Daha sonra 1 ml tween 20 (Sigma, #P1379) koyularak karıştırıldı ve homojen hale getirildi.

%5'lik Süt Tozu Hazırlama

2,5 gram süt tozu 50 ml TBS-T içerisinde çözdürüldü.

Blotlama Solüsyonu Hazırlama

3 gram tris ve 14,3 gram glisin (Serva, #23390.04) 750 ml distile su (dH_2O) içinde çözdürüldü. Çözdürüldükten sonra 200ml metanol eklenerek distile su (dH_2O) ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Developer Solüsyonu Hazırlama

125 ml developer solüsyonu 375 ml distile su (dH_2O) içerisine eklendi ve karıştırıldı.

Fiksatif Solüsyonu Hazırlama

125 ml Fiksatif solüsyonu 375 ml distile su (dH_2O) içerisine eklendive karıştırıldı.

5x Stok Elektroforez Running Solüsyonu Hazırlama

9 gram tris, 43,2 gram glisin ve 3 gram SDS 600 ml distile su (dH_2O) içinde çözdürüldü.

1x Elektroforez Running Solüsyonu

720 ml distile su (dH_2O) içerisine 180 ml 5x stok elektroforez running solüsyonu eklendi.

Western blot için alınan dokular -80°C'de saklandı. Daha sonra -80°C'den çıkarttığımız

dokular buz üzerine alındı. Çalışılan doku sayısına göre, ependorf tüplerin kapaklarına grup isimleri yazıldı ve spor üzerine yerleştirildi. Gerekli olan ependorf tüpler yazıldıktan sonra, dokular cam üzerine alınarak bisturi yardımı ile mekanik olarak parçalandı. Parçalanan doku, darası alınmış ve ismi yazılı olan ependorf tüpünün içerisine konularak tartıldı. Ependorf tüpüne konulan dokular tekrardan buz üstüne yerleştirildi. Dokular ependorf tüpünün üst bölgesinde kalmaması için kısa süreli santrifüj'a koyuldu. Doku ağırlıklarına göre lizis buffer miktarı hesaplandı. Dokuların üzerine 0,2 gr doku başına 600µl oranında lysis buffer ve 1 ml lizis buffera 30µl oranında proteaz inhibitör kokteyli (PIK) (Roche, #04 693 159 001) eklendi. 1 saat boyunca 15 dakika aralıklar ile dokular vortexlendi. Daha sonra sonikatör yardımıyla dokular parçalandı (169-70 am). Ependorf tüpündeki dokularda protein denatürasyonu olmaması için sürekli buz üstünde tutuldu. Dokular +4°C'de 10 dakika 15.000 rpm santrifüj yapılarak süpernatant kısımlardan alınarak isimleri yazan yeni ependorf tüplerine konuldu. Ependorf tüplerine konulan dokular -20°C'ye kaldırıldı. Ertesi gün -20°C'de bulunan lizis buffer ve dokular oda sıcaklığına çıkarılarak erimeye bırakıldı. Dokulardaki protein miktarını belirlemek için BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23225) kullanıldı. Protein içeriği 1mg/ml oranında olacak şekilde bovin serum albümin (BSA) (Serva, #11943.02) hazırlandı ve 500ml distile su içinde 500 mg BSA çözdürüldü. Proteinlerin hangi aralıkta olduğunu belirlemek için standart ependorf tüpleri hazırlandı. Ependorf tüpleri S_0, S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7 olarak adlandırıldı. S_0ependorf tüpüne 1000µl hazırlanan BSA'dan konuldu. S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7ependorf tüplerine ise 500µl distile su konuldu. S_0ependorf tüpünden 500µl BSA alınarak S_1 ependorf tüpüne eklendi. S_1 ependorf tüpü vortex yapılarak distile su ile BSA'nın karışması sağlandı. Tekrardan S_1 ependorf tüpünden 500µl çekilerek S_2 ependorf tüpüne eklendi. S_7'ye kadar bu şekilde dilüsyonları yapılarak standart ptotein aralığı hazırlandı. Örnekler, 1:50 oranında lizis buffer ile dilüe edildi. Dilüe edildikten sonra iyice vortexlendi. Kör olarak lizis buffer kullanıldı. BCA kit içeriğindeki Bicinchoninic Acid Solution ve Copper(2) Sulfate Solution'un karışımı 98:2 oranında sağlanarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Daha sonra 96 kuyucuklu plate, 25µl lizis buffer, standartlar ve örnekler yüklendi. Ardından üzerlerine 200µl çalışma solüsyonu eklenerek kuyucukların içindeki karışımlara pipetaj yapıldı. Bu durumda her kuyucuğun toplam hacmi 225µl oldu. Hazırlanan plate, 60°C'lik inkabatörde 15 dakika bekletildi. İnkübasyonu yapıldıktan sonra spektrofotometrede 562nm dalga boyunda okunması sağlanarak standartlar ile karşılaştırma yapılarak protein miktarı belirlendi. Protein

ölçümünden sonra örneklerin protein miktarı distile su ile eşitlenerek örnekler 1:1 oranında laemmli ile karıştırıldı. Sonrasında 95°C'de 5 dakika kaynatılarak örnekler yüklemeye hazır hale getirildi. Araştırılan proteinin kilo dalton (kDa) ağırlığına göre uygun yüzdeler belirlenerek ayrıştırıcı ve toplayıcı olarak jeller hazırlandı. Çalışılan proteinin nerede çıkacağını belirlemek için jelin ilk kuyucuğuna 10 mikrolitre marker yüklendi. Diğer kuyucuklara ise 10 mikrolitre numune yüklendi. Elektroforez cihazı kırmızı-kırmızıya siyah-siyaha olacak şekilde güç kaynağına bağlanarak 80 voltta çalıştırıldı. Bu sırada blotlama solüsyonu hazırlandı. Membran ve filtre kağıdı jel uzunluğunda kesildi. Hazırlanan membranlar ilk olarak 3 dakika methanolde bekletildi. Daha sonra 12 dakika blotlama solüsyonunda bekletilerek sandviç için hazır hale getirildi. Elektroforez sonrasında camlar bir pens yardımı ile açılarak toplama jeli ayrıldı. Geriye kalan ayrıştırıcı jel ise bir kap içerisine konulan blotlama solüsyonu sayesinde camdan ayrıldı. Membranın üsttünde ve altında 1'er tane sünger ve 3 tane kalın kağıt konularak sandviç hazırlandı. Hazırlanan sandviçler blotlama aletine yerleştirildi. Üzerine blotlama solüsyonu ve buz kalıbı konularak gece boyu +4°C'de 32 voltta immünblotting işlemi yapıldı. İmmünoblotting yapılarak jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı. Ertesi gün membran 3 kez 10 dakika süreyle tris bufer saline-tween 20 (TBS-T) solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran, 1 saat süre ile oda sıcaklığında %5'lik yağsız süt tozu ile çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Membran, üreticilerin tavsiye ettiği şekilde süt tozu içinde hazırlanarak gece boyu +4°C'de primer antikor Tssk6 ve Beta aktin (Cell Signalling, #13E5) ile çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkamanın ardından membran, sekonder antikorla oda ısısında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membran chemiluminisansla (Bio-Rad, #170-5061) 5 dakika geliştirilip, membrandaki protein bandları karanlık odada x-ray hiperfilme aktarıldı. Aktarılan film, geliştirici ve tespitten geçirilerek distile suda yıkandı. Film kurutulduktan sonra Tssk6 ile Beta aktin proteinlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı ve değenlendirildi.

Çizelge 2.2. Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Primer Antikor	**Dilüsyon**	**Sekonder Antikor Dilüsyonu**
Tssk6	1:2000	1:2000
Beta Aktin	1:2000	1:2000

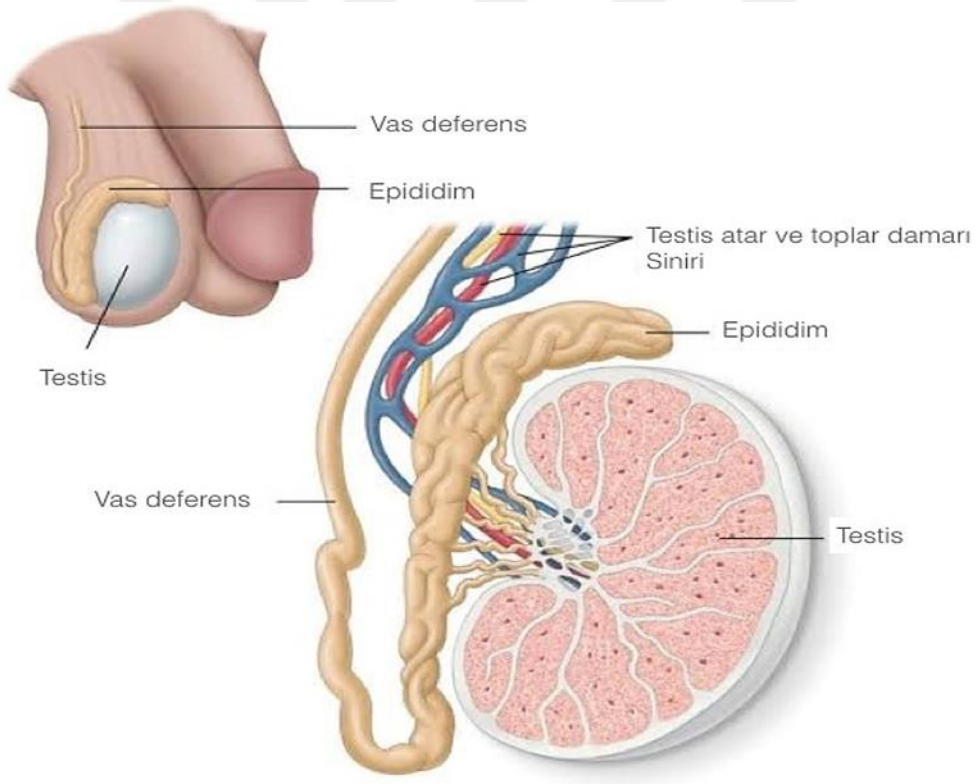
2.14. İSTATİKSEL ANALİZ

Tüm veriler GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) kullanılarak analiz edildi ve sonuçlar mean±SD olarak ifade edildi.Kan-glukoz seviyelerinin ölçümleri two-wayrepeated measuresANOVA takiben Tukey'in multiple testi ile analiz edildi. İmmünohistokimya ve Western blot sonuçlarının çoklu karşılaştırmalarındaki farklılıklarıone-way ANOVA takiben Holm-Sidak metodu kullanılarakanaliz edildi.İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p<0,05$ kabul edildi.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. TESTİSİN ANATOMİSİ

Testis, vücut boşluğu dışındaki skrotal keselerde yer alan oval şekilli erkek gonadlarıdır. Erkek üreme hücreleri testislerde oluşur. Testisler, skrotum içerisinde spermatik kordonlar tarafından asılı halde bulunurlar. Her biri yaklaşık 4 cm büyüklüğünde, 3 cm çapında olan testislerin sol tarafı sağ tarafa göre daha aşağıdadır. Böylece eğik bir konuma sahiptir. Testisin anterolateral kısmı rahat iken, posterolateral kısmı epididimis ve vas deferens ile direk bağlantılıdır ve tunika vaginalis ile örtülüdür (Şekil 3.1). Testislerin bir üst ve bir alt uçları, ön ve arka kenarları vardır. Ayrıca medial ve lateral yüze de sahiptirler. Testislerin üst uçları öne ve dışa, alt ucu ise arkaya ve içi doğru konumlanmıştır [18].



Şekil 3.1. Testis anatomik yapısı [17].

Testisi saran 3 tabaka vardır: Tunica vaginalis, testisi dıştan saran tabakadır. Tunica albuginea, testisi kalın bağ dokusu ile saran tabakadır. Bu tabaka testisin posterior yüzeyinde kalınlaşarak içeriye girinti yapar ve mediastinum testisi oluşturur. En içte

bulunan tabaka ise gevşek bağ dokusu yapısındaki testiküler kapsülün damar ağından oluşan Tunica vasküloza tabakasıdır [18].

3.2. TESTİS FİZYOLOJİSİ

Testisler, spermatogenez ve steroidogenez olmak üzere iki önemli işleve sahiptir. Hem mitoz bölünmesi hem de mayoz bölünmesi spermatogenez sürecinde meydana gelmektedir. Bu süreç sonunda erkek gametler oluşmaktadır [19]. Spermatogenez ön hipofizden salgılanan gonadotropik hormonların uyarısı sonucunda yaklaşık 13 yaşında başlar ve ileri yaşlarda belirgin şekilde azalsa da yaşam boyu sürer [20].

Spermatogonyumlar, devamlı olarak proliferasyonla kendilerini yenilerler. Hücrelerin bir bölümü, kök hücre görevini üstlenirken diğer bölümü ise spermlerin oluşumunu sağlayan son aşamaya kadar farklılaşır [20, 21]. Üreme sisteminin hormonal kontrolünde hipotalamustan salınan gonadotropin serbestletici hormon (GnRH) sekresyonu önemlidir. Bu hormon 2 saat arayla veya birkaç dakika süreyle salgılanır [20]. GnRH ön hipofiz bezini uyararak Luteinizan hormonu (LH) ve Folikül Stimülan hormonu (FSH) salınımını sağlar. FSH spermatogenezi stimüle ederken LH leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını stimüle eder. Testosteron ile birlikte androjenlerin sentezlendiği bu süreç ise steriodogenez olarak isimlendirlimektedir [21]. Androjenler, büyüme hızında artışa neden olan proteinlerin sentezini arttırır ve testislerin gametonik işlevlerini sürdürürler [19]. Hücrelerin büyümesi ve çeşitli spermatogenik maddelerin salgılanması için FSH, seminifer tübüllerde FSH reseptörleriyle sertoli hücrelerine bağlanır [20]. Hipofiz bezinden salgılanan LH uyarısı Leydig hücrelerinden androjen salınımını ve konsantrasyonunun artmasını sağlar ve spermatogenezi devam ettirir [19].

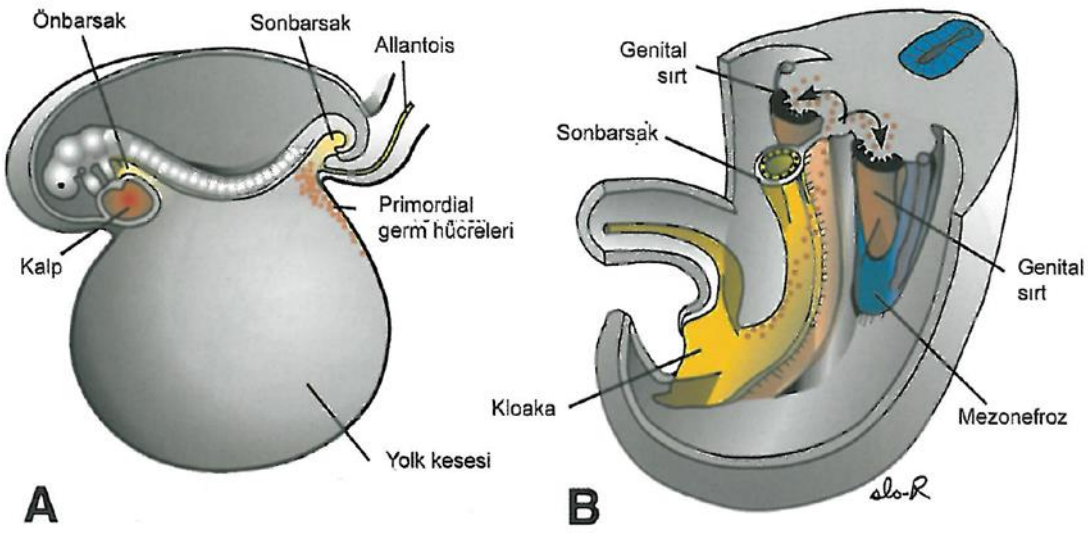
Spermler seminifer tülbüllerde üretilir ve rete testis ile vas deferens arasında yer alan kıvrımlı bir tüp olan epididimde motilitelerini kazanırlar [21]. Fakat epididime geçen spermler hareketsizdir ve fertilizasyon yetenekleri yoktur. Hareket yeteneklerini kazanabilmeleri için ~ 1 gün epididimde kalmaları gerekir [20].

Testosteron, hidroksil grubu içeren C19 steroid yapısındadır. Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron, kolestorelden sentezlenir [19]. Testosteron plazmada % 33'ü albümine, % 64'ü β globüline (seks hormonu-bağlayan globülin) bağlanarak yaklaşık % 97'si proteine bağlı olarak taşınır [19][20]. Belli bir süre sonra, testosteron ya

dokularda fikse olur ya da vücuttan atılır. Fikse olan testosteron hücre içinde dihidrotestosteron olarak bulunur [20]. Yetişkin erkeklerde plazma testosteron seviyesi 300 ile 1000 ng/dL arasındadır [19].

