

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK ETANOLE MARUZ KALAN SIÇANLARIN
TESTİS DOKUSUNDA ASETİL L-KARNİTİN
UYGULAMASININ ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ VE APOPTOZ İLE İLİŞKİSİ**

Merve GÖRGÜLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024-ANTALYA

Merve GÖRGÜLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK ETANOLE MARUZ KALAN SIÇANLARIN
TESTİS DOKUSUNDA ASETİL L-KARNİTİN
UYGULAMASININ ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ VE APOPTOZ İLE İLİŞKİSİ

Merve GÖRGÜLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
TYL-2022-6144 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Cumhuri İbrahim BAŞSORGUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Sema AVCI
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Melike CENGİZ

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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 beyan ederim.

Merve GÖRGÜLÜ

İmza

Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, akademik rehberliği, engin bilgisi ve sabırlı desteği ile her aşamada yanımda olarak bana ilham veren, her konuda destek olup yoluma ışık tutan, bana sadece bir öğrenci olarak değil, aynı zamanda bir araştırmacı olarak da gelişim fırsatı sunan, vizyonu ile yolumu aydınlatan değerli danışman hocam Prof. Dr. G. Leyla SATI DURAN’a,

Çalışmamızda kullanılan dokuların temininde büyük katkıları olan sayın Prof. Dr. Sevim ERCAN KELEK ve Dr. Öğr. Üyesi Hakan ER’e,

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım tüm değerli öğretim üyelerine,

Hiçbir zaman manevi desteklerini esirgemeyen ve ihtiyacım olan her an yardımına koşan çok sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman güler yüz ile karşılayan ve her konuda yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün tüm değerli çalışanlarına,

Beni her zaman destekleyen, motive eden ve nefes almak istediğimde koştuğum sevgili arkadaşlarıma,

Bana her zaman inanan, eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bu süreçte her zaman yanımda olan sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda kronik etanol (EtOH) maruziyetinde asetil L-karnitin (ALKAR) uygulamasının rat testis dokularında endoplazmik retikulum stresi (ERS) ve steroidogenez yolları ile birlikte apoptoz, serum LH, FSH ve testosteron seviyeleri ve oksidatif stres üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Yöntem: Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR deney grupları (n=10/grup) oluşturulmuştur. Sıçan testis ağırlık indeksi, epididimal sperm motilitesi ve testiküler histopatoloji değerlendirilmiş, ERS (GRP78, CHOP, XBP1), steroidogenez (StAR, 17 β -HSD3, 3 β -HSD, p450scc, LHR) ve apoptoz belirteçleri immünohistokimya ve western blot ile incelenmiştir. Serum LH, FSH ve testosteron seviyeleri ELISA ile ölçülmüş ve oksidatif stres indeksi değerlendirilmiştir.

Bulgular: Sperm motilitesi ve modifiye Johnsen skorlaması değerlendirmeleri EtOH grubunda düşük seviyelerde olup ($p<0,001$) EtOH+ALKAR grubunda kontrol ile benzerdir. EtOH grubunda, GRP78 ve CHOP ekspresyonu anlamlı bir şekilde artarken ($p<0.05$) EtOH+ALKAR grubunda, kontrole benzer bir ekspresyon bulunmuştur. XBP1 ekspresyonu ise western blot analizlerinde EtOH grubunda artış göstermiştir ($p<0.0001$). LHR ($p<0.01$), p450scc ($p<0.001$), 3 β -HSD ($p<0.05$), 17 β -HSD3 ($p<0.05$) ve StAR ($p<0.01$) ekspresyonları EtOH grubunda azalırken LHR, p450scc, 3 β -HSD ve 17 β -HSD3 ekspresyonları EtOH+ALKAR grubunda artmıştır ($p<0.05$). Aktif kaspaz-3 ($p<0.001$) ve TUNEL ($p<0.05$) değerlendirmeleri EtOH grubunda artış göstermiştir. Serum LH ($p<0.05$), FSH ($p<0.01$) ve testosteron ($p<0.05$) seviyeleri tüm gruplarda azalırken, EtOH grubunda oksidatif stresin ($p<0.001$) arttığı görülmüştür.

Sonuç: Çalışmamızda deneysel EtOH modelinde, ALKAR'ın testisteki apoptoz, ERS, steroidogenez, serum LH, FSH ve testosteron seviyeleri ile oksidatif stres düzeyi üzerindeki etkileri ilk kez tanımlanmıştır. Bulgularımız alkol bağımlılığında antioksidanların etkileri konusunda önemli bilgiler sunarak yeni hipotezler için temel olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: kronik alkolizm, asetil-L-karnitin, ER stresi, apoptoz, steroidogenez

ABSTRACT

Objective: In our study, the effects of acetyl L-carnitine (ALCAR) administration on chronic ethanol (EtOH) exposure were examined in rat testicular tissues, focusing on endoplasmic reticulum stress (ERS), steroidogenesis pathways, apoptotic markers, serum LH, FSH, and testosterone levels, and oxidative stress.

Method: Experimental groups were designed as control, EtOH, ALCAR and EtOH+ALCAR (n=10). Rat testicular weight index, epididymal sperm motility, and testicular histopathology were evaluated, ERS (GRP78, CHOP, XBP1), steroidogenesis (StAR, 17 β -HSD3, 3 β -HSD, p450scc), and apoptosis markers were examined with immunohistochemistry and western blot. Serum LH, FSH, and testosterone levels were investigated with ELISA, and oxidative stress index was determined.

Results: Sperm motility and modified Johnsen scoring evaluations were at low levels in the EtOH group ($p<0.001$) and were similar to the control in the EtOH+ALCAR group. In the EtOH group, GRP78 and CHOP expression significantly increased ($p<0.05$), while in the EtOH+ALCAR group, the expression was similar to the control. XBP1 expression showed an increase in the EtOH group in western blot analyses ($p<0.0001$). LHR ($p<0.01$), p450scc ($p<0.001$), 3 β -HSD ($p<0.05$), 17 β -HSD3 ($p<0.05$), and StAR ($p<0.01$) protein expressions decreased in the EtOH group, whereas LHR, p450scc, 3 β -HSD, and 17 β -HSD3 expressions were increased in the EtOH+ALCAR group ($p<0.05$). Active caspase-3 ($p<0.001$) and TUNEL ($p<0.05$) evaluations increased in the EtOH group. Serum LH ($p<0.05$), FSH ($p<0.01$), and testosterone ($p<0.05$) levels decreased in all groups, while oxidative stress ($p<0.001$) was observed to increase in the EtOH group.

Conclusion: In our study, the effects of ALCAR on testicular apoptosis, ERS, steroidogenesis, serum LH, FSH, testosterone levels and oxidative stress level were described for the first time in the experimental EtOH model. Our findings may provide important information about the effects of antioxidants in alcohol addiction and may be the basis for new hypotheses.

Key words: chronic alcoholism, acetyl L-carnitine, ER stress, apoptosis, steroidogenesis

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi

1. GİRİŞ

2. GENEL BİLGİLER

2.1.	Erkek Üreme Sistemi	4
2.2.	Testisin Genel Yapısı	5
2.2.1.	Spermatogonya	7
2.2.2.	Spermatositler	8
2.2.3.	Spermatidler	9
2.2.4.	Spermatozoa	9
2.2.5.	Sertoli Hücreleri	9
2.2.6.	Leydig Hücreleri	10
2.3.	Spermatogenez	11
2.4.	Spermatogenezde Endokrin ve Parakrin Kontrol	12
2.5.	Steroidogenez	14
2.6.	Erkek İnfertilitesi	15
2.7.	Etanol	16
2.8.	Etanol Metabolizması	17
2.9.	Kronik Alkol Tüketimi ve Alkol Bağımlılığı	18
2.10.	Erkek İnfertilitesi ve Etanol Kullanımı	18
2.11.	Endoplazmik Retikulum Stresi (ERS)	21
2.11.1.	Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)	22
2.12.	Endoplazmik Retikulum Stres Mekanizmasının Apoptoz ile İlişkisi	24
2.13.	Endoplazmik Retikulum Stres Mekanizmasının Testis ile İlişkisi	25

