

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

## Fukoidanın Diyabetik Sıçan Testis Dokularındaki PCNA, INSL3, JNK, TGF-β1, IL-1β ve Akt İfadelerine Etkisi

Şinasi BAYRAM<sup>1</sup>, Onur ERSOY<sup>2</sup>, Ayşegül ÇERKEZKAYABEKİR<sup>3</sup>,  
Melike SAPMAZ METİN<sup>1</sup>, Turan KARACA<sup>4</sup>, Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Edirne.  
<sup>2</sup> Trakya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Patoloji Laboratuvar Teknikleri Programı, Edirne.  
<sup>3</sup> Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne.  
<sup>4</sup> Bağımsız Araştırmacı, Edirne.

### ÖZET

Çalışmamızın amacı, diyabetik testis dokularında gözlenen hasarlarda etkili olabilme potansiyeli yüksek bir antioksidan olan fukoidanın, spermatogenez seri hücrelerine proliferasyon, apoptozis ve inflamasyon yönünden olası etkilerini araştırmaktır. Fukoidan; çeşitli amaçlarla tablet formunda tüketici kullanımına sunulmuş olmasına rağmen, diyabetli erkek hastalarda infertiliteye yönelik bir değerlendirme yapılabilmek için yeterli veriler bulunmamaktadır. Bu amaçla, testis dokusunda proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA), insulin-benzeri peptid 3 (INSL3), fosfo (f)-c-Jun N-terminal kinaz (f-JNK), dönüştürücü büyüme faktörü-β1 (TGF-β1), fosfo-serin/treonin protein kinaz (f-Akt) ve interlökin-1β (IL-1β) gibi biyobelirteçlerin ifadelerinin değerlendirilmesi planlanmıştır. Çalışmamızda yirmi dört adet *Wistar albino* erkek sıçan kullanılarak 4 deney grubu (n=6); K: Kontrol grubu, D: diyabet grubu; 40 mg/kg streptozotocin (STZ, 5 ardışık gün, intraperitoneal (i.p.) verilen grup, EF grubu: 40 mg/kg STZ i.p (5 ardışık gün) + 50 mg/kg i.p. fukoidan (Diyabet oluşumunun ertesi günü başlanarak 6 hafta süresince, günde bir kez) verilen grup, GF grubu: 40 mg/kg STZ i.p. (5 ardışık gün) + 50 mg/kg i.p. fukoidan (diyabet oluşturulduktan 15 gün sonra, 6 hafta süresince günde bir kez) verilen grup oluşturulmuştur. Diyabet indüksiyonuyla; immatür hücrelerde dökülme ve seminifer tübül duvarındaki hücrelerde izlenen sitoplazma kayıpları, belirgin dejeneratif değişiklikler olarak görülmüştür. Bununla birlikte diyabet, proliferasyon indeksinin yanı sıra INSL3 ve f-Akt immunoreaktivitelerinde azalmaya; f-JNK, TGF-β1, IL-1β immunreaktivitelerinde ise artışa neden olmuştur. EF ve GF gruplarında ise çalışılan tüm parametrelerde, diyabetin etkilerini azaltma yönünde etki gözlenmiştir. Yaptığımız çalışma sonucunda, moleküler düzeyde etkili olabildiği önceki çalışmalarla da saptanan fukoidanın; diyabetik testis dokusundaki histopatolojik hasarlara karşı koruyucu etkileriyle, infertilite gibi üreme sağlığında oluşabilecek ciddi problemlerin önlenmesine katkı yapacağı kanısındayız.

**Anahtar Kelimeler:** Fukoidan. Testis. Diyabet. JNK. INSL3.

### Effect of Fucoidan on PCNA, INSL3, JNK, TGF-β1, IL-1β and Akt Expressions in Diabetic Rat Testicular Tissues

### ABSTRACT

The aim of our study is to evaluate the possible effects of fucoidan, which is an antioxidant with high potential to be effective in histopathological damages in diabetic testicular tissue, on the proliferation, Leydig cell function, apoptosis and inflammation. For this purpose, we planned to evaluate protein expression of proliferated cell nuclear antigen (PCNA), insulin-like peptide 3 (INSL3) phospho-c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), interleukin-1β (IL-1β) phospho-serine/threonine protein kinase (p-Akt) in testicular tissue. Although fucoidan has been presented to consumer use in tablet form for various purposes, there are insufficient data to make an assessment of infertility in male patients with diabetes. The animals were divided into four groups (n=6) using twenty-four *Wistar albino* male rats; K: control group, Group D: 40 mg/kg streptozotocin (STZ, 5 consecutive days, intraperitoneal (i.p.)), EF group: 40 mg/kg STZ i.p (5 consecutive days)+50 mg/kg i.p. fucoidan (one time, every other day, during six weeks), GF group: 40 mg/kg STZ (5 consecutive days)+50 mg/kg i.p. fucoidan (after fifteen days induction diabetes, every other day, during six weeks). The shedding of immature cells and loss of the seminiferous tubule wall were seen as significant degenerative changes by diabetes induction. However diabetes decreased proliferation index, INSL3 and f-Akt immunoreactivity, whereas increased f-JNK, TGF-β1, IL-1β immunoreactivity. All parameters studied in EF and GF groups was observed reducing effects of diabetes. It was concluded that fucoidan may contribute to the prevention of some serious problems that may occur in male reproductive health, such as infertility.