3.3. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

Cinsiyet değişikliği, birçok genin bulunduğu çoğunlukla otozomal bir süreçtir [22]. Gonadlar (testis ve over), mezodermal epitelden, embriyonik bağ dokusundan ve primordiyal germ hücrelerinden gelişmektedirler [23]. Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlense de, gonadların erken dönemlerinde morfolojik olarak cinsiyetleri belirlenemez [22]. Bu duruma 'farklanmamış gonadlar' denmektedir [22, 23]. Embriyonik gelişimin 7. haftasında cinsiyete ait gelişim seksüel dimorfizmle belli olmaya başlar [23]. Gonadal gelişimin ilk aşamaları 5. haftada mezonefrozun medialinde epitelin proliferasyonu ve epitelin altında bulunan mezenşimin yoğunlaşmasıyla gonadlar uzunlamasına bir çizgi halini alırlar ve böylece genital (gonadal) kabartı olarak meydana gelirler [22, 23]. Germ hücreleri gelişimin 6. haftasına kadar genital kabartıların içinde bulunmazlar. Epiblasttan gelişen primordiyal germ hücreleri [22] primitif çizgi doğrultusunda hareket ederek 3. haftanın sonunda yolk kesesinin allontois duvarındaki endoderm hücreleri arasına yerleşirler (Şekil 3.2.A) [23]. Embriyonun katlandığı sırada primordiyal germ hücreleri 4. haftada, sonbarsağın mezenterinin dorsali boyunca hareket ederek genital kabartıya doğru göç ederler (Şekil 3.2.B) [22]. Genital kabartıdaki epitel hücrelerin prolifere olarak mezenşimin içine girmesi ile primordiyal germ hücreleri 6. haftada primer seks kordonlarına ulaşırlar ve primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar [23]. Primordiyal hücreler, cinsiyet farklılaşmasında önemli rollere sahiptirler [22].



Şekil 3.2. A: 3 haftalık embriyoda yolk kesesinin allontaise yakın yerde bulunan primordial germ hücreleri. B: Primordial germ hücrelerinin genital kabartıya doğru göçü [22].

Seksüel dimorfizm X ve Y kromozomlarına bağlı olarak belirlenir [22] ve gelişmekte olan gonadların kromozom yapısı: XX ve XY'dir [23]. XX kromozoma sahip ise dişi, XY kromozomuna sahip ise erkek cinsiyetine sahiptir. Cinsiyeti belirleyen en önemli faktör Y kromozomunun kısa kolu üzerinde (Yp11) bulunan SRY genidir. Eğer SRY geni varsa fetüsün cinsiyeti erkek yoksa kız olarak gelişim gösterir [22].

Testislerin gelişimi, uyumlu birçok genin indüksiyonu ile sağlanır. Y kromozomunun kısa kolundaki SRY geninin kodladığı testis belirleyici faktör (TDF) primitif cinsiyet kordonlarını uyarır ve böylece prolifere olan kordonlar medullaya doğru hareket ederler [23]. Kordonlar burada dallanırlar ve birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis tübüllerini oluştururlar [22]. Testiküler kordonların gelişimi devam ederken tunika albuginea yüzey epitelinden ayrılır [22, 23]. Gelişen testisler yavaş yavaş mezonefroz'dan ayrılarak asılı halde kalırlar [22].

Testiküler kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli tekti ve rete testis'e dönüşürler [22, 23]. Testis kordonları 4. ayda 'u şeklinde' görünüm alır ve açık uçları rete testis ile ilerlerler. Bu kordonlar, sertoli hücrelerinden meydana gelir. Sertoli hücreleri bezin yüzey epitelden köken alır ve antimüllerian hormonunu (AMH) salgılarlar. Paramezonefrik duktusların gelişimi AMH tarafından baskılanır [23]. İnterstisiyel leydig hücreleri (Leydig hücreleri) gonadal sırtın orijinal mezenşimden köken alır [22].

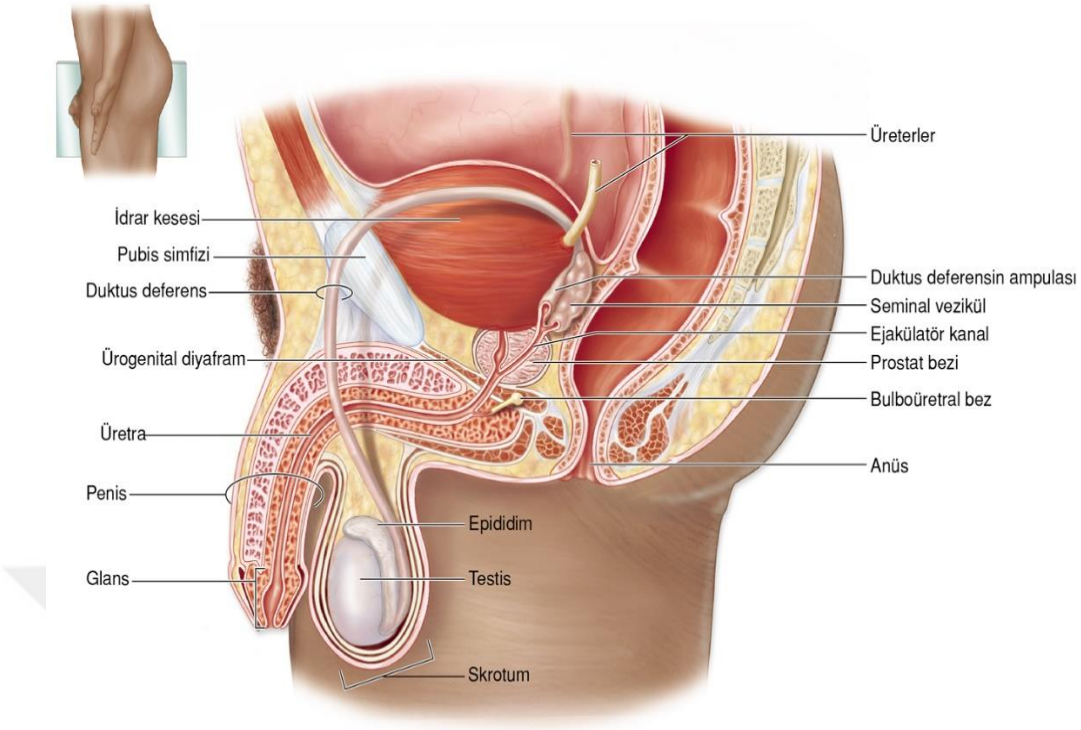
Seminifer tübüller, leydig hücrelerini oluşturan mezenşimden ayrıldıktan sonra leydig hücreleri gelişir ve gestasyonun 8. haftasından itibaren bu hücreler testosteron ve

androstenedion hormonlarını salgılamaya başlarlar [22, 23]. Böylece testisler genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek duruma gelirler [22]. Testosteron üretimi, intrauterin gelişiminin 8-12. haftaları arasında en yüksek değere ulaşan insan koryonik gonadotropin (hCG) tarafından uyarılır. Testosteron hormonuna ek olarak antimüllerian hormonda (AMH) salgılanır [23]. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan AMH hormonu puberteye kadar devam eder. Daha sonra AMH hormonunun salınma seviyesi azalır. AMH müllerian (paramezonefrik) hormon duktusların gelişimini baskılar. Puberte zamanına kadar seminifer tübüllerin lümenleri yoktur ancak katı halde bulunan testis kordonları puberte zamanında lümenleri açılarak seminifer tübüllere dönüşmeye başlar. Seminifer tübül duvarında sertoli ve spermatogonia hücreleri olmak üzere iki tip hücre bulunmaktadır. Destek hücreleri olan sertoli hücreleri, testisin yüzey epitelinden gelişirken spermatogonia hücreleri ise primordial germ hücrelerinden farklanırlar [23].

Seminifer tübüller kanalize olduktan hemen sonra rete testis tübülleriyle birleşir. Rete testis yaklaşık 20 adet mezonefrik tübüller ile duktuli efferentesi oluşturur. Bu duktuslar devam eden mezonefrik duktus ile birleşerek epididimisi oluştururlar [23].

3.4. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Erkek üreme sistemi, testisler, genital kanallar, cinsiyet bezleri (seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretral bezler) ve penis olmak üzere 4 farklı bölümden meydana gelmektedir (Şekil 3.3) [24]. Bu sistem devamlı olarak spermatozoa üretimi, testosteron ve seminal plazma sentezinden sorumludur [25, 26].



Şekil 3.3. Erkek üreme sistemini gösteren çizim [17].

Testisin en önemli iki görevi spermatogenez ve hormon (steroidogenez) üretmektir [17]. Testislerde esas üretilen testosteron hormonu ile birlikte metaboliti dihidrotestosteron da sentezlenir ve depolanır [25, 27]. Testosteron hormonu spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için önemli rol oynarken, dihidrotestosteron ise puberte ve yetişkinlik zamanlarında birçok organ ve doku üzerinde etki gösterir [17]. Cinsiyet bezleri ve genital kanallar, düz kasların kasılmasıyla birlikte birçok salgısını boşaltır. Bu salgılar, depolanan spermatozoonları dışarıya doğru taşır ve aynı zamanda spermatozoonlara gerekli besinleri sağlar [17, 25]. Spermatozoonlar ile birlikte genital kanallar ve cinsiyet bezlerinin salgısı semeni oluşturur. Oluşan semen, penis yoluyla dişi üreme sistemine taşınır [25].

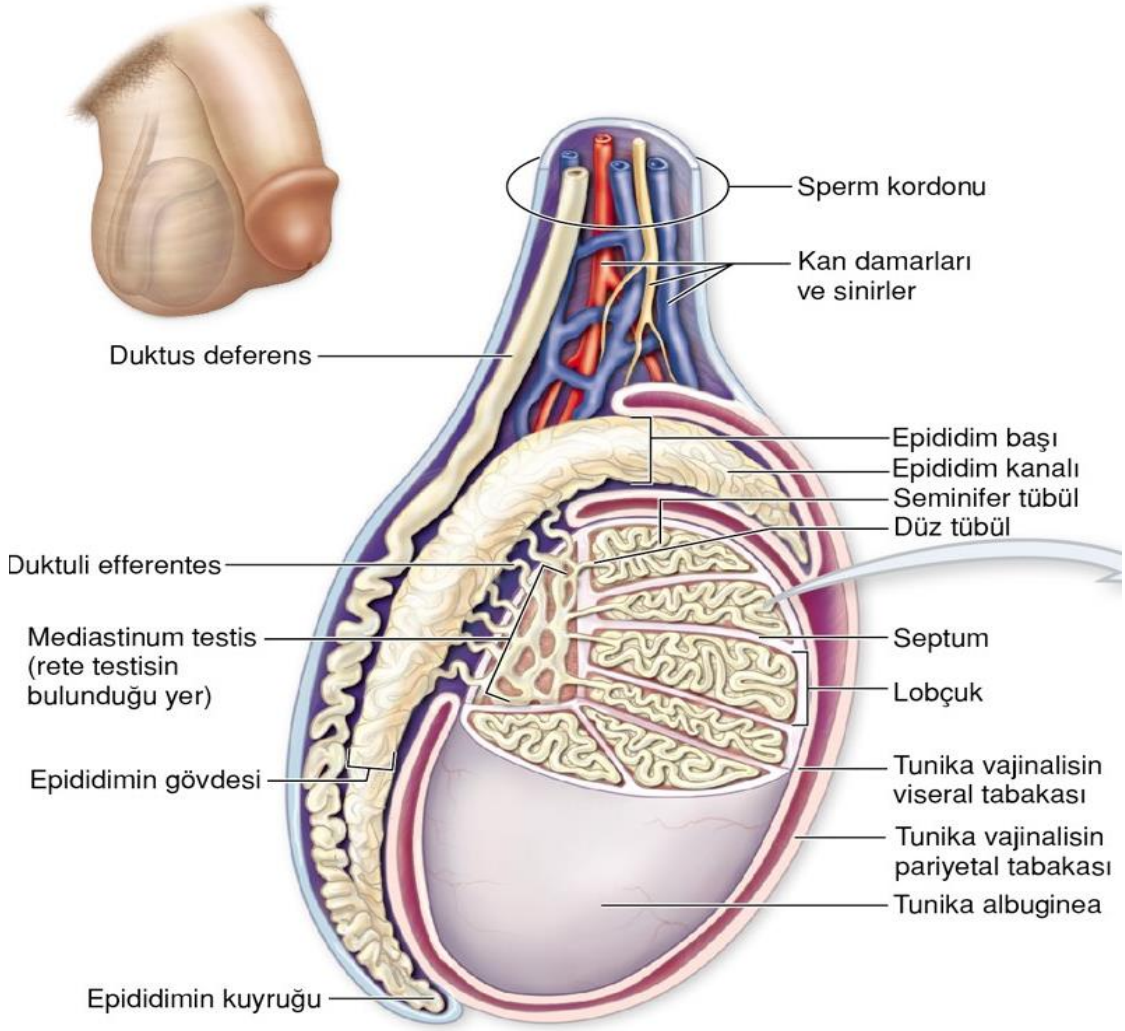
Testisler, skrotom içerisinde bulunan, eşleştirilmiş oval şekilli organlardır [25, 26]. Her bir testis karnın ön duvarının tabakalarıyla süreklilik gösterir. Testisler skrotumun içerisine uzanan muskulofasiyal kesenin ucunda asılı kalırlar ve spermatik kordonlar sayesinde karnın ön duvar tabakasına bağlanırken skrotal ligamentler ile de skrotuma bağlanırlar. Testisler abdominal kaviteden skrotoma hareket ederken kan damarlarını, lenf damarlarını, otonomik sinirleri taşırlar [25]. Skrotom içerisindeki testislerin normal

fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri ve spermatogenez için sıcaklıkları 34°C - 35°C olması gerekir [25, 27].

Abdominal aortun bir dalı olan testiküler arter damar desteği sağlayarak testislerin kanlanmasında yardımcı olur. Pampiniform venöz pleksus tarafından çevrelenen testiküler arter testise yakın konumlanmış oldukça kıvrımlı bir yapıdır. Pampiniform venöz pleksuslar, kanı testislerden abdominal venlere taşımakla görevlidirler. Bu düzenleme sayesinde testislerde kan damarları arasında ısı değişimi kontrol altında tutulur [17].

Kremaster kası ortam sıcaklığına göre kasıldığı zaman testisler abdominal duvara yaklaşır fakat gevşediği zaman ise skrotomun içinde aşağı yönde hareket ederler. Dartos kasları, ortam sıcaklığı düştüğünde skrotomun büzüşmesini sağlayarak ortamdaki sıcaklığı düzenler [25, 27].

Testisler, dıştan üç tabakalı bir kapsül ile kuşatılmıştır [25]. Kapsülün, dış tabakası tunika vajinalis, orta tabakası tunika albuginea ve iç tabakası tunika vasküloza olarak adlandırılır. Tunika vajinalis, dışta pariyetal, içte viseral bir tabakadan oluşan tek katlı mezotelyal bir katmandan oluşan periton yapraklarıdır. Pariyetal tabaka skrotomun iç yüzüne tutunurken visseral tabaka ise tunika albugineaya yapışır ve böylece testislerin skrotoma inmesi için iki tabaka arasında pelvis boşluğu oluşur. Testislerin bağ doku kapsülü olan, sıkı bağ doku yapısındaki tunika albuginea her bir testisi sarar. Kapsülün en belirgin tabakasıdır. Gevşek bağ dokusu yapısındaki tunika vasküloza testislerin kan damarlarının bol bulunduğu kapsül olarak bilinmektedir (Şekil 3.4) [27].



Şekil 3.4. Testisin histolojik katmanları [17].

Sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albugineanın testisin posterior yüzü boyunca kalınlaşması ile mediastinum testis adı verilen yapı oluşturur [25]. Mediastinum testisten uzanan septumlar testisi yaklaşık 250 testiküler lobüle ayırmaktadır [27]. Oluşan lobüller seminifer tübüllerin ve interstisyel hücrelerinin etrafını sarmaktadır [25]. Her bir lobülde, yaklaşık 1 ile 4 arası seminifer tübül bulunmaktadır [17]. Yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 150 µm çapında olan seminifer tübüller, fibröz bağ doku kılıfı ve belirgin bir bazal lamina ile sarılı spermatogenik hücreler ve sertoli hücrelerinin bulunduğu çok katlı germinal epitelden oluşur [25, 27]. Lobüllerin içerisinde bulunan seminifer tübüllerin arasındaki alanda ise yoğun miktarda kas benzeri hücreler, kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreler bulunmaktadır [24, 25]. Seminifer tübüller spermatozoonları üretirken, interstisyel alanda yer alan leydig hücreleri ise testosteronu salgılar [26]. Seminifer tübüllerin, tübül duvarları kalındır ve kasılabilir miyoid hücrelerden, fibroblastlardan, kollajen ve elastik liflerden meydana gelirler [25].

Tübüller aşırı kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve tübüllerin mediastunuma yakın yerleri kısa ve düz olduğundan düz tübüller ya da tubuli rekti olarak kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasına yardımcı olur. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes yardımı ile epididimisin baş kısmına bağlanır [24].