2.14.	Programlı Hücre Ölümü: Apoptoz	26
2.15.	Oksidatif Stres	28
2.16.	Antioksidanlar	29
2.16.1.	Asetil L-karnitin	30
2.17.	Erkek İnfertilitesi ve Asetil L-karnitin	30
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1.	Testis Dokularının Eldesi ve Hazırlanması	33
3.2.	Testis Ağırlık İndeksi Hesaplaması	33
3.3.	Epididimal Sperm Örneklerinin Toplanması ve Sperm Motilite Değerlendirmeleri	33
3.4.	Parafin Takibi	34
3.5.	Histopatolojik Analizler	34
3.5.1.	Hematoksilen Eozin Boyaması	34
3.5.2.	Periyodik Asit-schiff Boyaması	35
3.5.3.	Testis Kesitlerinde Modifiye Johnsen Skorlaması	35
3.6.	İmmünohistokimya	36
3.6.1.	İmmünohistokimya Protokolü	36
3.7.	TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling) Yöntemi	37
3.7.1.	Kit Protokolü	37
3.8.	Western Blot Analizi	38
3.8.1.	Western Blot Protokolü	38
3.9.	Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELİSA) Yöntemi ile Serum Hormon Düzeylerinin Belirlenmesi	41
3.9.1.	Sandviç ELİSA Yöntemi ile Serum LH ve FSH Düzeylerinin Belirlenmesi	41
3.9.2.	Yarışmacı (Competitive) ELİSA Yöntemi ile Serum Testosteron Düzeyinin Belirlenmesi	42
3.10.	Total Antioksidan Seviyenin (TAS) Belirlenmesi	43
3.10.1.	Kit Protokolü	43
3.11.	Total Oksidan Seviyenin (TOS) Belirlenmesi	44
3.11.1.	Kit Protokolü	44
3.12.	Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi	45

3.13.	İstatistiksel Analizler	45
4.	BULGULAR	46
4.1.	Testis Ağırlık İndeksinin Değerlendirilmesi	46
4.2.	Epididimal Sperm Örneklerinin Toplanması ve Sperm Motilite Değerlendirmeleri	46
4.3.	Histopatolojik Analizler	46
4.3.1.	Hematoksilen Eozin Boyanması ile Testis Kesitlerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi	47
4.3.2.	PAS Boyaması	47
4.3.3.	Testis Kesitlerinde Modifiye Johnsen Skorlamasının Değerlendirilmesi	48
4.4.	İmmünohistokimyasal Bulgular	49
4.4.1.	ERS Belirteçlerinin İmmünohistokimya Bulguları	49
4.4.2.	Steroidogenez ve Apoptoz Belirteçlerinin İmmünohistokimya Bulguları	52
4.5.	TUNEL	58
4.6.1.	Western Blot Analizleri	59
4.6.2.	ERS Belirteçlerinin Western Blot Analizleri	59
4.6.	Steroidogenez ve Apoptoz Belirteçlerinin Western Blot Analizleri	60
4.7.1.	Serum LH ve FSH Düzeylerinin ELİSA Yöntemi ile Belirlenmesi	62
4.7.2.	Serum Testosteron Düzeyinin ELİSA Yöntemi ile Belirlenmesi	63
4.8.	Total Antioksidan Seviyenin (TAS) Değerlendirilmesi	64
4.9.	Total Oksidan Seviyenin (TOS) Değerlendirilmesi	64
4.10.	Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'nin Belirlenmesi	65
5.	TARTIŞMA	66
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	78
	KAYNAKLAR	80
	ÖZGEÇMİŞ	94

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Johnsen skorlama metodu.	35
Tablo 3.2.	İmmünohistokimya ve Western Blot yöntemlerinde kullanılan primer ve sekonder antikorların dilüsyonları sunulmuştur.	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Erkek üreme sistemine ait yapıların gösterimi.	4
Şekil 2.2.	Testisin ve epididimisinin kaput ve korpus yapılarının sagittal kesiti.	5
Şekil 2.3.	Testisin genel yapısının gösterimi.	7
Şekil 2.4.	Seminifer tübüle ait hücrelerin gösterimi.	10
Şekil 2.5.	Spermatogenez süreci ve seminfer tübül organizasyonu.	12
Şekil 2.6.	Spermatogenezde endokrin kontrol mekanizması.	14
Şekil 2.7.	Steroidogenezin şematize edilmiş gösterimi.	15
Şekil 2.8.	Erkek infertilitesi nedenleri şematize edilmiştir.	16
Şekil 2.9.	ERS ve UPR mekanizmaları gösterilmiştir.	24
Şekil 2.10.	ERS'nin apoptoz ile ilişki mekanizması.	25
Şekil 2.11.	Apoptoz mekanizmasının gösterimi.	28
Şekil 3.1.	Deney grupları ve yapılacak uygulamalar sunulmuştur.	32
Şekil 4.1.	Deney gruplarına ait epididimal sperm motilitesi grafik halinde sunulmuştur.	46
Şekil 4.2.	Deney grupları ile kontrol gruplarına ait testis dokularındaki H&E boyanmaları.	47
Şekil 4.3.	Deney grupları ile kontrol gruplarına ait testis dokularındaki PAS boyanmaları.	48

Şekil 4.4.	Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait Johnsen skor değerlendirmeleri.	49
Şekil 4.5.	Spermatosit, yuvarlak spermatid (yıldız), interstisyel Leydig hücreleri (ok) ve Sertoli hücrelerinde gözlenen GRP78 proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	50
Şekil 4.6.	GRP78 proteininin ekspresyon düzeyinin ImageJ programı kullanılarak yapılan threshold analizi.	51
Şekil 4.7.	Sertoli hücrelerinde (kırmızı ok başı), interstisyel Leydig hücreleri (siyah ok başı), uzayan spermatidlerde (siyah ok) ve sitoplazmik dropletlerde (*) gözlenen CHOP proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	51
Şekil 4.8.	CHOP proteininin ekspresyon düzeyinin ImageJ programı kullanılarak yapılan threshold analizi.	51
Şekil 4.9.	Sertoli hücrelerinde (kırmızı ok başı), interstisyel Leydig hücreleri (siyah ok başı) ve uzayan spermatidlerde (siyah ok) gözlenen XBP1 proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	52
Şekil 4.10.	XBP1 proteini ekspresyon düzeyinin ImageJ programı kullanılarak yapılan threshold analizi.	52
Şekil 4.11.	StAR proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	54
Şekil 4.12.	StAR pozitif Leydig hücre sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması.	54
Şekil 4.13.	p450scc proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	55

Şekil 4.14.	p450scc pozitif Leydig hücre sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması.	55
Şekil 4.15.	3 β -HSD proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	55
Şekil 4.16.	3 β -HSD pozitif Leydig hücre sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması.	56
Şekil 4.17.	17 β -HSD3 proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	56
Şekil 4.18.	17 β -HSD3 pozitif Leydig hücre sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması.	56
Şekil 4.19.	LHR proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	57
Şekil 4.20.	LHR pozitif Leydig hücre sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması.	57
Şekil 4.21.	Aktif kaspaz-3 proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur.	57
Şekil 4.22.	Aktif kaspaz-3 pozitif tübül sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması.	58
Şekil 4.23.	Deney grupları ile kontrol gruplarına ait testis dokularındaki TUNEL analizlerine ait bulgular sunulmuştur.	58
Şekil 4.24.	Kontrol ve deney gruplarındaki GRP78, CHOP ve XBP1 proteinine ait western blot bantları (a) ve beta aktin ile normalize edilmiş veriler grafik şeklinde sunulmuştur.	60
Şekil 4.25.	Kontrol ve deney gruplarındaki StAR, p450scc, 3 β -HSD, 17 β -HSD3, LHR ve aktif kaspaz-3 proteinlerine ait western blot bantları	61

(a) ve beta aktin ile normalize edilmiş veriler grafik şeklinde (b) sunulmuştur.