**Key Words:** Fucoidan. Testes. Diabetes. JNK. INSL3.

Geliş Tarihi: 18.Ağustos.2020  
Kabul Tarihi: 18.Eylül.2020

Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,  
Edirne.  
Tel: 0532 645 00 35  
E-posta: [gulnurkizilay@trakya.edu.tr](mailto:gulnurkizilay@trakya.edu.tr)

### Yazarların ORCID ID Bilgisi:

Şinasi BAYRAM: 0000-0003-4785-475  
Onur ERSOY: 0000-0001-9829-7903  
Ayşegül ÇERKEZKAYABEKİR: 0000-0001-5537-1042  
Melike SAPMAZ METİN: 0000-0001-9623-4116  
Turan KARACA: 0000-0002-2500-7781  
Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN: 0000-0003-1793-7003

Diabetes mellitus (DM)'u, pankreasın insülin üretmediği ya da üretilen insülinin etkin bir şekilde kullanılmadığı, kronik bir hastalık olarak tanımlayan Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin 2019 yılı verilerine göre, tüm dünyadaki DM'li yetişkin insan sayısının 463 milyon olduğu ve bunun 2045'li yıllarda, yaklaşık 700 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Bunun başlıca nedenleri; nüfus artışı, yaşlanma ve kentleşmenin getirdiği yaşam tarzı değişimi sonucu, obezite artışı ve fiziksel aktivitenin azalmasıdır<sup>1</sup>. Önceleri diyabetin, erkek üreme sistemine önemli bir etkisinin olmadığı varsayılsa da, bu görüş son yıllarda değişmiştir. Diyabetin sebep olduğu; azalmış testosteron düzeyi ve normal olmayan spermatogenezis, sperm sayı ve hareketliliğinde azalma, testis ağırlığındaki azalma, testis doku hücrelerindeki histolojik değişiklikler, DM'li erkeklerde sıkça rastlanan bulgular<sup>2-5</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diyabetik testis dokularında apoptozisin arttığı ve bundan dolayı spermatogeneziste bozulmaların ortaya çıktığı gösterilmiştir<sup>4-6</sup>. Diyabetik erkeklerde subfertilite prevalansı %51 olarak bildirilirken<sup>7</sup>, bir başka çalışmada, Tip 2 diyabetli 857 erkek bireyde infertilite prevalansının %35 olduğu belirtilmiştir<sup>8</sup>.

Testis doku hücreleri arasındaki metabolik işbirliği, hormonal kontrol altındadır. DM; hipotalamus-hipofiz-gonad eksenine etki ederek, LH ve FSH hormonlarının salınımındaki kontrol mekanizmalarını etkilemekte ve özellikle LH salınımında bozukluklara sebep olarak, Leydig hücrelerinden salınan testosteron düzeyini azaltmaktadır<sup>9-11</sup>.

Hiperglisemiyle uyarılan reaktif oksijen türevleri (ROS)'nin aşırı üretimi sonucunda oluşan oksidatif stres, diyabet ile ilgili önemli komplikasyonlardan sorumludur. Hücre içerisinde biriken ROS, hücrede apoptozis mekanizmasını hızlandırdığı gibi, sperm kalite ve fonksiyonu üzerinde de gerçek bir toksik etkiye sahiptir<sup>5,6</sup>. Hiperglisemi, enerji üretimini ve serbest radikal yönetimini değiştirerek sperm hareketliliğinin ve konsantrasyonunun değişmesine neden olmaktadır<sup>11,12</sup>.

Fukoidan (fukoidin); antitumoral, antiinflamatuvar, antianjiyogenik, antitrombotik, antiviral ve immüno-modülatör etkileri olduğunu bilinen bir antioksidandır<sup>13,14</sup>. Spontan diyabetli ratlarda, kan-glukoz seviyelerini dengelediği 2012 yılında yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir<sup>15</sup>. Ayrıca çeşitli hastalıklarda; apoptozisde rolü olan Mitojen Aktive edici Protein Kinaz (MAPK)'ları, dönüştürücü büyüme faktörü-β1 (TGF-β1) ve serin/treonin protein kinaz (Akt)'yi inhibe ettiği yönündeki sonuçlar<sup>16-18</sup>, diyabetik testis dokusunda da fukoidanın etkin olabileceğini düşündürmektedir.

Güçlü bir antioksidan olarak bilinen ve ticari olarak satışı sunulmuş olan fukoidanın; ne insanlarda, ne de deneysel diyabet oluşturulmuş deney hayvanlarında, diyabetik testis dokularında ortaya çıkan biyokimyasal,

fizyolojik ve histopatolojik sorunlar sebebiyle, günümüzde oldukça artan infertilite sorunlarına karşı nasıl etkili olabileceği konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sunulan bu araştırmanın amacı, güçlü antioksidan özelliklere sahip olan fukoidanın, diyabetik testis dokusu üzerine etkilerinin biyokimyasal ve histolojik olarak ortaya konması olarak planlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma; Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 31.01.2014 tarih ve 2014.02.06 no'lu kararla onaylanmış, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından TÜBİTAK-114S153 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

### Deney Planı

Deneyde, Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilmiş ve standart laboratuvar koşullarında (22±1°C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) tutulan, aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip, genç erişkin 24 adet *Wistar albino* erkek sıçandan dört deney grubu (n=6) aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir;

- K grubu: Kontrol grubu; sadece sitrat tamponu (pH'sı 4,2 olan; 0,1M'lık) + %0,9'luk serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) olarak verilen grup,
- D grubu: Diyabet grubu; 40 mg/kg streptozotocin (STZ; Sigma Aldrich, Almanya; pH'sı 4,2 olan, 0,1M'lık sitrat tamponunda çözülerek) 5 ardışık gün i.p. verilen grup,
- EF grubu; 40 mg/kg STZ 5 ardışık gün i.p. + 50 mg/kg i.p. fukoidan (Sigma Aldrich, %0,9'luk serum fizyolojik içerisinde çözülerek, son STZ enjeksiyonundan hemen sonra başlanarak, 6 hafta süresince, günde bir kez) verilen grup,
- GF grubu; 40 mg/kg STZ 5 ardışık gün i.p. + 50 mg/kg i.p. fukoidan (son STZ enjeksiyonundan 15 gün sonra başlanarak, 6 hafta süresince, günde bir kez) verilen grup oluşturulmuştur.

Altı haftalık deneyin sonunda deneklerin, 50 mg/kg i.p ketamin (Richterpharma, Viyana, Avusturya) + 10 mg/kg i.p xylazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezi altında; kardiyak ponksiyon ile kan örnekleri, sağ ve sol testis dokuları alınmıştır. Testisler histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için %10'luk formalin ile fikse edilip, rutin işlemlerden geçirilerek, parafin blokları hazırlanmıştır.