3.4.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerdeki destek hücreleridir (Şekil 3.5) [27]. Bu hücreler büyük bir nükleusa sahiptirler. Sitoplazmasında; bol mitokondri ve lizozom, iyi gelişmiş endoplazmik retikulum ve yaygın golgi cisimciği bulunur. Sertoli hücreleri geniş apikal ve lateral uzantılara sahip uzun, prizmatik hücrelerdir. Nükleus çekirdekçikleri; belirgin, oval veya üçgenimsi şekillerde, sitoplazmik uzantıları ise düzensiz bir şekilde görülür [25]. Bazal lamina üzerine konumlanan sertoli hücreleri seminifer tübülün lümenine uzantılar göndermektedir [17]. Sertoli hücreleri puberte zamanına kadar seminifer epitelin dominant hücreleridir ve puberteden sonra postmitotiktirler [24, 25].

Komşu sertoli hücreleri, bazolateral yüzeyde birbirleriyle zonula okludens (sıkı bağlantılar) bağlantısı oluştururlar. Bu sıkı bağlantılar kan-testis bariyeri oluşturarak seminifer epiteli, bazal ve adluminal kompartman olmak üzere iki bölüme ayırır [24, 25, 28]. Spermatogonyumlar, bariyer altında kalan bazal kompartmana yerleşirler. Spermatogenez sırasında, spermatogenik seri hücreleri bu bağlantı noktalarından geçerek adluminal kompartmana çıkarlar.

Sertoli hücrelerinin birçok fonksiyonu vardır [17].

1) Oluşmakta olan spermatogenik seri hücrelerin korunmasında, düzenlenmesinde ve desteklenmesinde görev alırlar.
2) Tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreleridir.
3) Sertoli hücreleri, gelişimini tamamlayamayan spermatogenik hücreleri ve oluşumdan sonra açığa çıkan atıkları fagosite ederler.
4) Sertoli hücreleri spermin seminifer tübüllerden intratestiküler kanalllara geçişini sağlamak için iki farklı türde ekzokrin (androjen bağlayan protein salgısı) ve endokrin (inhibin) salgılarını salgılamaktadır. Ayrıca bu salgılar spermatogonyumdan spermatozoon geçişi sırasında da çok önemlidir.

- Androjen bağlayan protein salgısı, gerekli olan testosteronu seminifer tübüllerde yoğunlaştırmaktadır.
- Glikoprotein hormon olan inhibin folikül-stimüle edici hormon (FSH) salınımının kontrolünde görev almaktadır.

5) FSH ve testosteron reseptörleri bu salgıları düzenlemektedirler.

6) Sıra halinde bulunan sertoli hücreleri bazolateral bölgede zonula okludens bağlantıları oluşturarak kan-testis bariyerini meydana getirirler.

7) Sertoli hücreleri Müllerian-inhibe edici faktörü salgılamaktadırlar [26].

3.4.2. Spermatogenik Seri Hücreler

Spermatogenez, testislerde morfolojik olarak farklılaşmış spermlerin yaklaşık 74 günlük oluşum sürecidir [5]. Bu süreç gonadotropin seviyesinin artması ile başlar ve hayat boyunca devam eder.

3.4.2.1. Spermatogenez

3.4.2.1.1. Spermatogonal Faz: Spermatogonyumların mitoz bölünme geçirerek primer spermatositlere farklılaşacak öncü hücreleri oluşturduğu faza denilmektedir. Bu fazda bulunan hücreler birden fazla bölünme gerçekleştirir (Şekil 3.5).

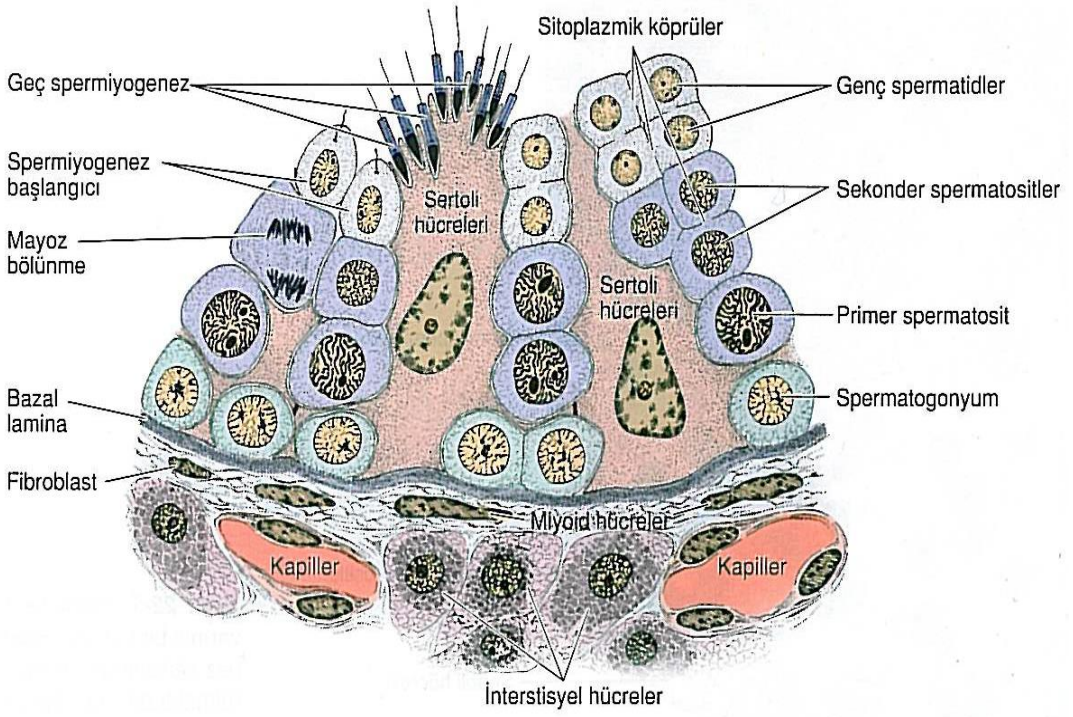
1. **Tip A Koyu (Ad):** Spermatogonyum hücrelerinin nükleusu oval, ince granül kromatinli ve yoğun bazofilik boyanmıştır [25]. Bu hücreler seminifer epitelin kök hücreleridir ve asimetrik bölünme gerçekleştirirler. Bölünme sonucunda bir grup Tip A spermatogonyum oluştururken diğer grup Tip B spermatogonyum oluştururlar [27].
2. **Tip A Açık (Ap):** Spermatogonyum hücreleri oval nükleuslu, ince granüllü kromatinli ve açık renk boyanmıştır [27]. Düzenli bölünme yaparlar ve sperm üretmek için farklılaşma sürecine gönderilirler.
3. **Tip B Spermatogonyumlar:** Nükleusu yuvarlak yoğunlaşmış kromatin yapıdadır [25]. Çekirdekçikleri merkezi yerleşimlidir [24]. Son bölünmeleri sonrası primer spermatositleri oluşturur [27].

3.4.2.1.2. Spermatosit Faz: Tip B spermatogonyumların yapmış olduğu mitoz bölünme sonucunda primer spermatositler oluşur [27].

Primer spermatositler, seminifer tübüldeki en büyük hücrelerdir ve sitoplazmalarında büyük bir nükleusları vardır [27]. Mayoz bölünmeye başlamadan önce DNA'larını

kopyalarlar. Böylece 46 kromozoma ve 4n DNA'ya sahiptirler. Mayoz 1'in profaz evresinde, XY kromozom çiftine karşılık gelen kromatin kitlesi çekirdek zarına yakın yerde yoğunlaşmışlardır. Çeşitli çekirdekçik kitleleri bulunur ve homolog kromozomları krossing over olayına hazırlarlar. Primer spermatositler, spermatosit fazda 22 gün süren bir mayoz bölünme sonunda n krozoma ve haploid DNA yapısında sekonder spermatositleri oluştururlar (Şekil 3.5) [17, 24].

Sekonder spermatositler, oluşan sekonder spermatositler hemen ikinci mayoz bölünmeyi gerçekleştirirler ve bu şekilde iki haploid spermatid meydana gelir [25]. Sekonder spermatositler, çok kısa sürede ikinci mayoz bölünmeyi tamamladıkları için seminifer tübül lümeninde çok az sayıdadırlar (Şekil 3.5) [27].



Şekil 3.5. Seminifer tübülün bir parçasını gösteren şematik çizim. Seminifer epitel spermatogenik seri hücreleri ve setoli hücreleri olmak üzere iki farklı hücre tipinden oluşur [17].

3.4.2.2. Spermiyogenez

Sekonder spermatositlerin mayoz bölünme sonucunda oluşan spermatidler, spermiyogenez sırasında olgun sperm hücrelerine dönüşürler ve başka bir bölünme gerçekleşmez (Şekil 3.6) [25]. Daha küçük boyda olan spermatidlerin erken ve geç evreleri bulunmaktadır. Erken spermatidler, germinal epitelin derinliklerinde yuvarlak olarak, geç spermatidlerde germinal epitelin lümene yakın bölümünde uzun kuyruklu ve kuyrukları lümene uzanmış olarak görülür [27]. Olgun spermatidler spermiyasyon adı

verilen bir süreçle seminifer tübül lümenine bırakılırlar [24]. Spermiyogenez 4 basamaktan meydana gelmektedir:

1. Golgi Fazı: Spermatid sitoplazması, glikoproteinden zengin granüllerin toplandığı belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum tübülleri ile karakterizedir [17, 25]. Golgi kompleksi, içerisinde hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz gibi hidrolitik enzimleri içeren proakrozomal veziküller birikir. Biriken proakrozomal veziküller birleşerek akrozomal granülü oluştururlar. Akrozomal granül, membran ile sınırlı akrozomal vezikülün içinde yer alır. Jukstanüklear bölgede bulunan sentriyoller, oluşan akrozomun karşı kutbuna 90 derecelik açı ile yerleştikten sonra flagellar aksonem (9+2) oluşmaya başlar [25].

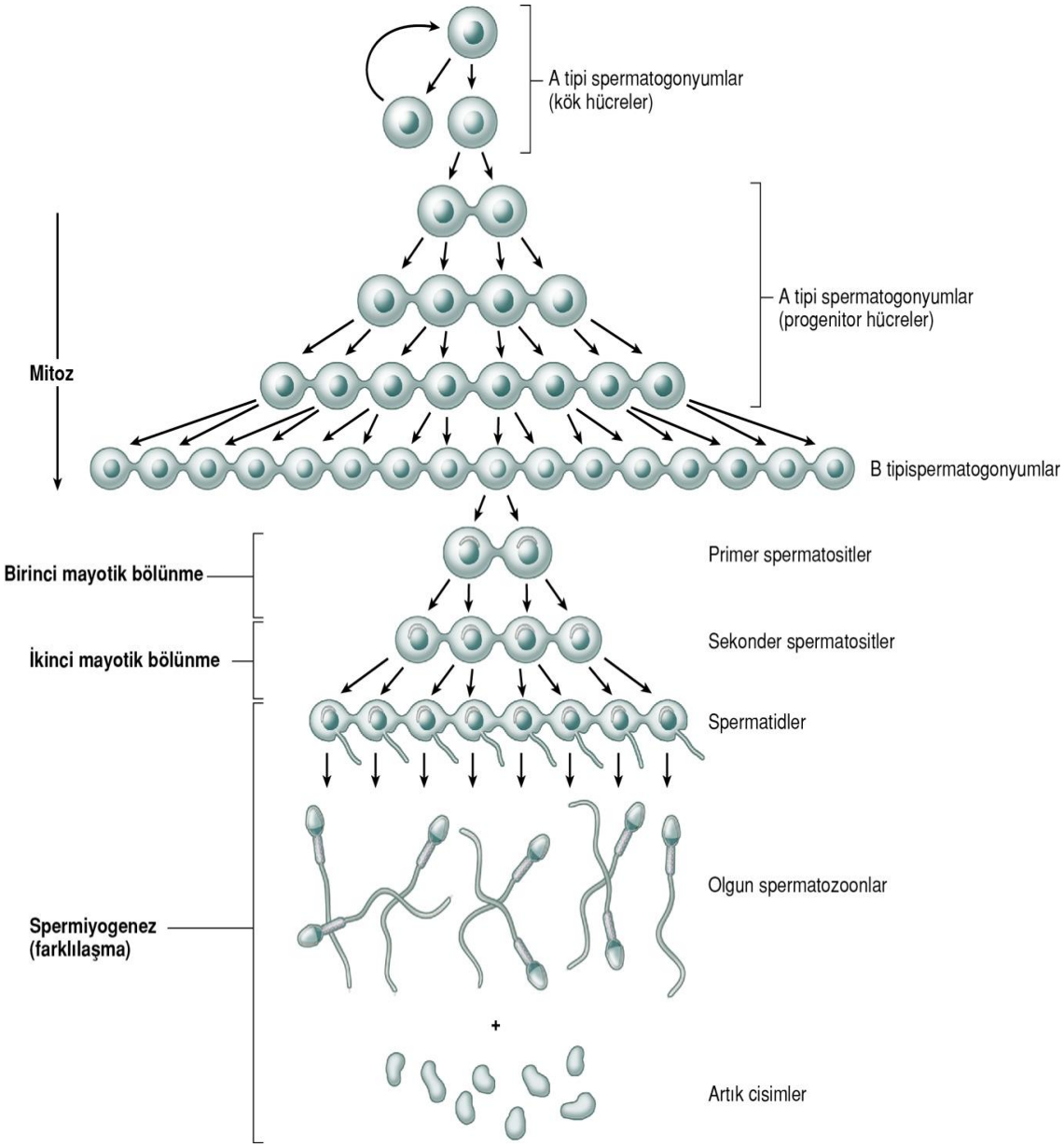
2. Kep Fazı: Proakrozomal veziküller, akrozomal keseyi oluşturmak için birleşmeye devam ederler. Akrozomal kese spermatid çekirdeğinin uzamasıyla kaudal inişi başlatır. Şapka benzeri görünüm alır ve daralarak inen bölümü çekirdek zarına manşet halkası ile tutunur [24].

3. Akrozom Fazı: Yoğunlaşan nükleusun ön yarısını akrozomal veziküller kaplayarak ‘akrozom’ adını alırlar. Akrozom içerisinde bulunan hidrolitik enzimler, özel bir tip lizozom olarak bilinir. Fertilizasyon sırasında bu enzimler, korona radiyata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellusidayı aşındırırlar. Bu fazda spermatidin başı sertoli hücrelerine tam olarak gömülür ve bazal laminaya doğru dönerek yeni pozisyon kazanır. Olgunlaşmaya başlayan flagellum ise seminifer tübülün tabanına doğru ilerler ve aksonem lümenine uzanır. Spermatidin nükleusu yoğunlaşarak yassılaşır ve uzar. Çekirdek ve akrozom plazma membranının anteriyor kısmına yakın bir alana yerleşir. Posteriyor kısmı ise sitoplazmaya doğru yerleşir. Silindirik bir yapı olan manşeti oluşturmak için sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanırlar. Çekirdeğe yakın olan sentriolden bir tanesi gelişerek prizmatik bir flagellum oluşturur. Flagellum geliştikçe etrafında ince, fibriler bir kılıf oluşur. Bu fibriller sayesinde flagellum ile çekirdek birleşerek bağlantı parçası adı verilen bölgeyi oluştururlar. Flagellum spermiumun kuyruk kısmını oluşturur. Flagellumun etrafını çevrelemek isteyen plazma zarı posteriyor yönünde ilerler. Bu eylemi yaparken manşet kaudale göç ederek yok olur. Mitokondriler, flagellumun proksimal kısmı etrafında toplanarak spermatozoonun hareketliliğini sağlayan sperm kuyruğunun orta parçası adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluştururlar [25].

4. Olgunlaşma (maturasyon) Fazı: Bu son fazda flagellum çevresindeki rezidüel cisimcikler sertoli hücreleri tarafından yok edilerek olgun spermatozoonlar meydana gelir. Böylece spermatidler arasındaki sitoplazmik köprüler ortadan kalkar ve spermatidlerin birbirleriyle bağlantıları kalmaz. Spermatogenezin en son basamağı olan spermiyasyon sürecinde spermatozoonlar tübül lümenine salınırlar [25].

Olgunlaşmış bir sperm yaklaşık 60 µm uzunlukta olup sperm başı ise 4 µm uzunluktadır. Sperm başı yassı ve sivri görünmektedir. Ayrıca 3 µm genişlikte ve 1 µm kalınlıktadır. Nükleusun 2/3'lük anteriyor bölgesini akrozomal kese çevreler. Bu kese içerisinde zona pellusidayı geçebilmek ve yumurta hücresine ulaşabilmek için gerekli proteaz enzimleri (hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin) bulunmaktadır. Akrozom reaksiyonu bu enzimlerin salınması ile başlar. Böylece sperm yüzeye penetre olur ve fertilizasyona yardımcı olur. Sperm kuyruğu 4 bölümden oluşur: 1) Boyun, sentriyolleri ve kaba fiberlerin başlangıcını sağlar. 2) Orta parça, kuyruğun enerji kaynağıdır ve içerisinde bulundurduğu mitokondriyonlar sayesinde spermin hareketini sağlamaktadır. 3) Esas parça, aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içermektedir. 4) Son parça ise sadece aksonemal kompleksi içerir [25].