Şekil 4.26.	Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait LH değerleri sunulmuştur.	62
Şekil 4.27.	Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait FSH değerleri sunulmuştur.	63
Şekil 4.28.	Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait testosteron değerleri sunulmuştur.	63
Şekil 4.29.	Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait total antioksidan değerleri sunulmuştur.	64
Şekil 4.30.	Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait total oksidan değerleri sunulmuştur.	64
Şekil 4.31.	Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına oksidatif stres indeksi sunulmuştur.	65
Şekil 5.1.	Çalışmamızdaki immünohistokimya, Western Blot, ELİSA ve TOS/TAS analizlerine ait yapılan karşılaştırmalar ve sonuçlar özetlenmiştir.	77

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABP : Androjen Bağlayıcı Protein

AR : Androjen Reseptörü

ALKAR : Asetil L-karnitin

ADH : Alkol Dehidrojenaz

ALDH : Aldehid Dehidrogenaz

EtOH : Etanol

GER : Granüllü Endoplazmik Retikulum

DER : Düz Endoplazmik Retikulum

UPR : Katlanmamış Protein Yanıtı

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

HE : Hematoksilen Eozin

HRP : Horseradish Peroksidaz

PAS : Periyodik Asit Schiff

PTMH : Peritübüler Miyoid Hücreler

AMH : Anti-Müllerian Hormon

LPS : Lipopolisakkarit

TAİ : Testis Ağırlık İndeksi

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

TBS : Tris Tamponlu Salin

MDA : Malondialdehit

TOS : Total Oksidan Seviye

TUNEL : Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı dUTP Nick End Labeling

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

TAS : Total Antioksidan Seviye

OSİ : Oksidatif Stres İndeksi

PAS : Periyodik Asit Shift

ELİSA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ER : Endoplazmik Retikulum

ERS : Endoplazmik Retikulum Stresi

FSH : Folikül Stimulan Hormon

LH : Luteinizan Hormon

LHR : Luteinizan Hormon Reseptörü

IRE1 : İnositol Gerektiren Kinaz 1

PERK : Protein Kinaz Benzeri ER Kinaz

ATF6 : Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6

StAR : Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein

GRP78 : 78 kDa Glukoz-Düzenlenmiş Protein

JNK : cJun N-terminal Kinazı

XBP1 : X Kutu Bağlayıcı Protein 1

ERAD : Endoplazmik Retikulum İlişkili Yıkım

Elf2 : Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü-2

ATF4 : Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4

ELİSA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

OD : Optik Dansite

CHOP : C/EBP Homolog Proteini

1. GİRİŞ

Alkol bağımlılığı günümüzde ciddi bir sağlık sorunudur. Çeşitli içecekler içinde tüketilen EtOH, uzun süreli tüketiminde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından hem fizyolojik hem de psikolojik bağımlılık yapan maddeler arasında sayılmaktadır. Günümüzde ciddi bir sorun olarak değerlendirilen alkol bağımlılığı, pek çok tıbbi ve psikolojik sorunla yakından bağlantılı olup, sağlık alanında önemli bir ilgi odağı haline gelmiştir. Alkol tüketimi hemen hemen tüm sistem ve organları etkilemektedir. Kronik alkol tüketimine bağlı olumsuzluklardan erkek üreme sisteminin en önemli organlarından biri olan testisler de etkilenmektedir.

Alkolün metabolize edilmesi sonucunda temel ürün olarak asetaldehit meydana gelir. Asetaldehit oksitlendiğinde ise serbest süperoksit radikalleri üretilir. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ve oluşan oksidanların antioksidan savunma sistemi ile ortadan kaldırılması bir denge içerisinde gerçekleşmesi gerekirken, alkolün metabolize edilme sürecinde oluşan toksik moleküller sonucu bu denge bozulabilmektedir. Buna bağlı olarak ERS, steroidogenez yolağı, oksidatif stres ve apoptotik süreçler aşırı alkol kullanımından etkilenmektedir. Erkek fertilitesi açısından testiküler steroidogenez oldukça önemli bir süreçtir ve ana ürün olarak ortaya çıkan testosteron, erişkinde özellikle spermatogenezin sürdürülmesinde kritik bir role sahiptir. ALKAR'ın çeşitli durumlarda oluşan ERS, oksidatif ve apoptotik süreçler üzerinde olumlu etkileri olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte alkolün erkek üreme sisteminde oluşturduğu olumsuz etkiler üzerine ALKAR uygulamasının olası etkileri bilinmemektedir.

İnfertilitenin günümüzde giderek artan büyük bir sorun olmaya devam etmesi ve erkek infertilitesinin henüz nedenlerinin tam anlaşılamamış olması sebebiyle kronik alkolizm gibi önemli bir halk sağlığı problemi ele alınarak mevcut çalışma planlanmıştır. Buradan yola çıkarak çalışmamızda sıçanlarda EtOH maruziyeti sonrası ALKAR uygulamasının FSH, LH ve testosteron hormon düzeylerinde,

testis dokularında steroidogenezin önemli belirteçleri olan StAR, 17 β HSD3, 3 β -HSD, p450scc ve LH reseptörünün ve ERS'nin önemli belirteçlerinden GRP78, CHOP ve XBP1 ekspresyonlarının değerlendirilmesi ile birlikte oksidatif stres ve apoptotik süreçlerdeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda sıçan hayvan modelleri kullanılarak kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR grupları oluşturulmuş; testis ağırlık indeksi hesaplanarak, sperm motilitesi değerlendirilmiştir. Testis dokusunda ve hücrelerindeki hasar, hematoksilen eozin (H&E) ve periyodik asit schiff (PAS) boyanmaları ile birlikte modifiye Johnsen skoru ile değerlendirilmiştir. Testis dokularında GRP78, CHOP, XBP1, LHR, p450scc, 3 β -HSD, 17 β -HSD3, StAR ve aktif kaspaz-3 ekspresyon ve lokalizasyonları immünohistokimya ve Western Blot yöntemleri ile analiz edilmiştir. Apoptotik tübül indeksi ölçümü için TUNEL yöntemi, serum LH, FSH ve testosteron seviyelerinin belirlenmesi için ELİSA yöntemi uygulanmıştır. Testis dokularında oksidatif stres ölçümü için oksidan ve antioksidan seviyeleri ölçülerek oksidatif stres indeksi hesaplanmıştır.

Hayvanların testis ağırlık indeksinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmezken epididimal sperm motilitesi açısından EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Histopatolojik değerlendirmelerde, EtOH grubunda şiddetli patolojiler bulunurken, diğer gruplarda bu patolojilerin görülmemesi dikkat çekmiştir. İmmünohistokimya ve Western Blot analizlerinde GRP78, CHOP, XBP1, p450scc, 3 β -HSD ve 17 β -HSD3 ekspresyonları EtOH grubunda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterirken, EtOH grubuna kıyasla EtOH+ALKAR grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın StAR protein ekspresyonunun tüm gruplarda azalması dikkat çekmiştir. Aktif kaspaz-3 ve TUNEL bulguları, başta EtOH grubu olmak üzere diğer gruplarda apoptotik tübül sayısı ve indeksi açısından artma olduğunu işaret ederken, EtOH+ALKAR grubu EtOH grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bir azalış tespit edilmiştir. Serum LH, FSH ve testosteron düzeyleri tüm gruplarda azalırken, oksidatif stres, yalnızca EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Bununla birlikte bulgularımız, EtOH maruziyeti sonrası maddi

ve manevi anlamda oldukça önem arz eden infertilite sorunu yaşayan erkek bireylerde ALKAR uygulamasının infertilite çalışmaları kapsamında bir antioksidan görevi üstlenerek yararlı olabileceğini destekler niteliktedir.



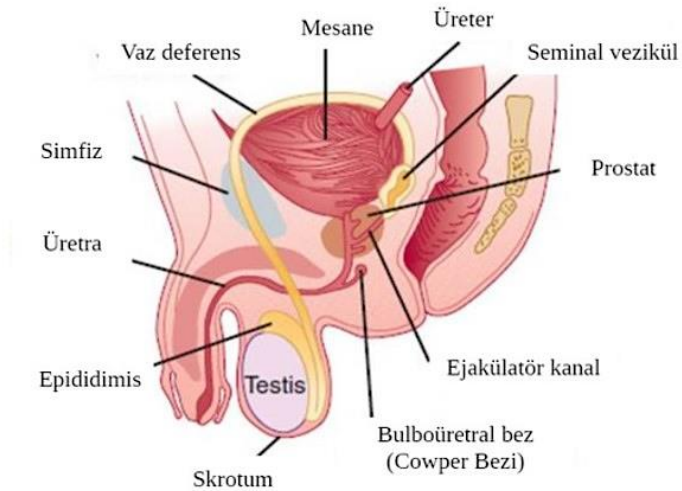
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, cinsel üreme yeteneğini ve erkek cinsiyet özelliklerini geliştirmek ve devamlılığını sağlamak için oldukça önemli olan organlardan oluşmaktadır. Bu organlar, bir çift olarak skrotumda bulunan testisler, boşaltım kanalları, spermatozoanın taşınmasından sorumlu epididimis, duktus deferens, vezikula seminalis, bulboüretral bezler, prostat, üretra ve penistir (Şekil 2.1) (Kierszenbaum, 2006; Ross M. H. v. W., P., 2014; Tiwana ve ark., 2024).