### Histopatolojik İncelemeler

Işık mikroskopik incelemeler; parafin inklüzyonu yapılarak elde edilen bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere, Hematoksilen-Eosin (H-E) boyası uygulanarak gerçekleştirilmiştir. H-E boyası için;

## Fukoidanın Diyabetik Sıçan Testis Dokularındaki Etkisi

kesitler parafinin giderilmesi için 30 dk boyunca toluol ile muamele edilmiştir. Parafinden uzaklaştırılan kesitler, sırasıyla azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70'lik) geçirilerek, suya indirilmiştir. 10 dk. boyunca Mayer's hematoksilen (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) boyası ile muamele edilmiştir. Daha sonra morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 10 dk bekletilen kesitlere, 1 dk. Eosin (Merck Millipore) boyası uygulanmıştır. Dehidratasyon için sırasıyla yükselen derecelerdeki alkol serilerinden geçirildikten sonra, kesitler toluole alınmış ve entellan (Merck Millipore) ile daimi preparat haline getirilmiştir.

Tüm gruplara ait H-E boyası uygulanan preparatlar, Olympus BX-51 mikroskopunda incelenerek, farklı büyütmelelerde fotoğrafları çekilmiştir. Hazırladığımız H-E boyası uygulanan preparatların kullanımıyla, tüm deneklerin testis doku örneklerinde seminifer tübül çaplarının ölçümü; X200'lik büyütmede, oküler mikrometre kullanılarak, yuvarlak veya yuvarlağa yakın rastgele seçilmiş, her preparatta 10 tübülün enine kesiti alınarak gerçekleştirilmiştir.

### İmmünohistokimya Protokolleri

Testis doku örneklerinde; proliferen hücre nükleer antijeni (PCNA), fosforile-c-Jun N-terminal kinaz (f-JNK), TGF- $\beta$ 1, interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fosforile (f)-Akt ve insulin-benzeri peptid 3 (INSL3) antikörlerinin aktiviteleri immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. 56°C'de bir gece bekletilmiş 5 $\mu$ m kalınlığındaki parafin kesitler, deparafinizasyon işleminden sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek hidrate edilmiştir. Antijen geri kazanımı için sitrat tamponunda (10 mM; pH:6.0) kaynatılıp, fosfat tamponu (PBS) ile yıkamanın ardından, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için kesitler %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (metanol ile hazırlanmış) içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikörün üretildiği türe uygun bloklama solüsyonunda (İnvitrogen, Kaliforniya, ABD) 10 dk. inkübe edilen kesitler, oda sıcaklığında, antikör dilüe etme solüsyonuyla (İnvitrogen) hazırlanan tavşan monoklonal PCNA antikoru (1/20.000 dilüsyonda, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, ABD), tavşan poliklonal INSL3 antikoru (1/500 dilüsyonda, Novus Biologicals) tavşan poliklonal f-JNK antikoru (1/100 dilüsyonda, Cell Signaling Technology), tavşan poliklonal TGF- $\beta$ 1 antikoru (1/200 dilüsyonda, Novus Biologicals, Kolorado, ABD), tavşan poliklonal IL-1 $\beta$  antikoru (1/200 dilüsyonda, Novus Biologicals) ve tavşan monoklonal f-Akt (1/100 dilüsyonda, Cell Signaling Technology) antikörlerinde +4 °C'de gece boyunca bekletilmişlerdir. Negatif kontroller, primer antikör yerine PBS ile muamele edilmiştir. Primer antikörün üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (İnvitrogen) 10 dk. oda ısısında tutulmuşlar ve son olarak HRP-streptavidin (Invitro-

gen) ile 10 dk muamele edilmişlerdir. 3,3-diaminobenzidine (DAB; İnvitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilen ile zıt boyama yapılmış ve entellanla kapatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar, BX-51 Olympus marka araştırma mikroskopunda incelenerek, fotoğrafları çekilmiştir.

PCNA immunreaktivitesinin değerlendirilmesi için; her grupta 6 deneğe ait kesitlerde, 5 farklı sahada ve X400 büyütmede yer alan seminifer tübüllerde, ortalama 1000 hücredeki PCNA(+) hücreler sayılarak "proliferasyon indeksi" hesaplanmıştır<sup>19</sup>.

INSL3 immunreaktiviteyi ise 1 mm<sup>2</sup> interstisyel alandaki immunpozitif hücreler sayılarak değerlendirilmiştir<sup>21</sup>.

f-JNK, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  ve f-Akt immünoreaktivite yoğunluğu; ışık mikroskopunda X200 büyütmede her bir hayvana ait bir kesit üzerinde rastgele seçilen 5 alanda, histolojik skor (HSCORE) ile değerlendirilmiştir. Boyanmanın şiddeti; 0, boyanma yok; 1+, zayıf fakat tespit edilebilir boyanma; 2+, orta ya da belirgin boyanma; 3+, yoğun boyanma şeklinde skorlanmıştır. Her bir kesit için HSCORE değeri, her bir yoğunluk kategorisine ait boyanmış hücre yüzdesinin, yoğunluk ile çarpımı ile hesaplanmıştır (HSCORE =  $\sum P_i (i+1)$ , i; yoğunluk skoru, P<sub>i</sub>; hücre yüzdesi)<sup>20</sup>.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda hizmet alınmış ve SPSS 20.0 programı (Lisans no: 10240642) kullanılmış, değerler ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak alınmıştır. P<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir. Tüm deney gruplarındaki deneklere ait immünohistokimyasal skor değerleri Mann-Whitney U testi uygulanarak değerlendirilmiştir.

## Bulgular

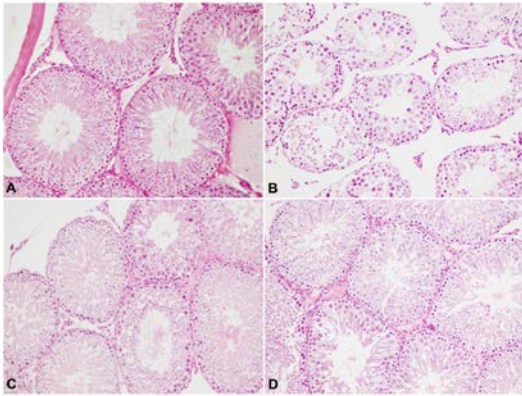
### Işık Mikroskopik Bulgular

K grubuna ait H-E boyası ile boyanmış 5 $\mu$ m kalınlığındaki kesitler incelendiğinde, testis dış yüzeyinde bulunan tunica albuginea ve seminifer tübül duvarını döşeyen spermatogenik seri hücrelerinde organizasyon bütünlüğü gözlenmiştir (Şekil 1A). Seminifer tübül epitelinin bazal membranından itibaren, tübül lümenine doğru spermatogenik seri hücrelerinin spermatogonyum, spermatosit-I, spermatosit-II, erken ve geç spermatidlerin sırasıyla yer aldığı ve spermilerin tübül lümeninde bulunduğu izlenmiştir. Sertoli hücreleri normal konumlarında izlenmiştir. Seminifer tübüller arasındaki interstisyel sahada yer alan Leydig hücreleri, H-E boyanmış kesitlerde genellikle poligonol şekilleri, eozinofilik boyanmış sitoplazmaları ve kapillerler etraflarındaki yerleşimleriyle kolayca ayırt edilmiştir (Şekil 1a).