Spermler ilk üretildiklerinde hareketsiz hücrelerdir. Ancak seminifer tübül içerisinden epididime doğru hareketleri, kontraktil hücrelerinin peristaltik kasılmaları ve sertoli hücrelerinin salgıladığı sıvı sayesinde gerçekleşir. Spermler seminifer tübülden sonra ilk bölümü sertoli hücrelerinden oluşan düz tübüllere geçmektedir. Buradan mediastinum testis içerisinde yer alan rete testis kanal ağına geçmektedir. Rete testis, tek katlı kübik epitelden oluşan kanallar sistemidir. Bu kanal ağı tek katlı kübik epitelden oluşan ve etrafında sirküler düz kas katmanı olan duktuli efferentesler aracılığıyla duktus epididimise geçer. Sperm hücreleri bir süre sonra duktus epididimisin içerisinde ileri yönde hareket yeteniğini kazanırlar ve olgunlaşırlar. Olgunlaşma sırasında sitoplazma azalır, nükleus DNA'sı yoğunlaşır, sperm hücrelerinin başı küçülür ve sperm hücreleri ince hale gelir. Sperm hücreleri erkek boşaltım kanalında birkaç hafta canlı kalabilirken dişi üreme sisteminde iki veya üç gün canlı kalabilirler [25].



Şekil 3.6. Germ hücrelerinin klonal özelliğini gösteren çizim [17].

3.5. İNTRATESTİKÜLER KANALLAR

Seminifer tübüller tubuli rekti (düz tübüller) ile devam ederler. Epitelin proksimal bölümünü sertoli hücreleri döşerken distal bölümünü ise tek katlı küpik epitel döşemektedir. Çevresinde mediastinum bağ dokusu bulunan düz tübüller rete testisle devam ederler [25]. Rete Testis, damardan zengin, birbirleri ile bağlantılı karmaşık bir kanallar sistemidir. Mediastinum testiste bulunurlar [27]. Kanallar basit kübik epitel ile döşelidir. Ductuli eferentes kanalları kübik ve alçak prizmatik(kolumnar) epitel ile döşelidir. Epitel hücrelerinin bir kısmı silyalı hücrelerden ve bir kısmıda sterosilyalı

hücrelerden oluşmaktadır. Bu sebepten dolayı düzensiz lümenlere sahiptirler [25].

3.6. DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus (DM), insülin sekresyonu yetersizliğinden kaynaklanan dünyadaki en büyük küresel sağlık sorunlarındandır [29, 30]. Ayrıca karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasındaki anormalliklerle devam eden ve yaşam boyu süren kronik ve metabolik bir hastalıktır [29, 31]. DM, dünya nüfusunun %6.1'ini etkilemektedir [32]. Diyabetin ortalama başlama yaşı 42'dir [33]. Son yıllarda diyabet hastalıklarının insidansı oldukça yüksek seviyelerde artmaya devam ettiğinden 2030 yılına kadar 400 milyondan fazla hasta olacağı tahmin edilmektedir [8].DM'nin prevalansı ve insidansı gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere önemli ölçüde yükselmeye devam etmektedir [31]. Özellikle son yıllarda DM'nin morbiditesi aniden yükselişe geçmiştir ve böylece ciddi ölüm nedenlerinden biri haline gelmiştir [34]. DM birden fazla etiyolojiye sahiptir [29]. DM hem genetik faktörlerden hem de çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bunların yanı sıra yaşam tarzı ve immünolojik faktörler de etkilemektedir [35]. Diyabet, çeşitli organlarda hasara, işlev bozukluğuna yol açmaktadır [29, 36]. DM'nin belirtileri; susama, idrar hacmi, poliüri, polidipsi, yorgunluk, performans kaybı, görme bozuklukları ve kilo kaybıdır [29]. DM'de kan-glukoz seviyelerinde ciddi bir artış görülür [37]. Bu artış DM'nin en belirgin komplikasyonu olanhiperglisemidir [38]. Diyabet hastalarında hiperglisemiye bağlı komplikasyonlar genellikle aynıdır, fakat ilerleme düzeyleri farklılık göstermektedir [39]. Hipergliseminin kontrolsüz bir şekilde yükselmesi diyabetik retinopati, hepatopati, nefropati ve nöropatiye yol açar [40, 41]. Diyabet hücresel düzeyde incelendiğinde, pankreatik beta hücrelerinin harabiyetiyle birlikte ortaya çıkan insülin eksikliği sonucunda oluşur [38, 42, 43]. Diyabetin en yaygın komplikasyonu olan hiperglisemiye bağlı vücuttaki homeostazın bozulması reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini ve serbest radikalleri arttırır. Hiperglisemiye bağlı bu artış oksidasyon-redüksiyon dengesinin bozulmasına ve hücresel aktivitelerin yok olmasına sebep olur [44]. Diyabette gözlenen komplikasyonların birçoğu hiperglisemiye bağlı oksidatif stresten kaynaklanmakta [45] ve hastalığın patogenezinde de önemli rol oynamaktadır [46]. Yapılan araştırmalara göre ROS'un aşırı üretimi ve antioksidan savunmaların etkinliğinin azalmasıyla diyabette oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir [47, 48]. Hastalığın tedavi şekli, tipine, süresine, hastaların özelliklerine ve komplikasyonlarına göre değişmektedir.

Lipoproteinler, kan basıncı, kilo kontrolü, ruh sağlığı ve yaşam tarzı diyabet ile ilişkili komplikasyonlarda önemli rol oynar. Diyabet hastalığının oluşum ve ilerleme seyrine göre dört tipi vardır. Bunlar Tip 1 diabetes mellitus (T1DM), Tip 2 diabetes mellitus (T2DM), gestasyonel ve diğer nedenlere bağlı diabetes mellitusdur [49]. Bunlar patofizyolojik özellikleri ile her ne kadar birbirine benzese de glisemik kontrolde birbirlerinden farklılık gösterir [50].

Tip 1diabetes mellitus (T1DM); Pankreas beta hücrelerinin yıkımı sebebiyle çoğunlukla mutlak insülin eksikliğinden kaynaklı olarak ortaya çıkan otoimmün bir hastalıktır [49]. Bu hastalık diyabetin sadece %5 ila %10'unu oluşturur [40]. T1DM, hızla yaygınlaşması ve prevalansı ile toplumlarda en önemli halk sağlığı sorunlarındandır [51, 52]. İnsülin eksikliği tüm vücut metabolizmasında çeşitli etkiler göstermektedir [53]. T1DM, kardiyovasküler hastalığa, diyabetik nöropatiye ve diyabetik retinopatiye neden olmaktadır [53]. Bu hastalıklara ek olarak, T1DM hipotalamik-hipofiz-testis ekseni üzerinde hareket ederek, erkek üreme sistemini de etkilemektedir. T1DM'li hastalarda testis ağırlığında azalma ve spermatogenik süreçte yapısal değişikliklere yol açtığı görülmektedir [54, 55]. Bu değişiklikler, insülin eksikliğinden kaynaklı apoptik hücre ölümü, düşük testosteron salınımı ve germ hücre kaybından meydana gelir [55]. Çocuklarda erken yaşlarda görülmekle birlikte genellikle erken yetişkinlik döneminde ortaya çıkmaktadır [36, 50]. Uluslararası Diyabet Federasyonu'na göre, her yıl 86.000'den fazla çocuğa T1DM teşhisi konulmaktadır ve çocukluk çağında bu hastalığın görülme oranı, her yıl %3'ten %5'e çıkmaktadır [56]. T1DM'li hastalar çoğunlukla insülin tedavisi alırlar ve ömür boyu devam ederler [50].

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM); İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus tipi olarak bahsedilir [13]. Dünya genelinde giderek artış gösteren T2DM, önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir [57] ve genellikle yetişkinlikte ortaya çıkar. İnsülin direnci ve beta hücre sayısındaki azalma ile karakterizedir [36, 49]. T2DM'de sürekli olarak insülin sekresyonunda bir azalma görülür [50]. Toplam diyabet vakalarının %90 ila %95'ini oluşturmaktadır [40, 58]. T2DM genellikle erkeklerde azalmış testosteron ve gonadotropin seviyeleri ile birleştirilir [58].

Gestasyonel diabetes mellitus (GDM); Gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde teşhis edilen diyabet türüdür [49, 59]. Hamile kadınlarda kan şekeri seviyesi yükseldiğinde ortaya çıkar [33]. GDM, hamile kadınların %5 ila %6'sını etkilemektedir [60, 61].

Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet türleri; Diyabetin bu formu birden fazla problem içerir ancak en çok karşılaşılan problem, beta hücre fonksiyonundaki genetik kusurlar ile ilişkilidir ve genellikle hipergliseminin erken yaşta başlamasıyla karakterizedir [33, 60]. Diğer sınıfı, diyabet vakalarının %1'den daha azını oluşturur [60]. En önemli sebebleri monogenik diyabet sendromları, endokrinopatiler ve ekzokrin pankreas hastalıkları gibi hastalıklardır [49, 62] .

3.7. DİABETES MELLİTUS İLE TESTİS İLİŞKİSİ

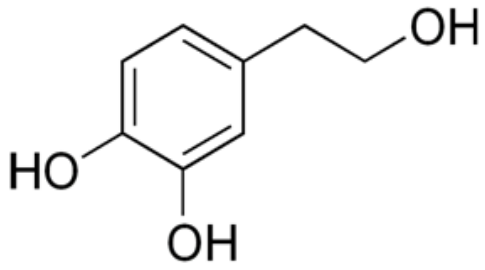
Diabetes mellitus (DM) önemli bir sağlık sorunu olan kronik hiperglisemi ile ilişkili bir durumdur [13, 30]. Diyabetin uzun zamandır bilinen bir diğer komplikasyonu erkek üreme bozukluklarıdır [30, 63]. DM morbiditesi ile infertilite arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır [34]. Özellikle genç ve orta yaşlı erkekler arasındaki yüksek DM insidansı, diyabetik erkeklerde yüksek subfertilite prevalansı ile önemli ölçüde ilişkilidir [8]. İnfertilite, diyabetik erkeklerde esas olarak apoptotik hücre ölümüyle germ hücrelerinin kaybına neden olan yaygın bir komplikasyondur [55, 56]. DM, spermatogenezin endokrin kontrolünü, üremeyi ve ejakülasyonu etkileyerek erkek fertilitesini etkiler [30, 55, 64]. İnfertilite prevalansındaki yükseliş, hiperglisemin spermatogenezde bozulmalara neden olan hipotalamik hipofiz eksenini ve spermatogenezi etkileyen hormonal değişikliklerinden kaynaklanır [13, 65, 66].Bunlara ek olarak Shrilatha ve arkadaşlarının diyabetik testis üzerine yapmış olduğu çalışmada spermde DNA hasarının arttığını ve sperm sayısında azalma olduğunu bildirilmiştir [13]. Bunlarla birlikte T1DM, hiperglisemin etkisiyle gonadal ekseni, semen parametrelerini de etkilemektedir [67]. Yapılan birçok çalışmada, spermatogenezin kesintiye uğramasına sebep olan DM'nin germ hücrelerinde apoptozu arttırdığı belirtilmiştir [30, 47]. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik rat testislerinde serum testosteron düzeyinde bozulma, FSH ve LH düzeylerinde bozulma, leydig hücre sayısında azalma ve testis dokusunda değişen derecelerde lezyonlar tespit edilmiştir [13, 44, 68, 69]. Bunlara ek olarak DM'nin sertoli hücrelerinde de apoptoza neden olduğu belirtilmiştir [8, 70]. Ayrıca DM'nin testis hücrelerinde oksidatif stresi arttırdığı bildirilmiştir. Artan oksidatif stres ile birlikte testis hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi meydana gelir [30, 47]. Reaktif oksijen türlerindeki artış, oksidasyon-redüksiyon dengesinin bozulmasıyla sperm üretiminde bozulmalara neden olur [44, 71, 72]. Oksidatif stresin bir diğer etkisi isespermin hareketliliğinde azalmaya

ve seminifer tübüllerin epitelinde morfolojik bozukluklara neden olmaktadır [30, 53, 73]. Bunun nedeni, spermatozoaların, aşırı reaktif oksijen türleri üretimine karşı yeterli antioksidan koruması olmadığı için oksidatif strese karşı hassas olmalarıdır [8]. Ayrıca aşırı artmış reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin, sperm hareketliliği ve fertilize edebilme yeteneği üzerine olumsuz etkileri vardır [43, 47].

3.8. HİDROKSİTİROZOL

Son yıllarda, akdeniz diyetinin (AD) insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri büyük ölçüde ilgi görmektedir. AD, genellikle tahıllar, sebzeler, meyveler, kabuklu yemişler, baklagiller, balık ve zeytinyağı gibi gıdalar ile tanımlanan bir diyet türüdür. AD'nin en önemli temel taşı şüphesiz zeytinyağıdır [74, 75]. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda polifenolik bileşikler, kronik hastalıkların engellenmesine katkı sağladıkları için yoğun ilgi görmüştür. Hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol, HT), zeytin ve zeytinyağında bulunan önemli polifenolik bir bileşendir [8] ve oleuropeinin hidrolizinden elde edilmektedir [9]. Bir fenolik alkol yapısında olan hidroksitirozol 154.16 g/mol moleküler ağırlığındadır [75-77]. $C_8H_{10}O_3$ kimyasal formüle sahip olan hidroksitirozol, serbest formlarda bulunarak dokulara daha rahat nüfuz etmektedir. Çoğunlukla lipit içerisinde çözünür fakat az da olsa suda da çözünmektedir [78].Polifenolik yapıda olan ve sızma zetinyağında bulunan hidroksitirozol hem in vivo hem de in vitro antioksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özellikler ile sağlık üzerine birçok faydalı etkileri belirtilmektedir [10, 79-82]. Ayrıca zeytinyağının içerisinde 30 farklı fenol tanımlanmıştır fakat antioksidan değerleri en yüksek olanlar hidroksitirozol, tirozol ve oleuropeindir [83]. Ancak, içerdiği bu fenolik bileşikler içerisinde hidroksitirozol en güçlü olanıdır [82]. HT'nin toksik olmaması ve kolay formülasyonu sebebiyle Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu insan sağlığına yararlı olduğunu bildirmiştir [76, 84]. Yapılan çalışmalara göre,serbest radikal türlerinde güçlü bir temizleyici olan HT, oksidatif strese karşı koruyucu bir etki göstermektedir [10, 81, 85]. Hidroksitrozol serbest radikalleri doğrudan yakalayarak ya da antioksidan enzimlerle birleştirilmiş bir dizi tepkime yoluyla onları parçalayarak antioksidan özellik göstermektedir [86]. Hidroksitirozolün bir diğer önemli etkisi farklı hücresel yolları aktive ederek oksidatif strese karşı endojen savunmayı arttırmasıdır [77]. HT'nin yüksek antioksidan etkilere sahip olduğu ve antioksidan enzimlerin aktivitesini ve sentezini uyardığı belirtilmektedir [87]. Hidroksitirozolün antioksidan özelliği sayesinde glukoz ve lipid homeostazını

etkilediğini ve diyabete karşı koruyabileceği belirtilmektedir [11, 88]. HT, kardiyoprotektif, antikanser, nöroprotektif, antiinflamatuar aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahiptir [11]. Bunlarla birlikte HT oksidatif stres, inflamasyon, hiperglisemi ve hiperlipidemiye karşı koruyucu etkilerde göstermiştir [83]. Ayrıca HT, diyabetik testiküler hasarda oksidatif stresin sebep olduğu DNA hasarını ve apoptotik indeksi azalttığı bildirilmiş ve bunların yanı sıra, diyabetin neden olduğu histopatolojik hasarı düzeltmiştir [8]. İnsanlar üzerindeki birçok yararlı etkileri ve biyolojik aktiviteleri araştırıldıkça hidroksitirosolün yeni birçok etkisi ortaya çıkmaktadır [76].



Şekil 3.7. Hidroksitirozolün kimyasal yapısı [89].

3.9. DİABETES MELLİTUS İLE HİDROKSİTİROZOL İLİŞKİSİ

İnsülin sekresyonu, insülin direnci ve pankreas β-hücrelerinin dejenerasyonu ile diabetes mellitus ortaya çıkmaktadır [30]. Diyabetin en yaygın komplikasyonu olan hiperglisemiye bağlı vücuttaki homeostazın bozulması reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini ve serbest radikalleri arttırır. Hiperglisemiye bağlı bu artış oksidasyon-redüksiyon dengesinin bozulmasına ve hücresel aktivitelerin yok olmasına sebep olur [44]. Ancak antioksidan özelliğe sahip polifenoller, oksidatif stresi baskılayarak hastalığın ilerlemesini önlerler. Antioksidan bileşiklerin en önemli kaynaklarından biri akdeniz diyetidin ana kaynağı sızma zeytinyağıdır. Zeytinyağının antioksidan özellikleri bilinmekle birlikte polifenolik bileşiklerdir ve en önemli bileşeni hidroksitirozoldür. HT'nin antioksidan özelliği sayesinde diyabet gibi hastalıkların önlenmesine katkı sağlar [90, 91]. Ayrıca HT, insülin sekresyonunda anahtar rol oynayan kalsiyum kanallarını düzenler [92]. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, sağlıklı bir diyet ve normal vücut ağırlığının korunması, DM'nin başlamasını önlemek veya geciktirmek için temel bir uygulamadır [84]. HT'nin testiküler histopatolojik yapıyı restore ettiğini ve oksidatif DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca HT ile tedavi edilen

diyabetik testisde sperm sayısında ve sertoli hücrelerinde artış, morfoloji ve hareketliliğinde ise düzelme görülmüştür [8]. HT'nin önemli faaliyetlerinden biri de oksidatif strese karşı endojen savunmayı arttırmasıdır [77]. Tip 1 diyabetin retina hasarına neden olduğu bir çalışmada, hidroksitirozolün hasarı yavaşlattığı ve bazı kardiyovasküler bulgularda da iyileştirici özelliği belirtilmiştir. Ayrıca tip 2 diyabetin neden olduğu karbonhidrat metabolizmanın değişiminde de HT'nin yararlı etkileri gösterilmiştir [32]. Hamden ve arkadaşlarının STZ ile indüklenmiş bir diyabetik deneyde, STZ kaynaklı artan bağırsak enzimlerini hidroksitirozolün etkisiyle azaldığını göstermişlerdir [83].