Erkek üreme sisteminin birçok işlevi vardır. Bunlardan ilki neslin devamlılığı için önemli olan spermatozoanın oluşumunun sağlanmasıdır. Aynı zamanda spermatozoanın beslenmesi ve geçici olarak depolanması, erkek cinsiyet hormonlarının üretimi de erkek üreme sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir (Heindel ve ark., 1989).

Erkek üreme sisteminin kontrolünde sinir sistemi ve endokrin sistem görev almaktadır. Yardımcı üreme bezlerinin kasılmasında ve penil ereksiyonda sinir sistemi görev alırken spermatogenez ve androjen biyosentezinde endokrin sistem görevlidir (Mawhinney ve ark., 2013; Gurung ve ark., 2024).

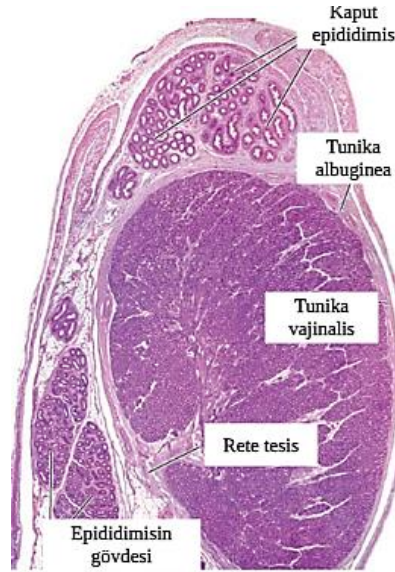


Şekil 2.1. Erkek üreme sistemine ait yapıların gösterimi (Kim E. Barrett, 2012).

2.2. Testisin Genel Yapısı

Testis, erkeklerde spermatogenez ve steroidogenezden sorumlu kompleks bir organdır. Erkek üreme sisteminin merkezinde yer alan testisler, erkek fertilitesi için oldukça önemlidir ve aynı zamanda vücutta testosteron hormonunun üretilip salgılanması ile sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimini yönlendirmektedir (Chemes, 2001). Testisler, gebeliğin 26. haftasında karın boşluğundan inguinal kanala doğru inerek fibromusküler yapıda olan skrotuma inmektedir. Skrotum kesesinin görevi, epididimis ve testisleri fiziksel darbelere karşı koruma ve spermatogenez için uygun testis sıcaklığının düzenlenmesini sağlamaktır (Yang ve ark., 2018). Testislerin skrotuma inişi sırasında, kan damarları, lenfatik damarlar ve otonom sinirler ile birlikte testisin anterolateral yüzeyini saran, abdominal peritonun bir uzantısı olan tunika vajinalis de karın boşluğundan skrotuma doğru hareket etmektedir. Bu yapılar, testislerin işlevlerini sürdürmesi ve üreme sisteminin düzgün çalışabilmesi için önemlidir (Creasy, 2002).

Testisler dıştan içe doğru sıkı bir bağ dokusu karakterinde olan tunika vajinalis, tunika albuginea ve gevşek bağ dokusu karakterinde, damarlar bakımından zengin olan tunika vasküloza olarak üç tabakalı kalın bir kapsül ile çevrilidir (Şekil 2.2) (Holstein, 1967).

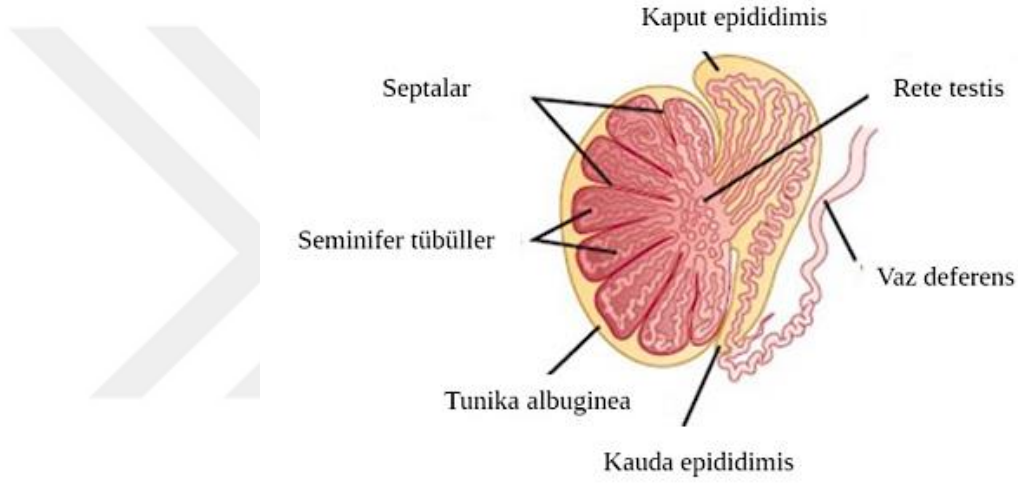


Şekil 2.2. Testisin ve epididimisinin kaput ve korpus yapılarının sagittal kesiti (Ross M. H. P., W., 2011).

Tunika vajinalis, mezotel ile döşeli bir periton zarıdır ve testislerin anterolateral yüzeyini kaplar. Bu zar sayesinde, testisler karın boşluğundan skrotuma uzanır. Tunika vajinalis, testislerin korunmasına, hareket etmesine ve testislerin fonksiyonlarını devam ettirmesine yardımcı olur (Kierszenbaum, 2006; Ross M. H. v. W., P., 2014).

Tunika albuginea, kapsül yapısının yoğun bir fibroelastik bağ dokusu ile döşeli en kalın katmanıdır. Testise giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve kanallar tunika albugineada yerleşiktir. Tunika albugineanın iç yüzeyindeki bağ dokusu septaları, mediastinuma uzanır. Bu bağ dokusu tarafından oluşturulan bölgede ise "rete testis" bölgesi bulunur (Şekil 2.3) (Kierszenbaum, 2006; Ross M. H. v. W., P., 2014). Testis organogenezi, tübüler ve interstisyel kompartmanlar dahil olmak üzere farklı testiküler alanların morfolojik ve fonksiyonel gelişimini içerir (Stukenborg ve ark., 2010). Tübüler kompartman, ergenlik öncesi erkeklerde olgunlaşmamış testis kordonlarından oluşurken yetişkin erkeklerde sperm hücrelerinin gelişimini destekleyen olgun seminifer tübüllerden oluşur. Kapsülden testis içine uzanan septalar, testisi yaklaşık olarak 250-300 lobüle ayırır ve sinirleri, kan damarlarını ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) bulunduran gevşek bağ dokusu ile çevrelenmiş seminifer tübülleri oluşturur (Dym, 1988; Abraham, 2006). Kordonlar da tübüller de erkek germ hücreleri dışında temel olarak Sertoli hücrelerini ve peritübüler miyoid hücreleri (PTMH'ler) içerir (Kohn ve ark., 2010). Gerçek Sertoli hücreleri gerekse PTMH'ler, tübüler ve interstisyel bölmeleri ayırmak için bir bazal membran oluşumunu sağlayan hücre dışı matriksin bileşenlerini salgılar (Tung ve ark., 1984; Tung ve ark., 1987). İnterstisyel alan ise kan damarları, bağ dokusu ve steroid sentezi için önemli olan androjen üreten hücreler olan Leydig veya interstisyel hücrelerden oluşur (Tung ve ark., 1984). Leydig hücreleri, damarlar ve seminifer tübüllerin "lamina propriyası" ile ilişkili bir şekilde gruplar halinde bulunur. Bu karmaşık organizasyon, testisin işlevselliğini sürdürebilmesi ve spermatogenez sürecinin verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için önemlidir.