D grubuna ait H-E kesitlerinde; seminifer tübüllerin şekillerinde düzensizlik izlenmiştir. Bazal membrandan itibaren seminifer tübül lümenine doğru olan spermatogenik seri hücre organizasyonunda bozulmalar, hemen hemen tüm germinal seri hücrelerinde vakuolizasyonlar, seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrışmaların bulunması dikkati çekmiştir. Ayrıca tübül lümenine yakın ya da lümeninde, henüz olgunlaşmasını tamamlayamadan dökülen germinal seri hücrelerinin varlığının yanı sıra; bazı tübüllerde spermatogenik seriye ait tüm hücrelerin bulunmadığı tespit edilmiştir. Sadece spermatogonyum, spermatosit-I ve Sertoli hücrelerinden oluşan seminifer tübüllerle birlikte, tüm seri hücrelerini bulunduran tübüller de gözlemlenmiştir (Şekil 1b).

EF grubuna ait testis kesitlerinde, tunica albuginea'da bütünlük, bazal membrandan tübül lümenine doğru sırası ile spermatogonyumlar, spermatosit I'ler, erken ve geç spermatidlerle, spermlerin yer aldığı tübüller daha çok izlenmektedir. Ancak bazı seminifer tübüllerde; az sayıda spermatid ve spermin gözlenebildiği ya da spermlerin hiç bulunmadığı da izlenmiştir. Germinal seri hücrelerinde sitoplazma kayıpları, vakuolizasyonlar ve ayrıca seminifer epitel ile bazal membranları arasında ayrılmaların bulunması dikkati çekmiştir (Şekil 1c).

GF grubu ışık mikroskopik bulgularında ise normal yapıda seminifer tübüller izlenmekle birlikte; tübüllerde spermatogenik seri hücrelerindeki vakuolizasyonlar ve Sertoli hücre bağlantılardaki zayıflamalar, özellikle D grubuna kıyasla bu grupta daha az izlenen dejeneratif bulgulardır. Ayrıca bazı tübüllerde spermatid ve spermlerin yokluğuyla birlikte, germinal epitel hücreleri ile bazal membranları arasındaki ayrılmalar da göze çarpmıştır (Şekil 1d).



Şekil 1.

HE boyanmış testis kesitleri. a: K grubu, b: D grubu, c: EF grubu, d: GF grubu, büyüme, X200.

#### İmmünohistokimyasal Bulgular

##### Proliferasyon indeksi bulguları

Tüm gruplara ait testis doku kesitlerinde, spermatogonyumlarda izlenen PCNA immünreaktivite (Şekil 2a-2d) değerlendirilerek saptanan hücre proliferas-

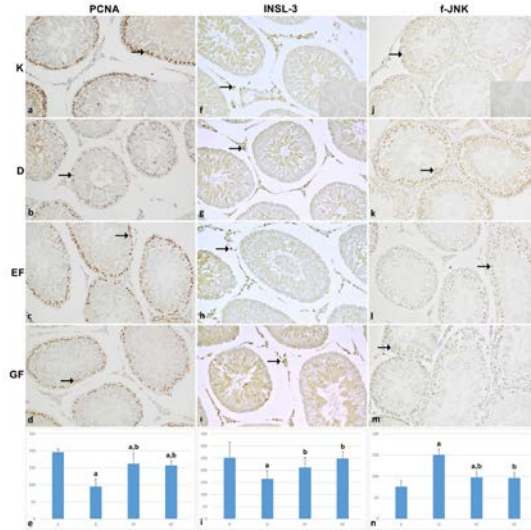
yon indekslerinde; kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında D, EF ve GF gruplarında tespit edilen azalma ( $P < 0.05$ ; Şekil 2e); D grubu değerleriyle kıyaslandığında ise EF ve GF gruplarındaki artış dikkat çekicidir ( $P < 0.05$ ; Şekil 2e). Proliferasyon indeksleri açısından EF ve GF grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $P = 0.583$ ; Şekil 2e).

##### INSL3 immünreaktivite bulguları

INSL3 immünreaktivite, interstisyel alanda bulunan Leydig hücre sitoplazmalarında izlenmiştir (Şekil 2f-2i). K grubuyla karşılaştırıldığında; D grubunda istatistiksel bir azalma tespit edilirken ( $P = 0.028$ ; Şekil 2i), EF ve GF gruplarındaki azalmanın anlamlı olmadığı saptanmıştır (sırasıyla  $P = 0.201$ ,  $P = 0.754$ ; Şekil 2i). Fukoidan uygulanan EF ve GF gruplarında, D grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (sırasıyla  $P = 0.045$ ,  $P = 0.016$ ; Şekil 2i).

##### f-JNK immünreaktivite bulguları

Tüm deney gruplarında f-JNK hücresel lokalizasyonu nükleerdir (Şekil 2j-2m). Diyabet indüksiyonuyla D grubu f-JNK immünreaktivitesi, K grubuna kıyasla anlamlı derecede artmışken ( $P = 0.009$ ); EF ve GF gruplarında, D grubuna göre f-JNK ifadesinin istatistiksel anlamlılıkla azaldığı belirlenmiştir (sırasıyla  $P = 0.006$ ,  $P = 0.009$ ; Şekil 2n). f-JNK immünreaktivitesi açısından EF ve GF grupları kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $P = 0.927$ ; Şekil 2n).



Şekil 2.