3.10. TSSK6

Hücre bölünmesi, büyümesi, yapışması, göçü, metabolik aktivite ve çevresel uyaranlara verilen yanıtlar, hücreden hücreye iletişim, sinyal iletimi ve apoptoz protein kinazlar tarafından düzenlenen süreçlerdir [93]. Protein kinazlar, yaklaşık 300 amino asitlik homolog bölge ile karakterize edilen büyük bir enzim ailesini oluşturur [94]. Yapılan birçok çalışmada testiste de bir dizi protein kinazın varlığı ve bunların birçoğunun erkek fertilitesinde önemli olduğu ortaya çıkmıştır [5, 95]. Testiste bulunan protien kinazlar ise testis spesifik serin kinaz (Tssk) ailesidir. Tssk ailesi sperm farklılaşması, kapasitasyonu ve döllenmesinde rol oynamaktadırlar [96]. Tssk protein ailesi testise özgüdür ve germ hücrelerinde postmiyotik olarak eksprese edilir. Bu protein ailesi, kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinazlar süper ailesi içinde yer alan 5' adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK) ailesine aittir ve Tssk1, Tssk2, Tssk3, Tssk4, Tssk5 ve Tssk6 olmak üzere altı üyeden oluşmaktadır [93, 96]. 1994 yılında protein kinaz ailesi üzerine araştırmalar yapan Ziemiecki ve arkadaşları bozulmuş bir primer stratejisi kullanarak Tssk1'i tanımlamışlardır ve bunun üzerinden devam ederek ailenin diğer beş üyesini daha tanımlamışlardır. Tssk2 ve Tssk6 proteinleri sadece spermatidlerde, Tssk1 ve Tssk4 proteinleri ise spermatogonyumlarda tespit edilmiştir. Tssk6, testise özgü serin kinaz protein ailesinin bir üyesidir ve erkek germ hücrelerinde postmiyotik olarak eksprese edilir [12]. Tssk6, Tssk ailesindeki en küçük kinazlardan biridir [95] ve insan ile fare testislerinin spermatidlerinde bulunmaktadır [93]. Tssk6 273 amino asidi kodlayan yalnızca bir ekson ile 19p13.11 ile eşlenir [73]. AMPK ailesi üyesi olan Tssk'ların aktive olabilmeleri için kinaz bölgesindeki T–halkası olarak bilinen korunmuş bir tireonin kalıntısının fosforile edilmesi gerekir. Ancak Tssk6'nın

aktive olabilmesi için özel bir kinaza ihtiyaç yoktur. Tssk6, T–halkası tireonin kalıntısının otofosforilasyonu ile aktive edilir [8, 12, 96]. Tssk6 aktive olduğunda ısı şoku proteinleri HSP70 ve HSP90 ile etkileşime girerek proteazoma bağlı bozulmaya karşı koruduğu bildirilmiştir [93]. Tssk6 proteini sperm DNA yoğunlaşması ve kromatinin yeniden şekillenmesinde temel bir rol alarak spermiyogenez ve işlevsel sperm üretimi için gerekli olan histon – protamin değişimine önemli katkı sağlar [5]. Bu katkıyı Tssk6 proteini *in vitro* olarak H1, H2A, H2AX ve H3 histonlarını fosforile ederek sağlar [73, 93]. Ayrıca H2AX'in histondan protamine geçişinin ve erkek fertilitesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Eğer ki *Tssk6* geni yoksa H2AX fosforilasyonu bloke olur ve böylece spermatogenez tamamlanamaz [97, 98]. *Tssk6* geninin downregüle edilmesiile sperm sayısında azalma, bozulmuş DNA yoğunlaşması, spermatozoa motilitesinde azalma, anormal spermiyogenez ve sperm morfolojisindeki dejenerasyon sebebiyle erkek infertilitesi gözlenmiştir [73, 93].

3.11. TSSK6 İLE TESTİS İLİŞKİSİ

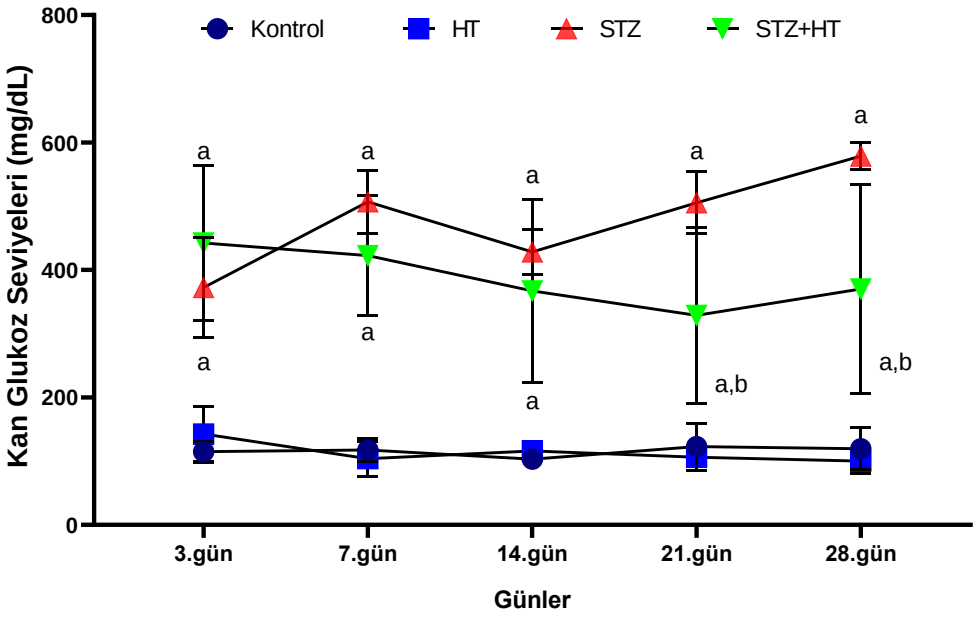
Testis dokusunda birçok protein kinaz bulunmaktadır. Yapılan araştırmalara göre protein kinazların erkek fertilitesinde önemli olduğu belirtilmiştir [5, 95]. Tssk6 memelilerde yüksek oranda korunan ve spermatogenez için testise gerekli olan testise özgü bir protein kinazdır [97]. Tssk6 geninin erkek farelerde susturulması sonrası, kısırlığa sebep olduğu ve sperm sayısının azaldığı, sperm hareketliliğinin azaldığı, anormal şekilli sperm yüzdesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir [93]. Tssk6 null fareler, DNA yoğunlaşma kusurları ve anormal morfoloji ve azalmış motiliteye sahip spermleri ortaya çıkarır. Tssk6, germ hücrelerinde postmiyotik olarak eksprese edilir [12]. Tssk6, spermiyogenez sırasında γH2AX oluşumu için gereklidir. γH2AX histondan protamin geçişi sağlayan ve erkek infertilitesi ile bağlantılı bir komplekstir [97]. Tssk6'nın sperm DNA yoğunlaşması ve kromatin yeniden şekillenmesinde temel bir rolü vardır [5]. Tssk6 proteinlerinin fare testisinde erken ve geç spermatidlerde ekspre olduğu tespit edilmiştir [99].

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Kan Glukoz Ölçüm Bulguları

Diyabet oluşturulan grupların kan glukoz değerleri streptozotosinuygulamasından 48 saat sonra glikometre cihazı ile ölçüldü. Ölçüm sonuçlarına göre kan-glukoz değerleri 250 mg/dL ve üstü olan ratlar diyabet olarak kabul edildi. Glikometer cihazının ölçüm aralığı 20-600 mg/dL olması nedeniyle kan-glukoz ölçümleri high çıkan ratların sonuçları 600mg/dL olarak kabul edildi. Deney süresi boyunca tüm grupların kan-glukoz düzeylerindeki değişimŞekil 4.1'de gösterilmektedir.

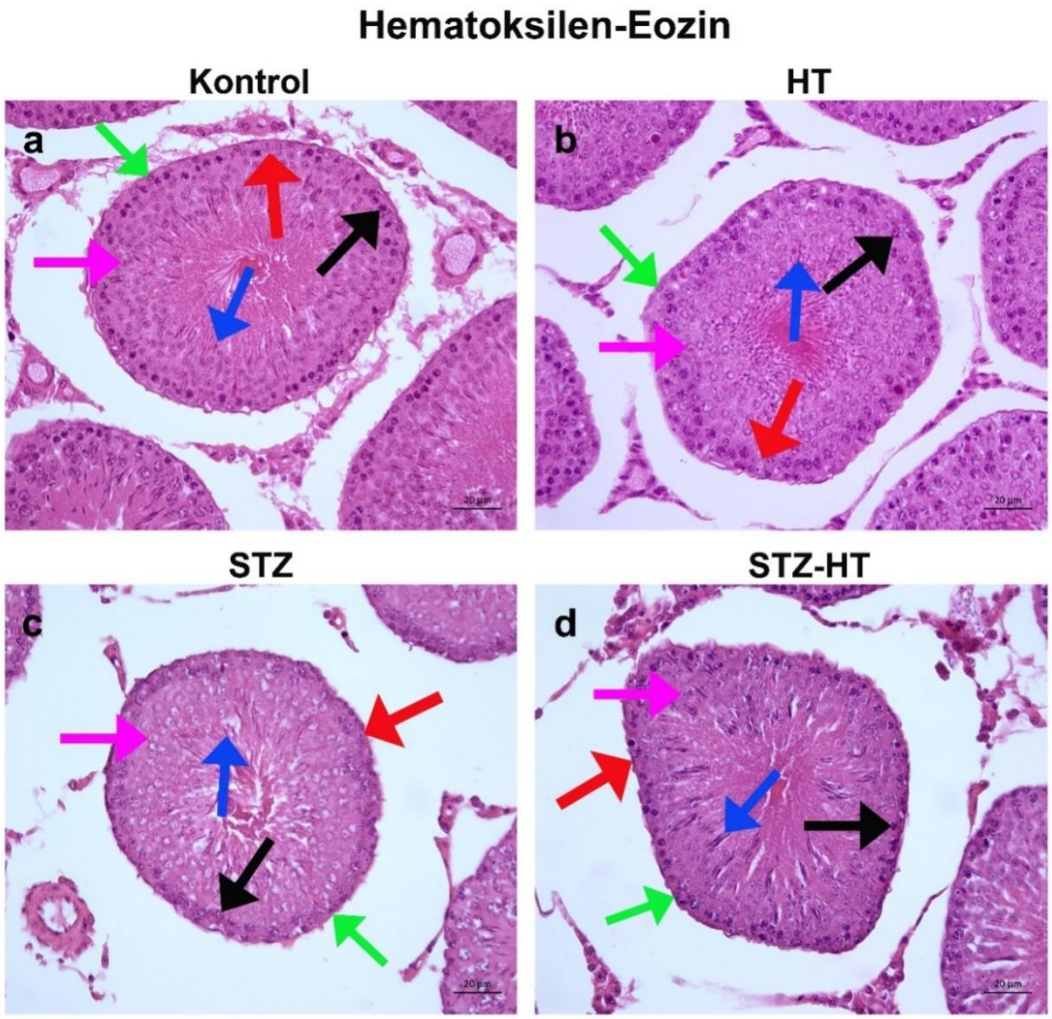


Şekil 4.1. Grupların deney süresince kan-glukoz seviyeleri. Deney sonucunda kan-glukoz seviyelerinin analizi karşılaştırıldığında; Kontrol ile HT grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0.05$). STZ ile STZ+HT grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0.05$). STZ grubu, Kontrol ve HT grupları arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0.05$). (a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı, b ise STZ'ye göre anlamlılığı gösterir.)

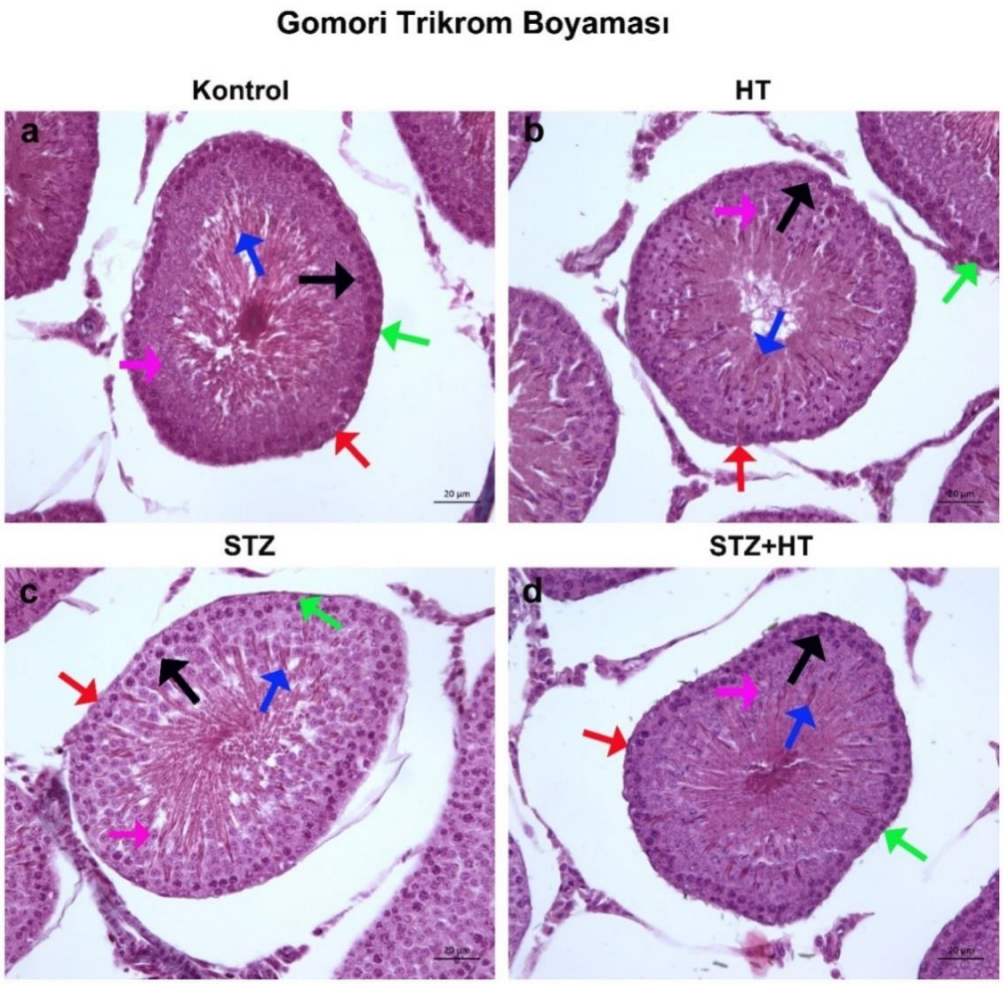
Deney süresince ölçülen kan-glukoz değerleri two-wayrepeated measures ANOVA testi ile analiz edildi. Grupların 3, 7, 14, 21 ve 28.gün kan-glukoz seviyeleri değerlendirildiğinde; kontrol ve HT grupları arasında kan glukoz seviyeleri yönünden istatiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (sırasıyla; p=0.999, p=0.999)(Şekil 4.1).AncakSTZ ve STZ+HT grupları kan glukoz seviyelerinde kontrol ve HT gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.1). 3, 7 ve 14. günler kan glukoz ölçümlerinde STZ ve STZ+HT grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (sırasıyla; $p=0.993$, $p=0.955$, $p=0.998$) (Şekil 4.1). Ancak 21 ve 28. gün ölçümlerinde STZ ile STZ+HT grupları arasında anlamlı bir fark vardı ($p<0.05$) (Şekil 4.1). STZ+HT grubu 21. ve 28. gün ölçümlerinde, streptozotosin ile artan kan-glukoz seviyesi, hidroksitirozol uygulanması ile anlamlı bir şekildi düştüğü gözlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.1).