Seminifer tübüller, kıvrımlı uzanan t b llerdir ve sperm burada üretilir. Testisin yaklaşık %85'ini oluştururlar ve testislerde 250-1000 tane seminifer tübül yapısı bulunur. Seminifer tübüllerde germ hücreleri ve onlara destek görevi olan Sertoli hücreleri bulunur. Seminifer tübüllerin iki ucu da epididimisin başındaki bir kanal ağına açılır ve yaklaşık 50 cm uzunluğunda, 150-250  m çapındadırlar (şekil 2.3). Seminifer tübüllerin dışında ise, PTMH adı verilen modifiye düz kas hücreleri bulunur (Abraham, 2006; Ross M. H. v. W., P., 2014).



şekil 2.3. Testisin genel yapısının gösterimi (Kim E. Barrett, 2012).

2.2.1. Spermatogonya

Spermatogonyumlar testislerin seminifer tübüllerin bazaline yerleşmiş, diploid sayıda kromozom içeren, spermatogenez sürecinin ilk aşamasını temsil eden germ hücreleridir (Mescher, 2015; Kubota ve ark., 2018). Spermatogonyumlar farklılaşma geçirerek primer spermatositlere d n şebilirken aynı zamanda devamlı olarak mitoz bölünmeler geçirerek farklılaşmadan çoğalabilirler (şekil 2.4). Spermatogonyumlar tip A (A0, A1, A2, A3, A4), ara form ve tip B spermatogonyumlar olmak üzere üç ana tipte bulunabilmektedir. Tip A spermatogonyumlar, mitotik bölünme ile spermatogonyum havuzunun devamlılığını sağlarken, tip B spermatogonyumlar spermatositlere farklılaşabilme özelliğine sahiptir (Griswold, 2016). Spermatogonya evresi, spermatogenezin başlangıcı kabul edilir ve hormonal düzenlenmeler sayesinde oluşur. Bu süreç, erkek üreme sisteminin en önemli yapı taşlarından biri olmakla

kalmayıp aynı zamanda spermatogonyumların farklılaşması ve erkek fertilitenin devamlılığı için çok önemlidir (De Rooij ve ark., 1989; Ehmcke ve ark., 2005). Spermatogonyanın fonksiyonel sperme dönüşmesi insanlarda yaklaşık 64-72 gün, (White, 2013) farelerde yaklaşık 34-36 gün (Oakberg, 1956), ratlarda ise yaklaşık olarak 48-52 gün (Clermont ve ark., 1965) sürmektedir.

2.2.2. Spermatositler

Spermatositler, spermatogonyumların farklılaşarak bölünmesi sonucu oluşarak mayoz bölünme geçirebilme yeteneğine sahip hücrelerdir (Şekil 2.4). Mayoz bölünme sonucunda haploid kromozomlu spermatidler oluşur. Önce homolog kromozomlar rastgele ayrılır ve ardından homolog kromozomlar arasında crossing-over gerçekleşerek türlerin genetik çeşitliliği sağlanır (Costabile, 2013).

Mayoz I'in profaz aşaması, leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez olarak beş evreye ayrılmıştır. Birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasına giren spermatositler, tübülün bazal membranından lümenine doğru ilerlemeye başlarlar. Zigoten aşamasında, homolog kromozomlar yan yana gelerek seminifer tübülün bazal membranından ayrılırlar. Profaz evresinin en uzun süreci olan pakiten aşamasında, spermatositlerin hasar görme olasılığı daha yüksektir. Primer spermatositler, diploid kromozom ve DNA miktarı ($2n / 4DNA$) taşır. Birinci mayoz tamamlandığında, bu kromozom ve DNA miktarı yarıya iner ($n / 2DNA$). Genetik materyal değişimi, birinci mayozda kiazma noktalarında gerçekleşir. Her primer spermatositten, iki adet sekonder spermatosit oluşur (Griswold, 2016). Mayoz II, primer spermatositlerden sekonder spermatositlere geçişten sonra çok hızlı bir şekilde devam ederek haploid kromozomlu yuvarlak spermatidlerin oluşumu ile devam eder. Sekonder spermatosit hücreleri, ikinci mayoz bölünmeyi geçirerek kromozomlarındaki $2DNA$ 'yı ikiye böler ve her biri haploid kromozom sayısına sahip spermatidler oluşturur (Griswold, 2016; Kubota ve ark., 2018).

2.2.3. Spermatidler

Yuvarlak spermatidler, seminifer tübüllerin lümenine doğru ilerlerken uzayan ve uzamış spermatidleri oluşturur. Mayoz II'yi tamamlayan spermatositler seminifer tübülün lümeninde yer alır ve mayoz bölünmenin sonunda bir spermatogonyadan 4 tane spermatid oluşur. Spermatidlerin gelişim ve değişim süreci “spermiyogenez” olarak adlandırılır. Spermiyogenez sırasında spermatidler, morfolojik ve biyokimyasal değişimlere uğrayarak olgun sperm hücresi olan spermatozoalara dönüşür (Şekil 2.4). Bu değişiklikler, spermilerin olgunlaşması ve hareket yeteneği kazanması için oldukça önemlidir (Griswold, 2016).

2.2.4. Spermatozoa

Erkek üreme hücresi olan spermatozoa, üreme sistemine özgü bir şekle sahiptir (Teves ve ark., 2022). Bir spermatozoa, baş, boyun ve kuyruk olarak üç temel kısımdan oluşmaktadır. Spermatozoanın baş kısmında, nükleus ve akrozom organelleri bulunur. Akrozom yapısı, fertilizasyon aşaması için gerekli olan enzimleri içerir. Boyun kısmında, mitokondri organelleri bulunur ve spermatozoanın enerji ihtiyacı boyun bölgesinden karşılanır. Kuyruk kısmı ise, uzun ve ince bir yapıdadır ve spermatozoanın hareketini sağlar (De Rooij ve ark., 1989). Olgunlaşan spermatozoalar epididimiste depolanır ve buradan ejakülasyon sırasında dışarı atılır. Spermatozoanın temel işlevi, dişi oositi ile birleşerek fertilizasyonu başlatmaktır (Griswold, 2016).

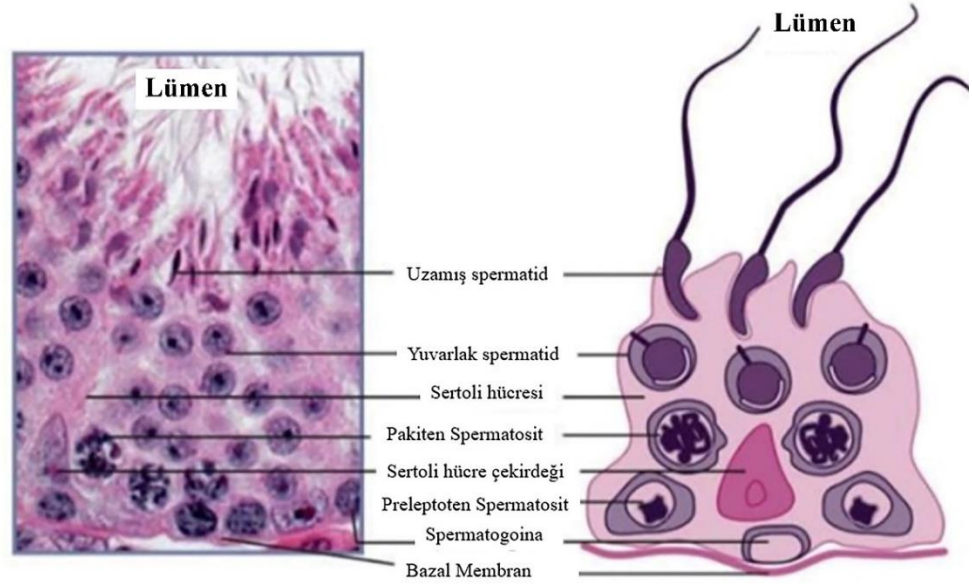
2.2.5. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri seminifer tübülün epitelinde yer alır ve germ hücrelerine destek olurlar. Sertoli hücreleri prizmatik bir şekle sahiptir ve bazal membrandan tübül lümenine kadar uzanabilmektedir. Nükleusları yuvarlak veya üçgen şekilli, belirgin ve ökromatik yapıdadır (Şekil 2.4). Ayrıca organeller açısından zengin olmakla birlikte üreme dönemi boyunca bölünmezler (Kohn ve ark., 2010; Ross M. H. v. P., W., 2016).