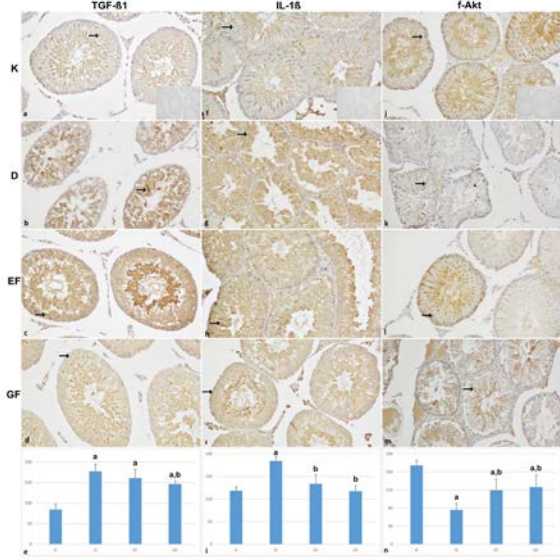
PCNA (a-d), INSL3 (f-i) ve f-JNK (j-m) immünohistokimya mikrografları ve grafikleri (sırasıyla; e, i ve n). a: K grubu ile karşılaştırıldığında, b: D grubu ile karşılaştırıldığında, ( $P < 0.05$ , istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir), büyüme X200.

##### TGF-β1 immünreaktivite bulguları

TGF-β1 immünreaktivite; K grubuna göre D, EF ve GF gruplarında arttığı (sırasıyla  $P = 0.009$ ,  $P = 0.006$ ,  $P = 0.008$ ; Şekil 3a-3e) gözlenmiştir. D grubu

## Fukoidanın Diyabetik Siçan Testis Dokularındaki Etkisi

değerleriyle; GF grubu arasında ise istatistiksel bir azalma tespit edilmiştir ( $P=0.011$ ; Şekil 3e). Ancak D ve EF grupları karşılaştırıldığında, TGF- $\beta 1$  immunreaktiviteyi açısından bir fark bulunmamıştır ( $P=0.198$ ; Şekil 3e).



Şekil 3.

TGF- $\beta 1$  (a-d), IL 1 $\beta$  (f-i) ve f-Akt (j-m) immünohistokimya mikrografları ve grafikleri (sırasıyla; e, i ve n). a: K grubu ile karşılaştırıldığında, b: D grubu ile karşılaştırıldığında, ( $P<0.05$ , istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir), büyüme X200.

### IL-1 $\beta$ immünreaktivite bulguları

K grubuyla karşılaştırıldığında, IL-1 $\beta$  immünreaktivitesinin sadece D grubunda arttığı ( $P=0.008$ ; Şekil 3i); diğer gruplarda ise istatistiksel anlamlı bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ; Şekil 3i). D grubu değerleri, EF ve GF gruplarıyla karşılaştırıldığında ise anlamlı azalmalar gözlenmiştir ( $P=0.007$ ,  $P=0.008$ ; Şekil 3f-3i).

### f-Akt immünreaktivite bulguları

Tüm grupların testis doku kesitlerinde f-Akt immünreaktivitesinin sitoplazmada olduğu belirgindir (Şekil 3j-3m). D grubu testis kesitlerinde f-Akt ifadesinin, K grubuna kıyasla azaldığı istatistiksel olarak belirlenmiştir ( $P=0,009$ ; Şekil 3n). D grubu değerlerinin, EF ve GF gruplarıyla karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlılıkla arttığı gözlenmiştir ( $P=0.022$ ,  $P=0,009$ ; Şekil 3n). Fukoidanın uygulama zamanlarına bağlı olarak, f-Akt ifadelerinde değişim olmamıştır ( $P=0.854$ ; Şekil 3n).

## Tartışma ve Sonuç

Diyabet ve erkek infertilitesi arasındaki ilişki; moleküler mekanizmalardaki etkileri sebebiyle daha fazla

araştırmaya ihtiyaç duyulan bir konudur. Diyabetin uzun süreli komplikasyonlarının ilaçlarla tedavisi, ülkelere ağır bir ekonomik yük getirdiğinden; tedaviye yönelik son çalışmalarda, kan glukoz homeostazını düzenleyici özelliği olan ve antioksidan içeriği yüksek doğal ürünlere ilgi artmıştır<sup>22-24</sup>.

Diyabetik birey veya deneklerde artmış kan glukoz düzeylerinin, lipid peroksidasyonunu ve serbest radikal oluşumunu arttırdığı, antioksidan savunma sistemlerindeki yetersizliklerle birlikte, organizmalarda artan oksidatif stresin çeşitli komplikasyonlara yol açtığı ileri sürülmektedir<sup>25-27</sup>. Oksidatif stresin artmasıyla birlikte, diyabetik testis doku kesitlerinde histolojik olarak; spermatogenik seri hücrelerinde organizasyon bozukluğu, hücresel vakuolizasyonlar, gelişimini tamamlayamadan tübül lümenine dökülen hücreler, bazı tübüllerde çok nükleuslu dev hücreler ve tübül bazal membranlarında kalınlaşmalar izlenmiştir<sup>28-34</sup>. Diyabetik testis dokularında izlenen histopatolojik değişimlere fukoidan etkisini, farklı zamanlarda başlayarak tespit etmek istediğimiz bu çalışmada; GF grubuna nazaran, EF grubu yani diyabet indüksiyonuyla birlikte başlanan fukoidan uygulamasının, daha etkili olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, testis dokusunda diyabetin etkileri oluşuktan sonra fukoidanın; daha yüksek dozlarda ve/veya daha uzun zaman aralıklarında kullanılması gerektiğini düşündürmektedir.

Diyabetik testis dokularında hücre proliferasyonlarının azaldığı, daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir<sup>28,32,35,36</sup>. K grubuna kıyasla, diyabetik tüm gruplarda hücre proliferasyon indekslerinin azalması, önceki çalışmalarla uyumlu bir bulgudur. Çalışmamızda saptanan, D grubuna göre EF ve GF gruplarındaki hücre proliferasyon artışları, fukoidanın etkinliğinin bir kanıtı olarak görülebilir. Diyabetik testis dokularında artan oksidatif stres, hücre organelleriyle birlikte DNA'ya da zarar vermektedir. Mitokondriden sitokrom C salınmasına, kaspazların aktivasyonuna ve tüm bunların sonucunda apoptozun indüksiyonuna neden olmaktadır<sup>37,38</sup>. Diyabetin sebep olduğu testiküler disfonksiyon ile apoptozisin yakın ilişkili olduğu ve oksidatif stresin, apoptozisi indüklediği çalışmalarda bildirilmiştir<sup>32,39,40</sup>.