4.1.2. Histopatolojik Bulgular

Testis dokusunda meydana gelen morfolojik değişimleri göstermek amacı ile hematoksilen&eozin ve gomori trikrom boyamaları yapıldı. Her iki boyamanın incelemesinde de kontrol ve HT grupları hücrelerinin histolojik yapısı ve sitoplazmasında herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.2.a, Şekil 4.2.b, Şekil 4.3.a ve Şekil 4.3.b). Ancak STZ grubunun germinal epitelindeki hücre sayısında, sitoplazmik boyanma yoğunluklarında azalma ve leydig hücre sayısında azalma gözlendi. Özellikle erken spermatitlerin nukleusunun dejenere olduğu gözlendi (Şekil 4.2.c ve Şekil 4.3.c). Hidroksitirozol uygulanan STZ+HT grubu hücrelerinde sayısal azalma devam etse de hücre nükleuslarında gözlenen dejenerasyonun düzeldiği ve sitoplazmik boyanma yoğunluklarının normal olduğu gözlendi (Şekil 4.2.d ve Şekil 4.3.d).



Şekil 4.2. Farklı grupların testis dokusunun hematoksilen&eozin boyaması temsili fotoğrafları. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. Yeşil ok; spermatogonyum hücresi, kırmızı ok; sertoli hücresi, siyah ok; primer spermatosit, pembe ok; erken spermatid ve mavi ok; geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.

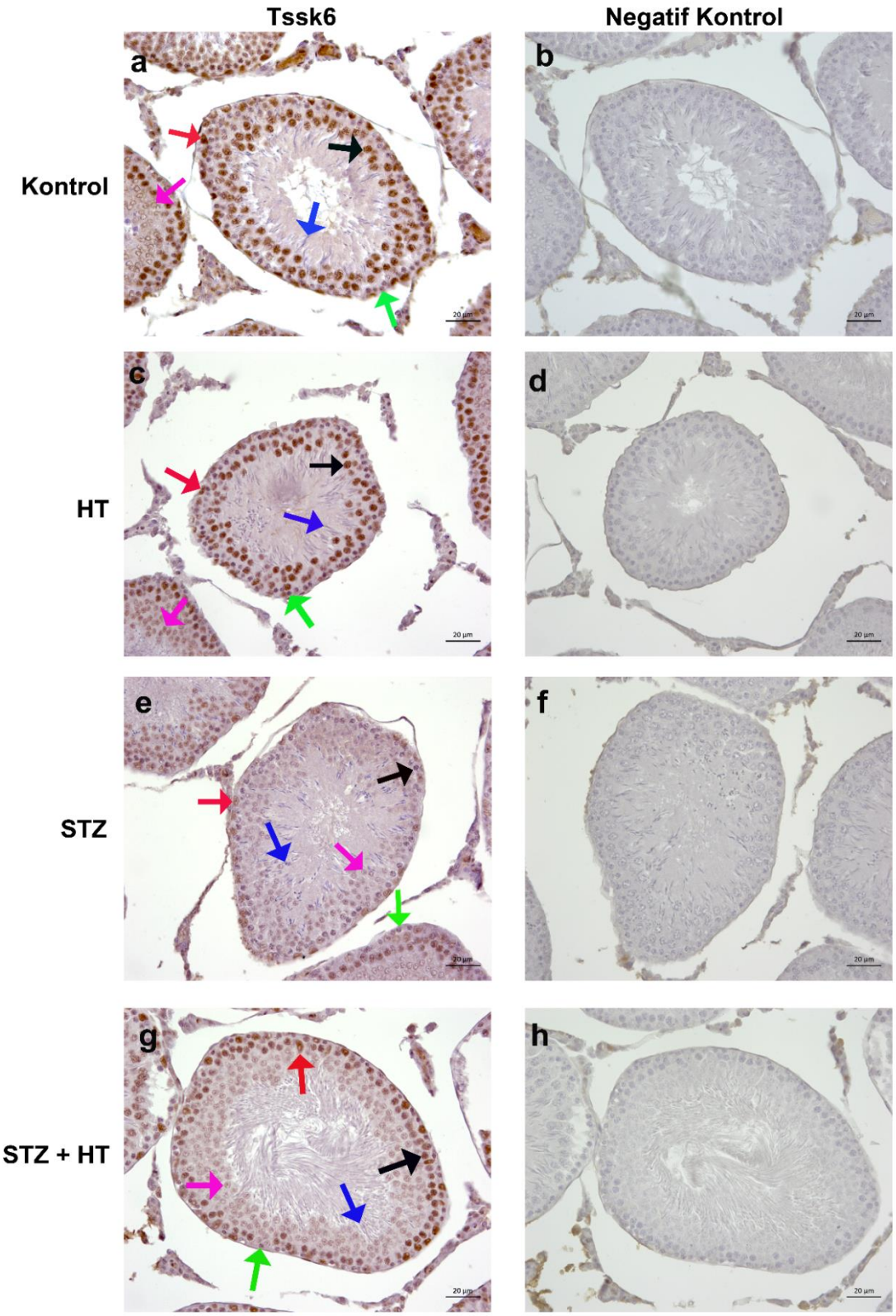


Şekil 4.3. Farklı grupların testis dokusunun gomori trikrom boyaması temsili fotoğrafları. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. Yeşil ok; spermatogonyum hücresi, kırmızı ok; sertoli hücresi, siyah ok; primer spermatosit, pembe ok; erken spermatid,ve mavi ok; geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.

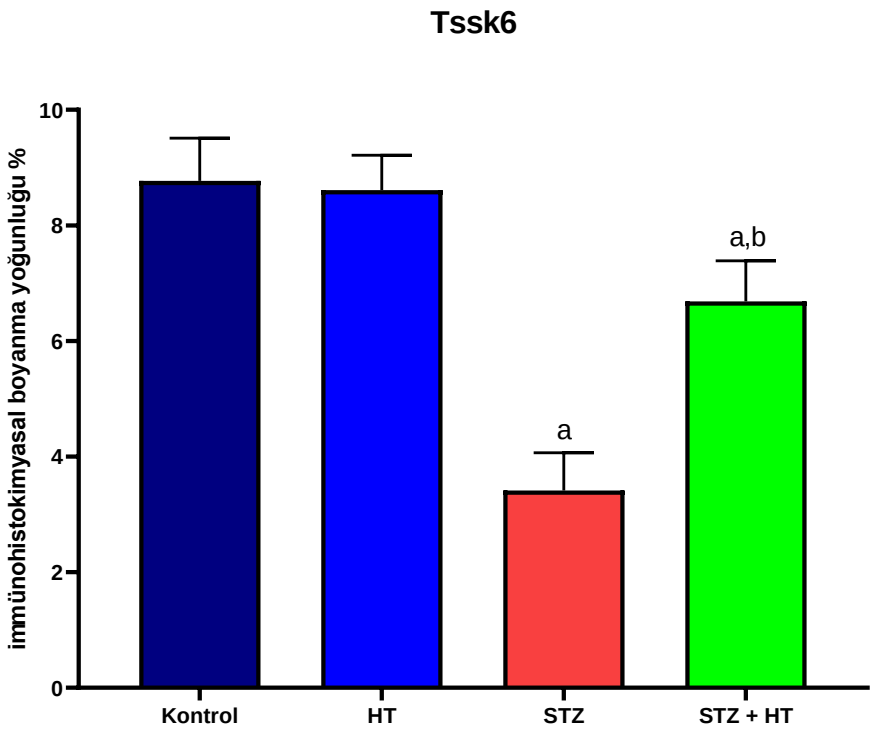
4.1.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal olarak boyanan dokuların fotoğrafları Olympus Cx41 mikroskopta AxioCam Zeiss dijital kamera ileçekildi. ImageJ programı kullanarak immünohistokimyasal boyanma yüzdeleri hesaplandı. Daha sonra elde edilen veriler GraphPad Prism 8 InStat analiz programında değerlendirildi. Elde edilen tüm veriler one-way ANOVA'yı takiben Holm-Sidak metodu kullanılarak gruplar arası farklılıklar incelendi. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ kabul edilerek Tssk6 antikoru için analiz yapıldı.Testisde Tssk6 ekspresyonu nükleardı. Özellikle Tssk6 ekspresyonu primer spermatositler ve sertoli hücrelerinin nükleuslarında dikkat çekiciydi. Kontrol ve HT grupları arasında Tssk6 ekspresyonu yönünden istatiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (p=0.666) (Şekil 4.4.a-d ve Şekil 4.5).

Kontrol ve HT grupları Tssk6 ekspresyonunun hücresel dağılımı primer spermatosit ve sertoli hücrelerinde çok yoğun pozitif, erken spermatidlerde zayıf pozitif ve spermatogonyum ve geç spermatidlerde negatifti (Şekil 4.4.a-d). STZ ve STZ+HT gruplarında Tssk6 ekspresyonu kontrol ve HT gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı ($p<0.05$) (Şekil 4.4.e-h ve Şekil 4.5). STZ grubu Tssk6 ekspresyonunun hücresel dağılımı primer spermatosit, sertoli hücreleri ve erken spermatidlerde zayıf pozitif iken, spermatogonyum ve geç spermatidlerde negatifti (Şekil 4.4.e). Tssk6 ekspresyonu STZ+HT grubunda, STZ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı ($p<0.05$) (Şekil 4.4.e ve g, Şekil 4.5). STZ+HT grubu Tssk6 ekspresyonunun hücresel dağılımı primer spermatosit ve sertoli hücrelerinde yoğun pozitif, erken spermatidlerde zayıf pozitif ve spermatogonyum ve geç spermatidlerde ise negatifti (Şekil 4.4.g).



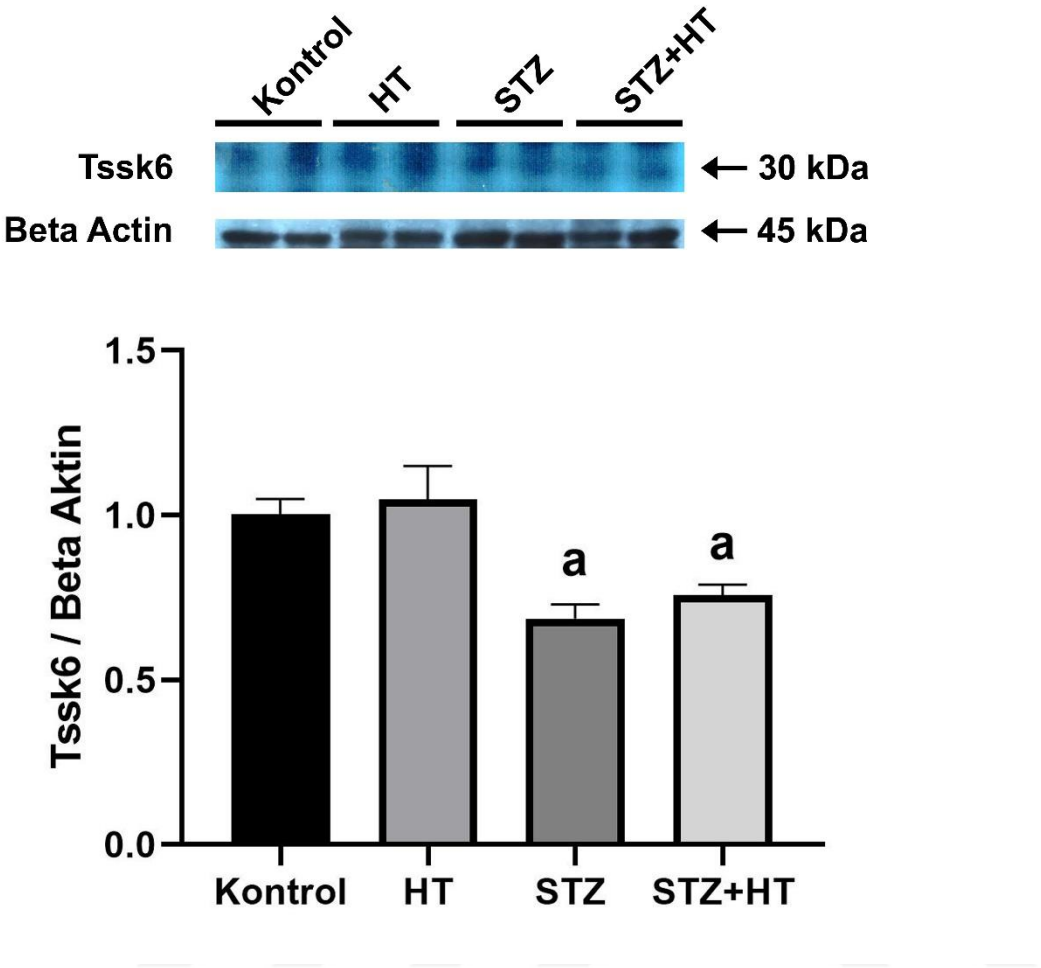
Şekil 4.4.Farklı gruplardaki Tssk6 immunohistokimyasal boyamasının temsili fotoğrafları. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin. Yeşil ok; spermatogonyum hücresi, kırmızı ok; sertoli hücresi, Siyah ok; primer spermatosit, pembe ok; erken spermatid, ve mavi ok; geç spermatid'i göstermektedir. Görüntü büyütmesi 400x'dir ve skala bar 20 µm'dir.



Şekil 4.5. Testis dokusunda Tssk6 proteinin immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği.a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı,b ise STZ'ye göre anlamlılığı gösterir. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin.

4.1.4. Western Blot Bulguları

Tssk6 proteinin western blot bulguları immunohistokimya bulguları ile benzerdi. Tssk6 protein seviyesi kontrol ve HT gruplarında benzerdi ($p>0.05$) (Şekil 4.6). STZ ve STZ+HT grupları Tssk6 protein seviyesi kontrol ve HT grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.05$) (Şekil 4.6). STZ+HT grubu Tssk6 protein seviyesinde STZ grubuna kıyasla az bir artış gözlensede bu artış anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 4.6). STZ+HT ve STZ grupları Tssk6 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Tssk6 protein seviyesinin Western blot analizi. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. a, Kontrol ve HT'ye göre anlamlılığı gösterir. HT; hidroksitirozol, STZ; streptozotosin.

4.2. TARTIŞMA

Diabetes mellitus (DM), pankreatik β hücre disfonksiyonuna bağlı olarak yetersiz insülin sekresyonuna neden olan, düzensiz bir şekilde yükselen hiperglisemi ile karakterize yaygın kronik bozukluklardan biridir [72].Dünya çapında en yaygın hastalık olan DM, dünya nüfusunun %6.1'ini etkiler [32].Dünyada yaklaşık 382 milyon insan diyabet hastasıdır ve bunların yaklaşık %10'unu tip 1 diyabetes mellitus (T1DM) oluşturur [70].DM, testisdahil bir çok organda oksidatif strese bağlı olarak hasara neden olmaktadır[36].Diabetes mellitus, anormal spermatogenez, testislerde apoptotik değişiklikler, spermatozoa sayısında azalmave hareket kabiliyetinde bozulma, düşük testosteron düzeyi, sperm sayısındaki değişiklikler ve kusurlu sperm morfolojileri

yoluyla erkek üreme sistemi işlev bozukluklarına yol açabilen kronik bir hastalıktır [70, 72]. Hidroksitirozol zeytin ve zeytinyağında bulunan antioksidatif ve antiinflamatuar etkinliği bilinen polifenolik bir bileşiktir [77, 81, 82]. HT'nin testiküler histopatolojik yapıyı restore ettiği ve oksidatif DNA hasarı ve apoptotik indeksi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.HT ile tedavi edilen diyabetik ratlardasertoli hücresi vimentin, miyoid hücre α-SMA ve androjen reseptörü ekspresyonunun oldukça arttığı bildirilmiştir.Ayrıca HT ile tedavi edilen diyabetik testisde sperm sayısında artış, morfoloji ve hareketliliğinde ise düzelme görülmüştür [8]. Bizde bu çalışmada streptozotosin ile indüklenmiş tip 1 diyabet ratlarda antioksidatif ve antiiflamatuar etkinliği bilinen hidroksitirozolün, erkek fertilitesi için önemli olan Tssk6 proteini ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. Hidroksitirozolün diyabetik testiste histopatolojik bulguları düzelttiği ve Tssk6 proteinin ekspresyonunu hücresel düzeyde artırdığını belirledik.

Bu çalışmada kontrol ve HT grupları kan glukoz seviyesi benzer iken, STZ ve STZ+HT gruplarında ciddi anlamda artmıştır. Streptozotosin, memeli pankreatik beta hücreleri için özellikle toksiktir. Beta hücrelerine karşı yüksek toksisitesi nedeniyle, streptozotosin bilimsel çalışmalarda deney hayvanlarında diyabeti indüklemek için kullanılmıştır [15]. Streptozotosin, pankreasın beta hücrelerinde apoptoza bağlı langerhans adacıklarında hücre kütlesini azaltması nedeniyle insülin yetersizliği ortaya çıkar ve kan glukoz seviyelerinde büyük bir artışa yol açar [42, 43]. Bu çalışmada da streptozotosinin olumsuz etkilerinden dolayı STZ ve STZ+HT gruplarında kan glukoz seviyeleri artmıştır. Hidroksitirozolün STZ+HT grubunda kan glukoz seviyelerini21. ve 28. günlerde STZ grubuna göre düşürdüğünü gözlemledik.Daha önce yapılan çalışmalarda hidroksitirozol'ün diyabetik sıçanlarda kan şekerini yaklaşık %50 oranında düşürdüğü ve endoplazmik retikulum stresini hafifleterek tüm vücudun glukoz hemostazisini sağladığı gösterilmiştir [100, 101]. Bu çalışmada da hidroksitirozolün, özellikle 21. ve 28. günlerde etkinliğinin en üst düzeye çıkmasıyla STZ+HT grubunda kan glukozunu düşürmüş ve endoplazmik retikulum stresini hafifleterek glukoz hemostazisini sağlamış olabilir.