Sertoli hücreleri birbirlerine zonula okludensler ile bağlanarak seminifer epiteli, bazal ve luminal kompartmanlara ayrılır. Bazal bölümde spermatogonyumlar ve

erken dönem primer spermatositler yer alırken, luminal bölümde olgun spermatositler ile spermatidler yer almaktadır. Sertoli hücreleri arasında bulunan bu bağlantı komplekslerinin kan-testis bariyerinin oluşumunda da önemli rolleri bulunmaktadır. Bu bariyer, erkek germ hücrelerini kan ile gelebilecek zararlı maddelerden korur (Tung ve ark., 1984; Kohn ve ark., 2010).

Sertoli hücreleri, gelişim aşamasındaki spermiyumları desteklemek ile birlikte, korur ve besler. Spermiyogenezde oluşan rezidüel spermatid sitoplazmalarını ve gelişimlerini tamamlayamamış spermatogenezik hücreleri fagosite etmekte de görevlidir. Erkek fetusta ise Müller kanalının gerilemesini sağlayan Anti-Müllerian hormon (AMH), androjen bağlayıcı protein (ABP), aktivin ve inhibin salgırlar. Aynı zamanda Sertoli hücreleri enfeksiyon ve X ışını radyasyonu gibi olumsuz çevresel faktörlere karşı dayanıklıdır (Kohn ve ark., 2010; Ross M. H. v. P., W., 2016).



Şekil 2.4. Seminifer tübüle ait hücrelerin gösterimi (Borg ve ark., 2010).

2.2.6. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri yuvarlak veya poligonal şekle, yuvarlak nükleusa ve asidofil bir sitoplazmaya sahip hücrelerdir. Sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlası bulunur. Leydig hücreleri, interstisyel alanda tek başlarına veya gruplar halinde bulunabilmektedirler. Leydig hücrelerinin en önemli görevlerinden biri ise, erkek

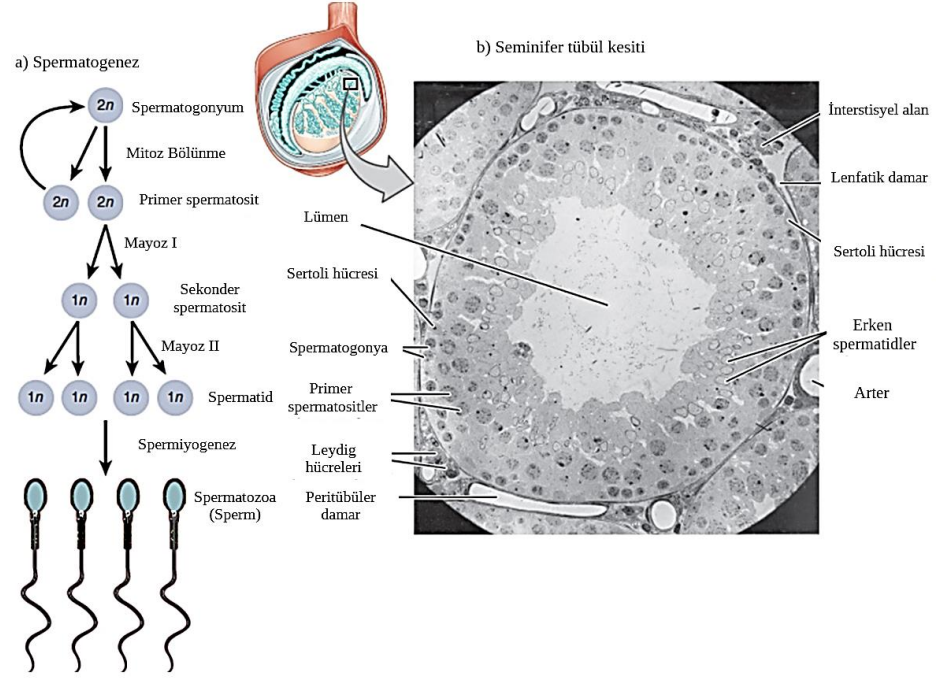
üreme sisteminin fizyolojik mekanizmasının devamlılığı için gerekli olan testosteron üretimidir. Embriyonik dönemde, erkek fetusta bulunan gonadların normal gelişiminde, pubertede cinsel olgunlaşmada ve yetişkin dönemde spermatogenezin, sekonder cinsiyet karakterlerinin ve yardımcı bezlerin sekresyon aktivitelerinin devamlılığında testosteron salgılanması kritik önem taşır (Heffner, 2014; Mescher, 2015).

2.3. Spermatogenez

Testislerdeki seminifer tübüller içerisinde gerçekleşen germ hücrelerinin oluşum sürecine spermatogenez denir. Spermatogenez, spermatogonyum olarak adlandırılan öncü hücrelerin olgun spermatozoalara dönüşmesini kapsayan kompleks bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, hücresel transformasyon ve farklılaşmayı içeren bir dizi mitotik ve mayotik bölünmeyi içerir (Şekil 2.5). İlk olarak, spermatogonyumlar, mitoz bölünme ile çoğalır. Primer spermatositlere dönüşen spermatogonyumlar, birinci mayotik bölünme olan mayoz I'i tamamladıktan sonra mayoz II sırasında sekonder spermatositlere farklılaşır. Son olarak, sekonder spermatositler, ikinci mayotik bölünme sonucunda spermatidlere dönüşür (Şekil 2.5). Spermatidlerin, spermiyogenez sürecinde farklılaşıp olgun sperm hücrelerine dönüşümü epididimiste gerçekleşir (de Kretser ve ark., 1998). Bu süreçte, sitoplazma yeniden düzenlenir ve akrozom ile kuyruk oluşur. Spermatogenez, hormonal düzenlemeler ve hücresel bölünmeleri içerir ve erkek üreme yeteneğinin temelini oluşturmaktadır. Spermatogenez döngüsü, insanlarda ergenlik döneminde başlayarak ömür boyu devam eder.

Tüm canlılarda, spermatogenik hücreler belirli hücrelerle ilişki halindedir. Örneğin, farelerde her spermatogonyum farklı bir aşamada eşzamanlı olarak gelişebilir. Bu nedenle, herhangi bir zamanda seminifer tübül kesitleri incelendiğinde, spermatogonyumdan spermatozoaya kadar olan tüm spermatogenik hücre serisi "spermatogenik siklus" sayesinde görülebilir. Farelerin seminifer tübüllerinde, 12 evre tanımlanmıştır ve her evre, spermatidler, spermatositler ve spermatogonya hücrelerinin bulunmasıyla karakterize edilmiştir. İnsan seminifer tübüllerinin kesitleri incelendiğinde ise

farklı spermatogenik siklus aşamasında bulunan hücreler ve germ hücrelerinin birbirleriyle düzensiz bir ilişki içinde olması dikkat çekmektedir. Bu karmaşık düzenlenimi kontrol eden mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, parakrin ve otokrin mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir (Tung ve ark., 1984; Ross M. H. v. P., W., 2016).



Şekil 2.5. Spermatogenez süreci ve seminifer tübül organizasyonu (J. Gordon Betts, 2013).