JNK; c-jun fosforile eden, serin/theronin protein kinazdır<sup>41</sup>. İnflamatuvar sitokinler ve serbest yağ asitleriyle aktifleşir ve insülin etkinliğini bozar<sup>42</sup>. JNK'nın terapötik inhibisyonu; inflamatuvar kemik hastalıkları, artrit ve miyokardial inflamasyon gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda klinik yarar sağlamaktadır<sup>41</sup>. Diyabet gibi birçok hastalık sebebiyle oluşan doku hasarlarında artan oksidatif stres sonucunda, ROS aracılığıyla, JNK aktifleşir ve kaspazların aktivasyonu da apoptozis artar<sup>41,43-45</sup>. Grubumuzun önceki çalışmalarında da, f-JNK ifadesinin diyabetik testis dokusunda arttığı ve JNK inhibitörü (SP600125) kullandığımızda ise f-JNK ifadesiyle birlikte, apoptozisin de azaldığı tespit edilmiştir<sup>33,46</sup>.

Fukoidanın, JNK inhibitörü rolünü vurgulayan çalışmalarından<sup>22,47,48</sup> yola çıkarak, diyabet indüksiyonundan hemen ya da 15 gün sonra, fukoidan uygulamaya başladığımız çalışmamızda; diyabet grubuna göre, antioksidan uygulanan gruplarda f-JNK ifadesinin istatistiksel bir anlamlılıkla azaldığı gözlenmiştir. Renal iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan bir çalışmada, fukoidan uygulanmasıyla apoptozisin, MAPK sinyal yolunun inhibisyonu ile azaldığı ileri sürülmüştür<sup>49</sup>. BV2 mikrogliya hücre serisinde, lipopolisakkaridlerin neden olduğu proinflamatuvar mediyatörlerin üretimi üzerine fukoidan etkilerini araştıran bir çalışmada ise NF-κB ve JNK (MAPK) sinyal yollarının inhibe olduğu ve aynı zamanda da Akt'nin de aktivasyonu öne sürülmüştür<sup>48</sup>.

Spermatogenez ve steroidogenezin de dahil olduğu pek çok mekanizmada rol oynayan proinflamatuvar sitokinler olan TGF-β1, IL-1β ve Akt'nin diyabetik testis dokusundaki ifadeleri, Roy ve ark. (2014)'lerinin çalışmalarında gösterilmiştir<sup>23</sup>. TGF-β1 ve IL-1β ifadelerinde tespit edilen artışa karşın, Akt ifadesinin düşük olduğu ve bu etkilerin, diyabetik testis dokusunda artan ROS'un stimülasyonu ve sistemik immun fonksiyonlardaki yetersizliklerin birlikte etkisiyle meydana geldiği düşünülmektedir. Çalışmamızda diyabetik testis dokularında TGF-β1 ifadesinde saptanan artış, Salama ve ark. (2001)'lerinin çalışmalarıyla da uyumludur. Bu artışın; testis fonksiyonları, spermatogenez ve azalan serum testosteron düzeylerinin pozitif korelasyonuyla mümkün olabileceği bildirilmiştir<sup>50</sup>. Hong ve ark. (2011), karaciğer dokusunda fibrozisin neden olduğu ROS'la birlikte artan TGF-β1 ifadesinin, fukoidan uygulamasıyla azaldığını vurgulamışlardır<sup>51</sup>. Yine aynı çalışmada, IL-1β düzeylerinin de azaldığı ileri sürülmüştür. Fukoidan uyguladığımız gruplarda; TGF-β1 ve IL-1β ifadelerindeki azalmayı, inflamasyon ve oksidatif stresin azalmasıyla izah edebiliriz.

Çalışmamızda f-Akt ifadesinin, diyabet grubu testis kesitlerinde, kontrol grubuna kıyasla azaldığı; ancak D grup değerlerine göre, fukoidan uygulanan gruplarda anlamlı artışların olduğu tespit edilmiştir. Roy ve ark. (2014)'lerinin çalışmalarında diyabetik testis dokusunda, ferulik asit gibi güçlü bir antioksidanın uygulanmasıyla Akt ifadelerinde izlenen artışlar, bizim bulgularımızla da örtüşmektedir. Antioksidan uygulanmasıyla Akt ifadelerinde izlenen bu artışın; farklı stres sinyalleriyle artan apoptozisten, hücreleri kurtarmak amacıyla ortaya çıktığı düşüncesindeyiz. Ancak Guo ve ark. (2016), tip 1 diyabet oluşturarak, insülin ve telmisartanın diyabetik testis dokusundaki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, diyabetik grupta Akt ifadesinin arttığını, ancak insülin ve telmisartan uygulanan gruplarda azaldığını ileri sürmüşlerdir<sup>52</sup>. Akt ifadesinin; fukoidan uygulamalarıyla azaldığı, farklı doku, hücre serisi ve deneysel hastalık modellerinde de gösterilmiştir<sup>17,48,49</sup>.

Leydig hücre fonksiyonunun bir göstergesi olan testosteron düzeylerinin yanı sıra, son yıllarda INSL3; yeni bir biyobelirteç olarak dikkat çekmektedir<sup>53-57</sup>. Çalışmamızda, immunohistokimyasal olarak değerlendirdiğimiz INSL3 ifadesinin, diyabetik testis dokusunda azaldığı tespit edilmiştir. Diyabetik bireylerde Leydig hücre disfonksiyonu sebebiyle, serum INSL3 seviyelerinin azaldığını gösteren çalışmalara rağmen<sup>58-60</sup>, tip 2 diyabetli hastalarda serum INSL3 düzeylerinin değişmediğini ve ayrıca testosteron düzeyleriyle, INSL3 değerleri arasında bir korelasyon olmadığını savunan çalışmalar da bulunmaktadır<sup>54</sup>. Fukoidan uyguladığımız gruplarda tespit edilen INSL3 ifadesindeki artışların, bu gruplardaki histopatolojik hasarları iyileştirmeler de göz önüne alınarak, fukoidanın koruyucu etkileriyle açıklanabileceği kanısındayız.