Bu çalışmada hematoksilen&eozin ve gomori trikrom boyamaları ile yapılan histopatolojik incelemelerde kontrol ve HT grupları dokuları ve hücrelerinde anormal bir değişim gözlenmedi. Ancak STZ grubunda seminifer epitel duvarında incelme, tüm hücrelerin sitoplazmik boyanma yoğunluğunda azalma ve özellikle erken spermatitlerin

nukleuslarında dejenerasyon dikkat çekti. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik rattestislerinde serum testosteron düzeyinde bozulma, FSH ve LH düzeylerinde bozulma, leydig hücre sayısında azalma ve testis dokusunda değişen derecelerde lezyonlar tespit edilmiştir [13, 44, 68, 69]. Bunlara ek olarak DM'nin sertoli hücrelerinde de apoptoza neden olduğu bildirilmiştir [8]. Bu çalışmada da STZ grubunda gözlenen testis dokusundaki anormal histolojik yapı, hücre sayılarında azalma streptozotosinin testis üzerine yaptığı olumsuz etkilerden kaynaklı olabilir. Hidroksitirozol ile tedavi edilen STZ+HT grubunda ise hücre sayılarının arttığı, sitoplazma yoğunluklarının normale döndüğü ve erken spermatid nükleuslarında gözlenen dejenerayon bölgelerinin kaybolduğu gözlendi. HT'nin testiküler histopatolojik yapıyı restore ettiği ve oksidatif DNA hasarı ve apoptotik indeksi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. HT ile tedavi edilen diyabetik ratlardasertoli hücresi vimentin, miyoid hücre α-SMA ve androjen reseptörü ekspresyonunun oldukça arttığı bildirilmiştir. Ayrıca HT ile tedavi edilen diyabetik testisde sperm sayısında artış, morfoloji ve hareketliliğinde ise düzelme görülmüştür [8].Bu çalışmada da hidroksitirozolün STZ+HT grubunda gözlenen olumlu etkilerini, sertoli ve miyoid hücreleri olumlu yönde etkileyerek, testisde sperm sayısını arttırarak, anormal sperm morfolojisi ve hareketliliğinde düzelme sağlayarak yapıyor olabilir.

Bu çalışmada Tssk6 proteinin ekspresyonu kontrol ve HT grubunda aynıydı. Ancak diyabet oluşturmak için streptozotosin uygulanan STZ grubunda Tssk6 protein ekspresyonu kontrol ve HT gruplarına göre önemli oranda azalmıştır. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik rat testislerinde serum testosteron düzeyinde bozulma, FSH ve LH düzeylerinde bozulma, leydig hücre sayısında azalma ve testis dokusunda değişen derecelerde lezyonlar tespit edilmiştir [13, 44, 68, 69]. Ayrıca diyabetin testis hücrelerinde oksidatif stresi arttırdığı bildirilmiştir. Artan oksidatif stres ile birlikte testis hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi meydana gelir [30, 47]. Reaktif oksijen türlerindeki artış, oksidasyon-redüksiyon dengesinin bozulmasıyla sperm üretiminde bozulmalara neden olur [44, 71]. Bunlara ek olarak oksidatif stres spermin hareketliliğinde azalmaya ve seminifer tübüllerin epitelinde morfolojik bozukluklara neden olmaktadır [30, 53, 73]. Tssk6 geninin erkek farelerde susturulması,kısırlığa, sperm sayısındave hareketliliğinde azalmaya, anormal şekilli sperm yüzdesinde önemli ölçüde artışa neden olur [93]. Tssk6 null fareler, DNA yoğunlaşma kusurları ve anormal morfoloji ve azalmış motiliteye sahip spermleri ortaya çıkarır [12]. Bu çalışmanın Tssk6

sonuçlarını yukarıda verilen literatür bilgisine göre değerlendirdiğimizde, streptozotosin testiste ya doğrudan Tssk6 protein ekspresyonunu azaltarak yada oluşan diyabete bağlı ortaya çıkan oksidatif stresten kaynaklı sperm üretiminde bozulmalara, sperm sayısında ve hareketliliğinde azalmaya, anormal şekilli sperm yüzdesinde önemli ölçüde artışa, leydig hücre sayısında azalmayave testis dokusunda değişen derecelerde lezyonlara sebep oluyor olabilir. Hidroksitirozol ile tedavi edilen STZ+HT grubu Tssk6 ekspresyonu hücresel düzeyde STZ grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır. Özellikle sertoli hücreleri ve primer spermatositlerde Tssk6 protein ekspresyon artışı gözlemlenmiştir.Hidroksitirozol testiküler histopatolojik yapıyı restore eder ve oksidatif DNA hasarını ve apoptotik indeksi önemli ölçüde azaltır. Ayrıca hidroksitirozol ile tedavi, diyabetik testisde sperm sayısında artış, sperm morfoloji ve hareketliliğinde ise düzelme sağlar [8]. Tssk6, spermiyogenez sırasında, histondan protamin geçişi sağlayarak erkek fertilitesine katkı sağlayan γH2AX oluşumu sağlar [97]. Tssk6'nın sperm DNA yoğunlaşması ve kromatin yeniden şekillenmesinde temel bir rolü vardır [5]. Sonuç olarak hidroksitirozol diyabetik testisteki sperm sayısında artışı, sperm morfoloji ve hareketliliğindeki düzelmeyi oksidatif stresi azaltarak Tssk6 proteinin ekspresyonunu artırarak yapıyor olabilir.

STZ ve STZ+HT grupları arasında Western blot bulguları ile immünohistokimyasal bulgular arasında benzerlik gözlenmiştir. Ancak immünohistokimyasal bulguların sonucunda STZ+HT grubunda Tssk6 ekspresyonunda STZ'ye göre anlamlı bir artış gözlenirken western blot bulgularındaki artış anlamlı değildi. Bunun nedeni de immünohistokimyasal bulgularda sertoli hücreleri ve primer spermatositlerde gözlenen Tssk6 ekspresyon yoğunluğunun bulunduğu bölgenin etrafına oranlaması ile bulunurken, western blot bulgularında testis dokusunun dış katmanlarınında dahil olduğu tümünden protein izolasyonu sağlanması ve Tssk6 proteinin tüm doku beta aktinine orantılanması istatistiksel anlamlalığın ortaya çıkmamasına sebep olmuş olabilir.

5. SONUÇ

Bu çalışma ile tip 1 diabetes mellitus (T1DM) oluşturulmuş ratlarda hidroksitirozolün kan glukoz seviyesindeki düşürücü etkisi tekrar ortaya koyulmuştur. Ayrıca T1DM'de hidroksitirozol'ün sertoli hücreleri ve primer spermatositlerde Tssk6 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Testisi oksidatif strese karşı koruyan ve testiküler apoptozu inhibe etmede önemli rol alan hidroksitirozolün, erkek fertilitesinde önemi son yıllarda anlaşılan Tssk6 ekspresyonunu artırarak infertiliyi azaltabileceği öngörülmüştür.

Zeytin ve zeytinyağında bol bulunan hidroksitirozol'ün kan glukoz seviyesini düşürmesi ve sperm kalitesini etkileyen Tssk6 ekspresyonunu artırması, Akdeniz diyetinin bol tüketildiği bölgelerdeki erkek diyabet hastalarının sperm sayı, kalite ve fertilitesinin diğer bölgelere göre daha yüksek olabileceğini düşündürdü. Ancak bu düşüncenin gerçekliğinin ortaya koyulabilmesi için bu diyeti tüketen diyabetik erkek bireylerde sperm analizleri yapılması gerekir. Dolayısıyla hidroksitrozolün insanlarda etkinliğini kanıtlayabilmek için bu alanda birçok klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

[1] M. Nawrot, S. Peschard, S. Lestavel, & B. Staels, "Intestine-liver crosstalk in type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease", *Metabolism,* c. 123 ss. 154844, Eki. 2021.

[2] P. Zhang, T. Li, X. Wu, E.C. Nice, C. Huang, & Y. Zhang, "Oxidative stress and diabetes: Antioxidative strategies", *Front Med,* c. 14, sayı 5, ss. 583-600, Eki. 2020.

[3] R. Schmatz, L.B. Perreira, N. Stefanello, C, Mazzanti, R. Spanevello, J. Gutierres, …, & V.M. Morsch, "Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats", *Biochimie,* c. 94, sayı 2, ss. 374-83, Şub. 2012.

[4] Y.B. Donmez, G. Kizilay, & Y. Topcu-Tarladacalisir, "MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testis", *Acta Cir Bras,* c. 29, sayı 6, ss. 644-50, Eki. 2014.

[5] A.M. Salicioni, M.G. Gervasi, J. Sosnik, D. Tourzani, S. Nayyab, D.A. Caraballo, … & P.E. Visconti, "Testis-specific serine kinase protein family in male fertility and as targets for non-hormonal male contraceptiondagger", *Biol Reprod,* c.103, sayı 2, ss. 264-274, Ağu. 2020.

[6] X. Xue, L. Zhang, Y. Li, H. Wei, S. Wu, T. Liu, …, & Z. Bao, "Expression of the testis-specific serine/threonine kinases suggests their role in spermiogenesis of bay scallop argopecten irradians", *Front Physiol,* c. 12, ss. 657559, Mar. 2021.

[7] E. Ghanbari, M.R. Khazaei, P. Ahangar, & M. Khazaei, "Crab shell extract ımproves sperm parameters and antioxidant status in testes of diabetic rats", *J Diet Suppl,* c. 16, sayı 2, ss. 215-226, Nis. 2019.

[8] A.E. Alsemeh, M.A. Samak, & S.S.A. El-Fatah, "Therapeutic prospects of

hydroxytyrosol on experimentally induced diabetic testicular damage: Potential interplay with AMPK expression", *Cell Tissue Res,* c. 380, sayı 1, ss. 173-189, Nis. 2020.

[9] L. Martinez, G. Ros, & G. Nieto, "Hydroxytyrosol: Health benefits and use as functional ıngredient in meat", *Medicines (Basel),* c. 5, sayı 1, ss. 13 Ocak 2018.

[10] S. Pan, L. Liu, H. Pan, Y. Ma, D. Wang, K. Kang, …,& H. Jiang, "Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice", *Mol Nutr Food Res,* c. 57, sayı 7, ss. 1218-27, Tem. 2013.

[11] H.A.A. Elmaksoud, M.H. Motawea, A.A. Desoky, M.G. Elharrif, & A. Ibrahimi, "Hydroxytyrosol alleviate intestinal inflammation, oxidative stress and apoptosis resulted in ulcerative colitis", *Biomed Pharmacother,* c. 142, ss. 112073, Eki. 2021.

[12] J. Sosnik, P.V. Miranda, N.A. Spiridonov, S.Y. Yoon, R.A. Fissore, G.R. Johnson, …, & P.E. Visconti, "Tssk6 is required for izumo relocalization and gamete fusion in the mouse", *J Cell Sci,* c. 122, sayı 15, ss. 2741-9, Ağu. 2009.

[13] T.S. Omolaoye, B.T. Skosana, & S.S. du Plessis, "Diabetes mellitus- induction: effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters", *Acta Histochem,* c. 120, sayı 2, ss. 103-109, Şub. 2018.

[14] H. Kolb, "Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice", *Diabetes Metab Rev,* c. 3, sayı 3, ss. 751-78, Tem. 1987.

[15] Z. Cui, Q. Zeng, Y. Guo, S. Liu, & J. Chen, "Integrated bioinformatic changes and analysis of retina with time in diabetic rats", *PeerJ,* c. 16, sayı 6, ss. e4762, May 2018.

[16] K.K. Wu, & Y. Huan, "Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats", *Curr Protoc Pharmacol,* chapter 5, unit 5 47, Mar. 2008.

[17] L.C. Junqueira & J. Carneiro, *Temel Histoloji.* (çev. Y. Aytekin & S. Solakoğlu). 10. baskı. İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri, (Eserin orijinali 2003 yılında yayımlandı), 2006, ss. 43-440.

[18] J.P. Vij, *Kadasne's Textbook of Anatomy (Clinically Oriented) (Volume 2).* Maharashtra, India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2009, ss. 551-554.

[19] K.E. Barrett, S.M. Barman, S. Boitano & H.L. Brooks, *Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi.* (çev. Ü. İşoğlu-Alkaç). 25. baskı. İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri, (Eserin orijinali 2016 yılında yayımlandı), 2018, ss. 417-420.

[20] A.C. Gulton, & J.E. Hall. *Gulton ve Hall Tıbbi Fizyoloji.* (çev. B. Çağlayan Yeğen). 13. baskı. Ankara, Türkiye: Güneş Tıp Kitabevleri, Eserin orijinali 2001 yılında yayımlandı), 2017, ss.1021-1028.

[21] E. Ağar, *İnsan Fizyolojisi.* 1. baskı. İstanbul, Türkiye: Medikal Sağlık ve Yayıncılık, 2021. ss.985-990.

[22] T.W. Sadler, *Lagman's Medical Embriyology*. 13. baskı. Delaware, USA: Lippincott Williams And Wikins/Wolters Kluwer Health, 2015, ss.261-263.

[23] K.M. Moore & T.V.N. Persaud, *Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi.* (çev. M. Yıldırım, İ. Okar, & H. Dalçık). 6. baskı. İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002, ss. 323-325.

[24] A.L. Kierszenbaum, & L.L. Tres, *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 4. baskı. New York, USA: Elsevier Inc. of New York: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2009, ss. 611-631.

[25] M.H. Ross, & W. Pawlina, *Histology: A Text And Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology.* 7. baskı. Philadelphia, USA: Lippicott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health, 2001, ss. 784-802.

[26] L.P. Gartner, & J.L. Hiatt, *Concise Histology*. 3. baskı. Philadelphia, USA: Baltimore, Maryland, an imprint of Elsevier Inc. 2007, ss. 286-295.

[27] V.P. Eroschenko, *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations.* 12. baskı. Philadelphia, USA: Lippincott Williams And Wikins/Wolters Kluwer Health, 2001, ss. 477-487.

[28] U.Ç. Arı, & N.N. Kamiloğlu, "Erkek sığırlarda ürogenital sistem anatomisi ve fizyolojisi", *Türkiye Klinikleri,* c. 1, sayı 2, ss. 1-11, 2015.

[29] S.V. Badescu, C. Tataru, L. Kobylinska, E.L. Georgescu, D.M. Zahiu, A.M. Zagrean, …, & L. Zagrean, "The association between diabetes mellitus and depression", *J Med Life,* c. 9, sayı 2, ss. 120-5, Nis. 2016.

[30] V. Caiaffo, B.D.R. de Oliveira, F.B. de Sa, J.E. Neto, & V.A. da S. Junior,

"Marine food protection in testicular damages caused by diabetes mellitus", *Curr Diabetes Rev,* c. 13, sayı 6, ss. 566-572, 2017.

[31] M. Mota, S.G. Popa, E. Mota, A. Mitrea, D. Catrinoiu, D.M. Cheta, …, & A.R. Vlad, "Prevalence of diabetes mellitus and prediabetes in the adult romanian population: Predatorr study", *J Diabetes,* c. 8, sayı 3, ss. 336-44, May. 2016.

[32] M.D. Rodriguez-Perez, J.P.D.L. Cruz, J.A. Gonzalez-Correa, J.A. Lopez-Villodres, M.M. Arrebola, E. Martin-Aurioles, …, & A.B. Oria, "Nephroprotective effect of the virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol in type 1-like experimental diabetes mellitus: relationships with its antioxidant effect", *Antioxidants (Basel),* c. 10, sayı 11, ss.1783, Kas. 2021.

[33] Z, Tao, A. Shi, & J. Zhao, "Epidemiological perspectives of diabetes", *Cell Biochem Biophys,* c. 73, sayı 1, ss. 181-5, Eyl. 2015.

[34] W. He, H. Liu, L. Hu, L. Huang, X. Wang, Q, Zhang, …, & X. Lei, "Icariin improves testicular dysfunction via enhancing proliferation and inhibiting mitochondria-dependent apoptosis pathway in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats", *Reprod Biol Endocrinol,* c. 19, sayı 1, ss. 168, Kas. 2021.

[35] B.K. Bailes, "Diabetes mellitus and its chronic complications", *Aorn J,* c.76, sayı 2, ss. 266-76, Ağu. 2002.

[36] C. Mallidis, B.D. Green, J. Hollis, M. Migaud, E. Amigues, R.A. Browne, …, & N. McClure, "Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus", *Int J Androl,* c. 32, sayı 2, ss. 156-65, Nis. 2009.

[37] J. Harreiter, & M. Roden, "[Diabetes mellitus-definition, classification, diagnosis, screening and prevention (update 2019)]", *Wien Klin Wochenschr,* c. 131, ss. 6-15, May. 2019.

[38] A.M. Schmidt, "Highlighting diabetes mellitus: the epidemic continues", *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* c. 38, sayı 1, ss. e1-e8, Ocak 2018.