2.4. Spermatogenezde Endokrin ve Parakrin Kontrol

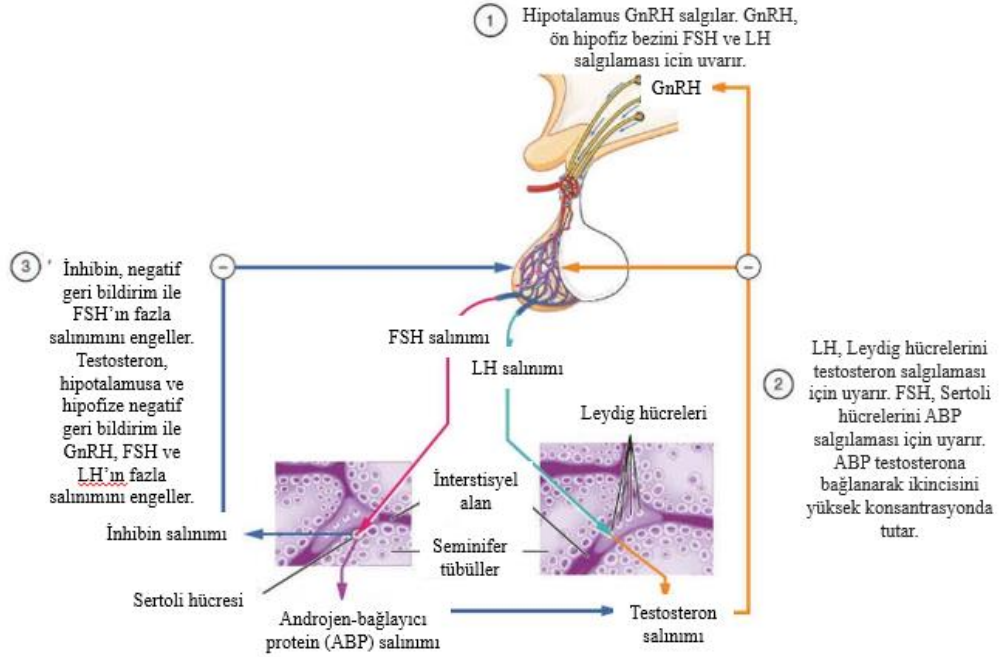
Spermatogenez, hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) eksenini ve hücre siklusundaki kontrol noktaları boyunca aktivite gösteren çeşitli faktörlerle endokrin, parakrin, otokrin ve epigenetik kontrolden geçerek kaliteli spermatozoa üretimini sağlamaktadır.

Hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hipotalamustan pulsatil formda salındıktan sonra ön hipofize ulaşır ve üreme için önemli olan gonadotropinler, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salınımını indükler. FSH ve LH spermatogenez için temel düzenleyicilerdendir. Ayrıca spermatogenez sürecinin destekleyici faktörlerin

üretilmesini sağlayan testosteron hormonu da spermatogenez için oldukça önemlidir (Şekil 2.6) (Molina, 2013).

FSH ve testosteronun etkileşimi, başarılı bir spermatogenez için gereklidir. FSH, Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarını uyararak spermatogenezin başlatılmasından sorumludur. Ayrıca FSH sinyali ile Sertoli hücrelerinden salınan inhibin B olarak adlandırılan bir geri besleme molekülü bulunmaktadır. FSH, Sertoli hücrelerinin intrasellüler androjen reseptörlerini ve androjen bağlayıcı proteinlerini (ABP) sentezlemesini etkiler (Şekil 2.6) (Kohn ve ark., 2010; Molina, 2013; Heffner, 2014). Sertoli hücreleri tarafından salgılanan ABP, interstisyel alandan seminifer tübüle geçen testostereona ve androjenlere bağlanır ve androjenlerin germ hücrelerine taşınmasını sağlar. Sonuç olarak androjenler, androjen reseptörü (AR) içeren pro-mayotik germ hücrelerinin içine alınır.

Testosteron ise Leydig hücrelerinden salgılanır ve Sertoli hücrelerinde spermatogenez sürecini destekleyici faktörlerin üretilmesini sağlar. Leydig hücreleri aynı zamanda germ hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını destekleyerek spermatogenez sürecinin ilerlemesi için yardımcı olur. LH ise, interstisyel alanda bulunan Leydig hücrelerini uyararak testosteron sentezini ve salınımını uyarmaktadır. Androjenlerin, Sertoli hücreleri için temel işlevleri bulunmaktadır. Testosteron, aktif metaboliti dihidrotestosteron ile germ hücre olgunlaşmasını uyarır. İnhibin B'ye benzer şekilde, testosteronun da HPG ekseninde olumsuz bir geri besleme etkisi vardır (Şekil 2.6) (Payne ve ark., 2004; Costabile, 2013).

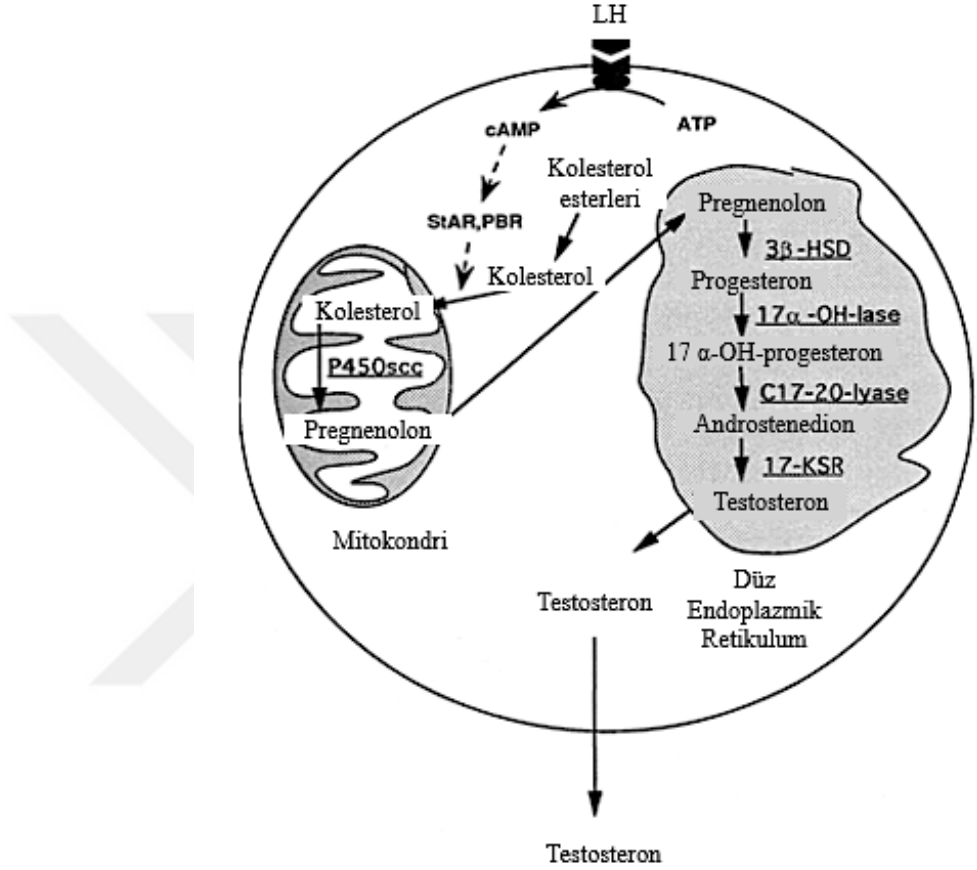


Şekil 2.6. Spermatogenezde endokrin kontrol mekanizması (Kim E. Barrett, 2012).

2.5. Steroidogenez

Steroidogenez, özellikle adrenal bezler, gonadlar ve plasentada gerçekleşir. Steroidogenez, kolesterolden steroid hormonların sentezlendiği karmaşık bir süreçtir ve 3 ana aşamada gerçekleşir. Bunlardan ilki kolesterolün mitokondriye taşınmasıdır ve bu olay steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) sayesinde gerçekleşir. LH, cAMP'nin aktivasyonuna yol açan LH reseptörleri (LHR) yoluyla Leydig hücrelerine etki etmektedir. cAMP kaskadının aktivasyonu, kolesterolün, StAR yoluyla iç mitokondriyal membrana transferini sağlar. İkinci aşama ise kolesterolün pregnenolona dönüşme aşamasıdır. Bu olay ise mitokondride kolesterol yan zincir kesme enzimi (P450_{scc}, CYP11A1) tarafından gerçekleşen steroidogenezdeki hız kısıtlayıcı adımdır. Bu aşamada, kolesterol mitokondriden endoplazmik retikuluma (ER) geçer ve daha sonra pregnenolon, 3-beta hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β -HSD) ile progesterona dönüşür. Son adımda ise progesterondan çeşitli steroid hormonlara dönüşüm gerçekleşir. Bu aşamada farklı hücre türlerinde çeşitli enzimler steroid hormonlarına dönüşümü etkiler. Progesteron, çeşitli ara basamaklardan sonra (17-beta hidroksisteroid dehidrogenaz) 17 β -HSD ile erkek üreme sistemi için en

önemli hormonlardan biri olan testosterona dönüştürülür (Şekil 2.7) (Payne ve ark., 2004; Molina, 2013).