Fukoidanın; moleküler düzeyde etkili olabilen güçlü bir antioksidan olduğunu gösteren araştırmalar, çalışmamızın başladığı günden bugüne kadar güncelliğini korumaktadır. Özellikle diyabetik testis dokusundaki etkinliklerini değerlendirdiğimiz bu çalışmada; spermatogenik seri hücre proliferasyonları, INSL3, JNK ve proinflamatuvar sitokinler olan TGF-β1, IL-1β ile Akt ifadelerinin değerlendirilmesiyle, literatüre önemli bir katkı sağlandığı kanısındayız.

Yurtdışında lisanslı olarak tüketici kullanımına sunulan fukoidanın, grubumuz ve diğer araştırmacılar tarafından yapılacak çalışmalarla da desteklenerek, diyabetik erkek infertilite tedavisinde ya da infertiliteden korunmak amacıyla kullanımlarının mümkün olabileceği görüşündeyiz.

## Teşekkür

Çalışmamız, TÜBİTAK -114S153 numaralı proje ile desteklenmiştir.

### Etik Kurul Onay Bilgisi:

**Onaylayan Kurul:** Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu.

**Onay Tarihi:** 31.01.2014

**Karar No:** 2014.02.06

## Kaynaklar

1. International Diabetes Federation, Diabetes atlas 9th edition. <https://www.diabetesatlas.org/en/sections/worldwide-toll-of-diabetes.html> (24.03.2020 tarihinde erişildi). 2019.
2. Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(5):626-35.
3. Yigiturk G, Acara AC, Erbas O, Oltulu F, Yavasoglu NUK, Uysal A, et al. The antioxidant role of agomelatine and gallic acid on oxidative stress in STZ induced type I diabetic rat testes. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:240-6.
4. Ersoy O, Kizilay G. Effects of fucoidan on diabetic rat testicular tissue. *Biotech Histochem*. 2018;93(4):277-85.

## Fukoidanın Diyabetik Siçan Testis Dokularındaki Etkisi

- Oroojan AA, Ahangarpour A, Paknejad B, Zareian P, Hami Z, Abtahi SR. Effects of Myricitrin and Solid Lipid Nanoparticle-Containing Myricitrin on Reproductive System Disorders Induced by Diabetes in Male Mouse. *World J Mens Health*. 2019;doi: 10.5534/wjmh.190010.
- Song J, Gao X, Tang Z, Li H, Ruan Y, Liu Z, et al. Protective effect of Berberine on reproductive function and spermatogenesis in diabetic rats via inhibition of ROS/JAK2/NFkappaB pathway. *Andrology*. 2020;8(3):793-806.
- La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Lanzafame F, Giammusso B, Vicari E. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. *Minerva Endocrinol*. 2009;34(1):1-9.
- Bener A, Al-Ansari AA, Zirir M, Al-Hamaq AO. Is male fertility associated with type 2 diabetes mellitus? *Int Urol Nephrol*. 2009;41(4):777-84.
- Shoorei H, Khaki A, Shokoohi M, Khaki AA, Alihemmati A, Moghimian M, et al. Evaluation of carvedilol on pituitary and sexual hormones and their receptors in the testicle of male diabetic rats. *Hum Exp Toxicol*. 2020;39(8):1019-30.
- Rezaei N, Mardanshahi T, Shafaroudi MM, Abedian S, Mohammadi H, Zare Z. Effects of L-Carnitine on the Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Testosterone, and Testicular Tissue Oxidative Stress Levels in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Evid-Based Integr*. 2018;23:2515690X18796053.
- Shi GJ, Zheng J, Wu J, Qiao HQ, Chang Q, Niu Y, et al. Protective effects of Lycium barbarum polysaccharide on male sexual dysfunction and fertility impairments by activating hypothalamic-pituitary-gonadal axis in streptozotocin-induced type-1 diabetic male mice. *Endocr J*. 2017;64(9):907-22.
- Zhu X, Guo F, Tang H, Huang C, Xie G, Huang T, et al. Islet Transplantation Attenuating Testicular Injury in Type 1 Diabetic Rats Is Associated with Suppression of Oxidative Stress and Inflammation via Nrf-2/HO-1 and NF-kappaB Pathways. *J Diabetes Res*. 2019;2019:8712492.
- Wang Y, Xing M, Cao Q, Ji A, Liang H, Song S. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar Drugs*. 2019;20:17(3):183.
- Luthuli S, Wu S, Cheng Y, Zheng X, Wu M, Tong H. Therapeutic Effects of Fucoidan: A Review on Recent Studies. *Mar Drugs*. 2019;21:17(9):487.
- Kim KJ, Yoon KY, Lee BY. Fucoidan regulate blood glucose homeostasis in C57BL/KSJ m<sup>+</sup>/db and C57BL/KSJ db/db mice. *Fitoterapia*. 2012;83(6):1105-9.
- Chen J, Wang W, Zhang Q, Li F, Lei T, Luo D, et al. Low molecular weight fucoidan against renal ischemia-reperfusion injury via inhibition of the MAPK signaling pathway. *PLoS One*. 2013;8(2):e56224.
- Lee H, Kim JS, Kim E. Fucoidan from seaweed *Fucus vesiculosus* inhibits migration and invasion of human lung cancer cell via PI3K-Akt-mTOR pathways. *PLoS One*. 2012;7(11):e50624.
- Kim TH, Lee EK, Lee MJ, Kim JH, Yang WS. Fucoidan inhibits activation and receptor binding of transforming growth factor-beta1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(1):163-8.
- Zhu H, Zhang Y, Hu X, Yi C, Zhong S, Wang Y, et al. The effects of high-dose qinggan huoxue recipe on acute liver failure induced by d-galactosamine in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:905715.
- Yuksel B, Kilic S, Lortlar N, Tasdemir N, Sertyel S, Bardakci Y, et al. Environmental Tobacco Smoke Exposure during Intrauterine Period, Promotes Caspase Dependent and Independent DNA Fragmentation in Sertoli-Germ Cells. *ISRN Obstet Gynecol*. 2014;2014:170124.
- Minagawa I, Sagata D, Pitia AM, Kohriki H, Shibata M, Sasada H, et al. Dynamics of insulin-like factor 3 and its receptor expression in boar testes. *J Endocrinol*. 2014;220(3):247-61.
- Kim KJ, Yoon KY, Lee BY. Low molecular weight fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses inflammation by promoting the inhibition of mitogen-activated protein kinases and oxidative stress in RAW264.7 cells. *Fitoterapia*. 2012;83(8):1628-35.
- Roy S, Metya SK, Rahaman N, Sannigrahi S, Ahmed F. Ferulic acid in the treatment of post-diabetes testicular damage: relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of TGF-beta1, IL-1beta and Akt signalling. *Cell Biochem Funct*. 2014;32(1):115-24.
- Lee MW, Kwon JE, Lee YJ, Jeong YJ, Kim I, Cho YM, et al. Prunus mume leaf extract lowers blood glucose level in diabetic mice. *Pharm Biol*. 2016;54(10):2135-40.
- Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res*. 2008;40(4):354-60.
- Singh R, Kaur N, Kishore L, Gupta GK. Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach. *J Ethnopharmacol*. 2013;150(1):51-70.
- Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Gharbi N, Sakly M. Protective Effect of *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J Med Food*. 2015;18(2):241-9.
- Altay B, Cetinkalp S, Doganavsargil B, Hekimgil M, Semerci B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil Steril*. 2003;80 Suppl 2:828-31.
- Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res*. 2000;28(5):342-7.
- Sadik NA, El-Seweidy MM, Shaker OG. The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rat testes. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(5):887-98.
- Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R, Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology*. 2006;66(9):2056-67.
- Donmez YB, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Acta Cir Bras*. 2014;29(10):644-50.
- Kizilay G, Bayram S, Ersoy O, Donmez Bozdemir Y. Jnk Inhibisyonunun Diyabetik Testis Dokusundaki Fas/FasL Sinyal Yolağına Etkileri. *Batı Karadeniz Tıp Dergisi* 2017;1 (3): 112-118.
- Öztürk F, Gül M, Ağkadir M, Yağmurca M. Deneysel Diyabetin Siçan Testislerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2002;22(2):173-8.
- Jiang X, Bai Y, Zhang Z, Xin Y, Cai L. Protection by sulforaphane from type 1 diabetes-induced testicular apoptosis is associated with the up-regulation of Nrf2 expression and function. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;279(2):198-210.
- Khamis T, Abdelalim AF, Abdallah SH, Saeed AA, Edress NM, Arisha AH. Early intervention with breast milk mesenchymal stem cells attenuates the development of diabetic-induced testicular dysfunction via hypothalamic Kisspeptin/KissIR-GnRH/GnIH system in male rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(1):165577.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79(4):829-43.
- Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol*. 2007;23(4):578-87.

39. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testes. *J Vet Med Sci.* 2007;69(9):969-71.
40. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pBad/14-3-3 in rat testis. *Life Sci.* 2007;81(13):1079-84.
41. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13681-6.
42. Hu C, Su Q, Li F, Zhang G, Sun D, Han H, et al. Duodenal-jejunal bypass improves glucose homeostasis in association with decreased proinflammatory response and activation of JNK in the liver and adipose tissue in a T2DM rat model. *Obes Surg.* 2014;24(9):1453-62.
43. Bogoyevitch MA, Arthur PG. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JunK no more? *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784(1):76-93.
44. Berdichevsky A, Guarente L, Bose A. Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *J Biol Chem.* 2010;285(28):21581-9.
45. Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ. JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(4):420-5.
46. Dönmez YB. Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların testis dokularında JNK ve IL-6 ilişkisinin incelenmesi. (Doktora Tezi). Edirne: Trakya Üniversitesi; 2015.
47. Hyun JH, Kim SC, Kang JI, Kim MK, Boo HJ, Kwon JM, et al. Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(10):1760-4.
48. Park HY, Han MH, Park C, Jin CY, Kim GY, Choi IW, et al. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF-kappaB, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(8):1745-52.
49. Chen J, Cui W, Zhang Q, Jia Y, Sun Y, Weng L, et al. Low molecular weight fucoidan ameliorates diabetic nephropathy via inhibiting epithelial-mesenchymal transition and fibrotic processes. *Am J Transl Res.* 2015;7(9):1553-63.
50. Salama N, Tsuji M, Tamura M, Kagawa S. Transforming growth factor (beta1) in testes of aged and diabetic rats: correlation with testicular function. *Arch Androl.* 2001;47(3):217-26.
51. Hong SW, Jung KH, Lee HS, Zheng HM, Choi MJ, Lee C, et al. Suppression by fucoidan of liver fibrogenesis via the TGF-beta/Smad pathway in protecting against oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(5):833-40.
52. Guo Z, Yan X, Wang L, Wu J, Jing X, Liu J. Effect of Telmisartan or Insulin on the Expression of Adiponectin and its Receptors in the Testis of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Horm Metab Res.* 2016;48(6):404-12.
53. Shimeshan K, Binder S, Bohm D, Wolf S, Sancken U, Meinhardt A, et al. Directed overexpression of insulin in Leydig cells causes a progressive loss of germ cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;295(1-2):79-86.
54. Ermetici F, Donadio F, Iorio L, Malavazos AE, Dolci A, Peverelli E, et al. Peripheral insulin-like factor 3 concentrations are reduced in men with type 2 diabetes mellitus: effect of glycemic control and visceral adiposity on Leydig cell function. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(6):853-9.
55. Ivell R, Anand-Ivell R. Biological role and clinical significance of insulin-like peptide 3. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011;18(3):210-6.
56. Valeri C, Scheingart HF, Rey RA. The prepubertal testis: biomarkers and functions. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013;20(3):224-33.
57. Overvad S, Bay K, Bojesen A, Gravholt CH. Low INSL3 in Klinefelter syndrome is related to osteocalcin, testosterone treatment and body composition, as well as measures of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Andrology.* 2014;2(3):421-7.
58. Burkhardt E, Adham IM, Hobohm U, Murphy D, Sander C, Engel W. A human cDNA coding for the Leydig insulin-like peptide (Ley I-L). *Hum Genet.* 1994;94(1):91-4.
59. Foresta C, Bettella A, Vinanzi C, Dabrilli P, Meriggiola MC, Garolla A, et al. A novel circulating hormone of testis origin in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):5952-8.
60. Bay K, Hartung S, Ivell R, Schumacher M, Jurgensen D, Jorgensen N, et al. Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(6):3410-8.