[39] J.S. Skyler, R.A. Insel, A. Pugliese, G.L. Bakris, E. Bonifacio, T. Darsow, …, & J.P.H. Wilding, "Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis", *Diabetes,* c. 66, sayı 2, ss. 241-255, Şub. 2017.

[40] A.D. Association, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus", *Diabetes*

Care, c. 36, ek 1, ss. S67-74, Ocak 2013.

[41] Expert Committee on the Diagnosis & Classification of Diabetes Mellitus, "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus", *Diabetes Care*, c. 26, ek 1, ss. S5-20, Ocak 2003.

[42] L. Verma, P.K. Singour, P.K. Chaurasiya, H. Rajak, R.S. Pawar, & U.K. Pati "Effect of ethanolic extract of cassia occidentalis linn. for the management of alloxan-induced diabetic rats", *Pharmacognosy Res*, c. 2, sayı 3, ss. 132-7, May. 2010.

[43] A.H. ElBanna, A.S. Osman, A. Hossny, H. Elbanna, & F.I.A. El-Ela, "Dose-dependent effects of taurine against testicular damage in a streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus rat model", *Int J Immunopathol Pharmacol*, c.37, ss. 3946320231172745, Ocak-Ara. 2023.

[44] M.S. Khattab, T.A.A. Aly, S.M. Mohamed, A.M.M. Naguib, A. Al-Farga, & E.A. Abdel-Rahim, "Hordeum vulgare l. microgreen mitigates reproductive dysfunction and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes and aflatoxicosis in male rats", *Food Sci Nutr*, c. 10, sayı 10, ss. 3355-3367, Tem. 2022.

[45] F. Pacifici, R. Arriga, G.P. Sorice, B. Capuani, M.G. Scioli, D. Pastore, …, & M. Tesauro, "Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes", *Diabetes*, c. 63, sayı 10, ss. 3210-20, Eki. 2014.

[46] N. Fatma, P. Singh, B. Chhunchha, E. Kubo, T. Shinohara, B. Bhargavan, …, & D.P. Singh, "Deficiency of Prdx6 in lens epithelial cells induces ER stress response-mediated impaired homeostasis and apoptosis", *Am J Physiol Cell Physiol*, c. 301, sayı 4, ss. C954-67, Ekim 2011.

[47] S. Amaral, A.J. Moreno, M.S. Santos, R. Seiça, & J.R. Santos, "Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of goto-kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes", *Theriogenology*, c. 66, sayı 9, ss. 2056-67, Ara. 2006.

[48] U. Asmat, K. Abad, & K. Ismail, "Diabetes mellitus and oxidative stress-a concise review", *Saudi Pharm J*, c. 24, sayı 5, ss. 547-553, Eyl. 2016.

[49] A.D. Association, "(2) Classification and diagnosis of diabetes." *Diabetes Care*,

c. 38, ek 1, ss. S8-S16, Ocak 2015.

[50] A. Melmer, & M. Laimer, "Treatment goals in diabetes", *Endocr Dev,* c. 31, sayı 1, ss. 1-27, Ocak 2016.

[51] M.C. Maresch, D.C. Stute, M.G. Alves, P.F. Oliveira, D.M. de Kretser, & T. Linn, "Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: A systematic review", *Hum Reprod Update,* c. 24, sayı 1, ss. 86-105, Ocak 2018.

[52] V. Rodriguez, L. Plavnik, & N.T. de Talamoni, "Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats", *Biomed Pharmacother,* c. 105, ss. 95-102, Eyl. 2018.

[53] E.L. Schoeller, S. Schon, & K.H. Moley, "The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis", *Cell Tissue Res,* c. 349, sayı 3, ss. 839-47, Eyl. 2012.

[54] A. Sampannang, S. Arun, J. Burawat, W. Sukhorum, & S. Lamsaard, "Comparison of male reproductive parameters in mice with type 1 and type 2 diabetes", *Clin Exp Reprod Med,* c. 47, sayı 1, ss. 20-33, Mar. 2020.

[55] M. Wankeu-Nya, A. Florea, S. Balici, P. Watcho, H. Matei, & A. Kamanyi, "Dracaena arborea alleviates ultra-structural spermatogenic alterations in streptozotocin-induced diabetic rats", *BMC Complement Altern Med,* c. 13, ss. 71, Nis. 2013.

[56] J.N. Simas, T.B. Mendes, C.C. Paccola, V. Vendramini, & S.M. Miraglia, "Resveratrol attenuates reproductive alterations in type 1 diabetes-induced rats", *Int J Exp Pathol,* c. 98, sayı 6, ss. 312-328, Ara. 2017.

[57] M. Boronat, V.F. Varillas, P. Saavedra, V. Suarez, E. Bosch, A. Carrillo, …, & F.J. Novoa, "Diabetes mellitus and impaired glucose regulation in the Canary Islands (Spain): Prevalence and associated factors in the adult population of Telde, Gran Canaria", *Diabet Med,* c. 23, sayı 2, ss. 148-55 Şub. 2006.

[58] A. Ranjan, M. Choubey, T. Yada, & A. Krishna, "Nesfatin-1 ameliorates type-2 diabetes-associated reproductive dysfunction in male mice", *J Endocrinol Invest,* c. 43, sayı 4, ss. 515-528, Nis. 2020.

[59] A.D. Association, "Gestational diabetes mellitus", *Diabetes Care,* c. 27, ss. S88, Ocak 2004.

[60] R. Guthrie, & D.W. Guthrie, "Pathophysiology of diabetes mellitus", *Crit Care Nurs Q,* c. 27, sayı 2, ss. 113-25, Nis-Haz. 2004.

[61] A.B.H. Gilmartin, S.H. Ural, & J.T. Repke, "Gestational diabetes mellitus", *Reviews in obstetrics & gynecology,* c. 1, sayı 3, ss. 129-134, Sum. 2008.

[62] R. Wagner, & A. Fritsche, "Reclassification of diabetes mellitus based on pathophysiologic and genetic features", *Dtsch Med Wochenschr,* c. 145, sayı 5, ss. 601-608, May 2020.

[63] G. Ricci, A. Catizone, R. Esposite, F.A. Pisanti, M.T. Vietri, & M. Galdieri, "Diabetic rat testes: Morphological and functional alterations", *Andrologia,* c. 41, sayı 6, Ara. 2009.

[64] H. Chen, E. Murray, A. Sinha, A. Laumas, J. Li, D. Lesmen, …, & F. Chen, "Dissecting mammalian spermatogenesis using spatial transcriptomics", *Cell Rep,* c. 37, sayı 5, Kas. 2021.

[65] X.Y. Tang, Q. Zhang, D.Z. Dai, H.J. Ying, Q.J. Wang & Y. Dai, "Effects of strontium fructose 1,6-diphosphate on expression of apoptosis-related genes and oxidative stress in testes of diabetic rats", *Int J Urol,* c. 15, sayı 3, ss. 251-6, Mar. 2008.

[66] E.L. Schoeller, G. Albanna, A.I. Frolova, & K.H. Moley, "Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility", *Diabetes,* c. 61, sayı 7, Tem. 2012.

[67] P. Facondo, E.D. Lodovico, A. Delbarba, V. Anelli, L.C. Pezzaioli, E. Filippini, …, & A. Ferlin, "The impact of diabetes mellitus type 1 on male fertility: Systematic review and meta-analysis", *Andrology,* c. 10, sayı 3, ss. 426-440, Mar. 2022.

[68] S. Basaria, "Male hypogonadism", *Lancet,* c. 383, sayı 9924, ss. 1250-63, Nis. 2014.

[69] M. Kanter, C. Aktas, & M. Erboga, "Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis", *Food Chem Toxicol,* c. 50, sayı 3-4, ss. 719-25, Mar. 2012.

[70] E.G. Skurikhin, A.V. Pakhomova, O.V. Pershina, V.A. Krupin, N.N. Ermakova, E.S. Pan, …, & A.M. Dygai, "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,* c. 164, sayı 2, ss. 127-131, Ara. 2017.

[71] E.H. Aksu, F.M. Kandemir, & S. Kucukler, "Ameliorative effect of hesperidin on streptozotocin-diabetes mellitus-induced testicular DNA damage and sperm quality degradation in Sprague-Dawley rats", *J Food Biochem,* c. 45, sayı 10, ss. e13938, Eki. 2021.

[72] A. Buhur, Ç. Gürel, G.C. Kuşçu, G. Yiğittürk, F. Oltulu, N.Ü. Karabay Yavaşoğlu, …, & A. Yavaşoğlu, "Is losartan a promising agent for the treatment of type 1 diabetes-induced testicular germ cell apoptosis in rats?", *Mol Biol Rep,* c. 50, sayı 3, ss. 2195-2205, Mar. 2023.

[73] D. Su, W. Zhang, Y. Yang, H. Zhang, Y.Q. Liu, G. Bai, …, & S.Z. Zhang, "c.822+126T>G/C: a novel triallelic polymorphism of the TSSK6 gene associated with spermatogenic impairment in a Chinese population", *Asian J Androl,* c. 12, sayı 2, ss. 234-9, Mar. 2010.

[74] R. Riolo, R.D. Rosa, I. Simonetta, & A. Tuttolomondo, "Olive oil in the mediterranean diet and ıts biochemical and molecular effects on cardiovascular health through an analysis of genetics and epigenetics", *Int J Mol Sci,* c. 23, sayı 24, ss. 16002, Ara. 2022.

[75] M. Robles-Almazan, M. Pulido-Moran, J. Moreno-Fernandez, C. Ramirez-Tortosa, C. Rodriguez-Garcia, J.L. Quiles, …, & M. Ramirez-Tortosa, "Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications", *Food Res Int,* c. 105, ss.654-667, Mar. 2018.

[76] M. Bertelli, A.K. Kiani, S. Paolacci, E. Manara, D. Kurti, K. Dhuli, …, & S. Michelini, "Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities", *J Biotechnol,* c. 309, ss. 23-33, Şub. 2020.

[77] A. Karkovic Markovic, J. Toric, M. Barbaric, & C.J. Brala, "Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health", *Molecules,* c. 24, sayı 10, ss. 2001, May. 2019.

[78] A. Bonetti, S. Venturini, A. Ena, & C. Faraloni, "Innovative method for recovery and valorization of hydroxytyrosol from olive mill wastewaters", *Water Sci*

Technol, c. 74, sayı 1, 2016.

[79] T. Hu, X.W. He, J.G. Jiang, & X.L. Xu, "Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects", *J Agric Food Chem,* c. 62, sayı 7, ss. 1449-55, Şub. 2014.

[80] A. Alkhatib, C. Tsang, & J. Tuomilehto, "Olive oil nutraceuticals in the prevention and management of diabetes: From molecules to lifestyle", *Int J Mol Sci,* c. 19, sayı 7, ss. 2024, Tem. 2018.

[81] A. Seidita, M. Soresi, L. Giannitrapani, V.D. Stefano, R. Citerrella, L. Mirarchi, …, & J.L. Lovanna, "The clinical impact of an extra virgin olive oil enriched mediterranean diet on metabolic syndrome: Lights and shadows of a nutraceutical approach", *Front Nutr,* c. 9, ss. 980429, Ağu. 2022.

[82] E. Merra, G. Calzaretti, A. Bobba, M.M. Storelli, & E. Casalino, "Antioxidant role of hydroxytyrosol on oxidative stress in cadmium-intoxicated rats: different effect in spleen and testes", *Drug Chem Toxicol,* c. 37, sayı 4, ss. 420-6, Eki. 2014.

[83] F. Vlavcheski, M. Young, & E. Tsiani, "Antidiabetic effects of hydroxytyrosol: ın vitro and ın vivo evidence", *Antioxidants (Basel),* c. 8, sayı 6, ss. 188, Haz. 2019.

[84] P. Binou, A. Stergiou, O. Kosta, N. Tentolouris, & V.T. Karathanos, "Positive contribution of hydroxytyrosol-enriched wheat bread to HbA(1)c levels, lipid profile, markers of inflammation and body weight in subjects with overweight/obesity and type 2 diabetes mellitus", *Eur J Nutr,* c. 62, sayı 5, ss. 2165-2176, Ağu. 2023.

[85] J. Rocha, N. Borges, & O. Pinho, "Table olives and health: a review", *J Nutr Sci,* c. 9, ss. e57, Ara. 2020.

[86] E. Medina, A. de Castro, C. Romero, & M. Brenes, "Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity", *J Agric Food Chem,* c. 54, sayı 14, ss. 4954-61, Tem. 2006.

[87] R. Pastor, C. Bouzas, & J.A. Tur, "Beneficial effects of dietary supplementation with olive oil, oleic acid, or hydroxytyrosol in metabolic syndrome: Systematic review and meta-analysis", *Free Radic Biol Med,* c. 172, ss. 372-385, Ağu.

2021.

[88] R. Fusco, A.T. Salinaro, R. Siracusa, D. Impellizzeri, M. Scuto, M.L. Ontario, …, & V. Calabrese, "Hidrox((R)) counteracts cyclophosphamide-ınduced male ınfertility through nrf2 pathways in a mouse model", *Antioxidants (Basel),* c. 10, sayı 5, ss. 778, May, 2021.

[89] M. Bayaz, "Natürel zeytinyağlarındaki fenolik bileşiklerin biyolojik aktivitesi", *Akademik Gıda,* c. 14, sayı, 4, ss. 441-450, 2016.

[90] A. Umeno, M. Horie, K. Murotomi, Y. Nakajima, & Y. Yoshida, "Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and ısoflavones", *Molecules,* c. 21, sayı 6, ss. 708, May. 2016.

[91] P. Ditano-Vazquez, J.D. Torres-Pena, F. Galeano-Valle, A.I. Perez-Caballero, P. Demelo-Rodriguez, P. Demelo-Rodriguez, …, & N. Katsiki, "The fluid aspect of the mediterranean diet in the prevention and management of cardiovascular disease and diabetes: the role of polyphenol content in moderate consumption of wine and olive oil", *Nutrients,* c. 11, sayı 11, ss. 2833, Kas. 2019.

[92] A. Ahangarpour, M. Sayahi, & M. Sayahi, "The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study", *Diabetes Metab Syndr,* c. 13, sayı 1, ss. 854-857, Oca-Şub. 2019.

[93] N.A. Spiridonov, L. Wong, P.M. Zerfas, M.F. Starost, S.D. Pack, C.P. Paweletz, …, & G.R. Johnson, "Identification and characterization of SSTK, a serine/threonine protein kinase essential for male fertility", *Mol Cell Biol,* c. 25, sayı 10, ss. 4250-61, May. 2005.

[94] Z. Hao, K.N. Jha, Y.H. Kim, S. Vemuganti, V.A. Westbrook, O. Chertihin, …, & P.E. Visconti, "Expression analysis of the human testis-specific serine/threonine kinase (TSSK) homologues. A TSSK member is present in the equatorial segment of human sperm", *Mol Hum Reprod,* c. 10, sayı 6, ss. 433-44, Haz. 2004.

[95] K.N. Jha, L. Wong, P.M. Zerfas, R.S.D. Silva, Y.X. Fan, N.A. Spiridonov, …, & G.R. Johnson, "Identification of a novel HSP70-binding cochaperone critical to HSP90-mediated activation of small serine/threonine kinase", *J Biol Chem,* c. 285, sayı 45, ss. 35180-7, Kas. 2010.

[96] Y. Li, J. Sosnik, L. Brassard, M. Reese, N.A. Spiridonov, T.C. Bates, …, & A.M. Salicioni, "Expression and localization of five members of the testis-specific serine kinase (Tssk) family in mouse and human sperm and testis", *Mol Hum Reprod,* c. 17, sayı 1, ss. 42-56, Ocak 2011.

[97] K.N. Jha, S.K. Tripurani, & G.R. Johnson, "TSSK6 is required for gammaH2AX formation and the histone-to-protamine transition during spermiogenesis", *J Cell Sci,* c. 130, sayı 10, ss. 1835-1844, May. 2017.

[98] P. Wang, H.L. Huo, S.Y. Wang, Y.W. Miao, Y.Y. Zhang, Q.L. Zhang, …, & H. Xiao, "Cloning, sequence characterization, and expression patterns of members of the porcine TSSK family", *Genet Mol Res,* c. 14, sayı 4, ss. 14908-19, Kas. 2015.

[99] S. Nayyab, M.G. Gervasi, D.A. Turzani, D.A. Carabalio, K.N. Jha, P.E. Visconti, …, & A.M. Salicioni, "TSSK3, a novel target for male contraception, is required for spermiogenesis", *Mol Reprod Dev,* c.88, sayı 11, ss. 718-730, 2021.

[100] K. Hamden, N. Allouche, M. Damak, & A. Elfeki, "Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats", *Chem Biol Interact,* c. 180, sayı 3, ss. 421,32, Ağu. 2009.

[101] N. Wang, Y. Liu, Y. Ma, & D. Wen, "Hydroxytyrosol ameliorates insulin resistance by modulating endoplasmic reticulum stress and prevents hepatic steatosis in diet-induced obesity mice", *J Nutr Biochem,* c. 57, ss. 180-188, Tem. 2018.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Eda Nur ALMALI

Yabancı Dili :İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Düzce Üniversitesi	2023
Lisans	Biyoloji (İngilizce)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2020
Lise		Bolu Anadolu İmam Hatip Lisesi	2015

YAYINLAR