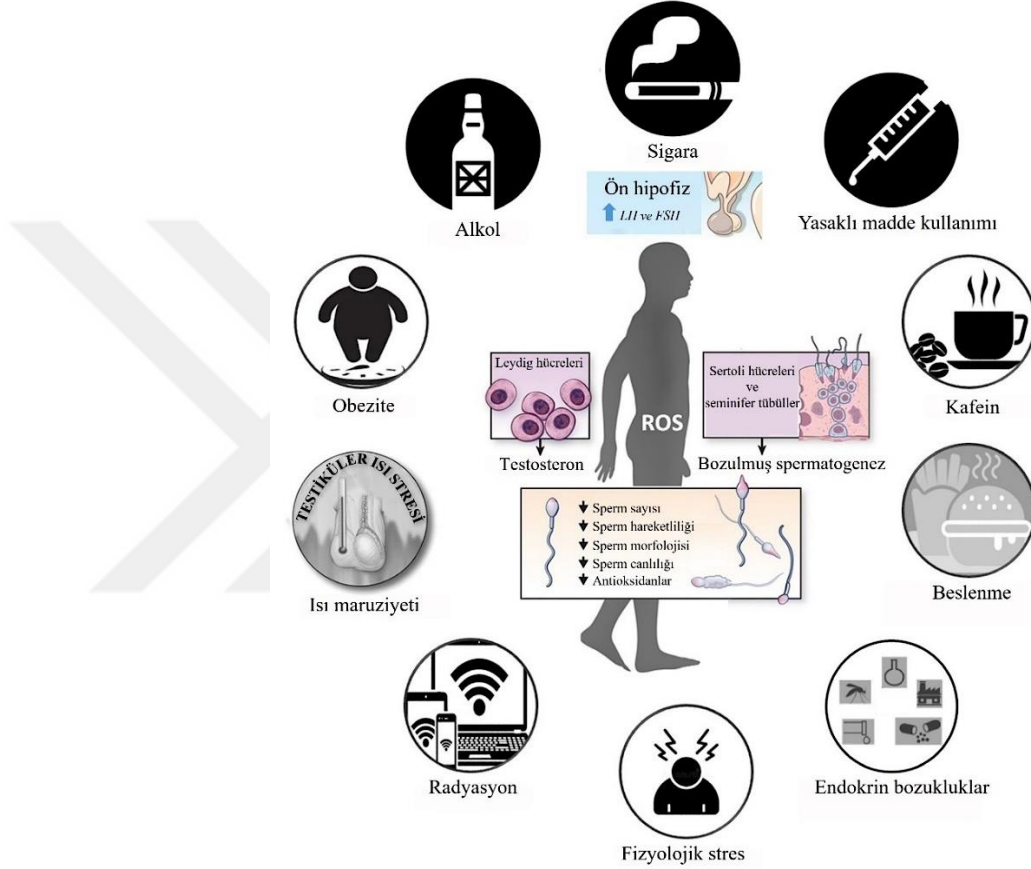


Şekil 2.7. Steroidogenezin şematize edilmiş gösterimi (Lakshmi, 2013).

2.6. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, 12 ay ya da daha uzun süre düzenli ve korunmasız cinsel ilişki sonrası gebelik oluşmaması olarak tanımlanan erkek veya kadın üreme sistemi ile ilgili bir hastalıktır (Hammer ve ark., 2018). Gebe kalmaya çalışan tüm çiftlerin yaklaşık %15'i infertiliteden etkilenirken bu vakaların neredeyse %50'si erkek infertilitesi kaynaklıdır (Sharlip ve ark., 2002). Çalışmalar, son 35 yılda sperm konsantrasyonunda önemli bir düşüş olduğunu işaret etmektedir. Bu durum erkek fertilitesi için bir tehdit olarak görülmektedir (Sengupta ve ark., 2017). Erkek infertilitesi için semendeki spermin düşük seviyeleri ya da yokluğu veya spermin anormal morfolojisi ve motilitesi tanımlayıcıdır (Hammer ve ark., 2018). Literatürde, çevresel faktörler ve sigara, aşırı alkol alımı, obezite gibi yaşam tarzı

faktörlerinin erkek infertilitesinde potansiyel etkisi gösterilmiştir. Çevresel kirleticilere ve toksinlere maruz kalma, gametler için doğrudan toksisite oluşturarak sayılarının azalmasına ve kalitesiz olmasına neden olarak infertiliteye yol açmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Erkek infertilitesi nedenleri şematize edilmiştir (Leisegang ve ark., 2021).

2.7. Etanol

Etanol, etil alkol olarak da adlandırılan ve doymuş karbon atomlarına bağlı hidroksil grubu içeren organik bir bileşiktir. Bitkilerde doğal olarak bulunmaktadır. Kimyasal olarak gösterimi C_2H_6O şeklinde formüle edilip EtOH olarak da ifade edilir. Etanolden fermantasyon yoluyla biyo alkol üretilerek, çeşitli içkiler ve yiyeceklerde kullanılmaktadır. Kimyasal tanımı etanol olan alkol, yıllardır insanlar tarafından farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bu anlamda pek çok kültürde ve yaşam biçiminde kendine yer bulmuştur ve halen de bulunmaktadır. Tıbbi amaçlarla kullanılmasının yanı sıra ilginç bir şekilde

tıbbi tedavi gerektiren bağımlılıklara yol açmasıyla da tanınmaktadır (Pazarcıkcı M, 2020).

2.8. Etanol Metabolizması

Alkollü bir içecek tüketildikten sonra, 10-15 dakika içinde karaciğere, beyne, kalbe ve böbreklere ulaşabilirken, kaslara ve yağ dokusuna ulaşması daha uzun sürmektedir (Finelli ve ark., 2021). Alınan alkol sindirim sistemindeki mukoza epitelinden kolayca emilir. Suda kolay çözünbildiği için özellikle su oranı yüksek dokularda hızlıca dolaşıma katılarak bütün dokulara yayılır. Yağda orta derecede çözünürlüğe sahip olmakla birlikte hücre zarlarını etkilemektedir (Zakhari, 2006).

Vücutta etanolün metabolize edilmesi birkaç aşamada gerçekleşir. Öncelikle etanolün emilimi gerçekleşir ki bu da midede ve en yoğun emilimin gerçekleştiği ince bağırsakta gerçekleşir. Emilimden sonra etanol, kan dolaşımına girerek vücuda dağılır. Etanolün metabolize edilme sürecinin büyük bir kısmı karaciğerde gerçekleşir ve burada etanolün daha az toksik maddelere dönüştürülmesi de sağlanır. Etanol metabolize edilme sürecinde, alkol dehidrojenaz (ADH) yolu enzimatik olarak görev alır. Etanol, ADH enzimi tarafından asetaldehite yıklılır. Bu reaksiyon sırasında NAD^+ koenzimi $NADH$ 'e indirgenir. Daha sonraki basamakta asetaldehid, aldehid dehidrogenaz (ALDH) ile daha az aktif olan asetata dönüşür ve karaciğer hücrelerinde asetil-CoA'ya dönüştürülerek Krebs döngüsüne ya da diğer metabolik yollara katılabilir. Asetil-CoA, Krebs döngüsünde son ürün olarak karbondioksit ve suya dönüşerek vücuttan atılır (Zakhari, 2006; Comporti ve ark., 2010).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ve oluşan oksidanların antioksidan savunma sistemi ile ortadan kaldırılması bir denge içerisinde olması gerekirken, alkolün metabolize edilme sürecinde oluşan toksik moleküller sonucu bu denge bozulabilmektedir (Serafini ve ark., 2004). Bu dengenin bozulması ile oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres sonucu oluşan süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\bullet$) ve peroksil radikali ($ROO^\bullet$) gibi serbest radikaller DNA, protein ve lipid gibi biyomoleküllerle etkileşime girerek hücrel hasara yol açmaktadır

(Babior, 2000). Radikallerin bu zararlı etkileri antioksidan savunma sistemi ve bazı moleküller tarafından ortadan kaldırılmaktadır (Pinnell, 2003). Etanol kullanımının neden olduğu patolojik değişiklikler organa, bölgeye ve yaşa göre değişiklik gösterse de etanol kaynaklı organ hasarından sorumlu bazı ortak mekanizmalar vardır. Oksidatif stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin etanol kaynaklı çoklu organ hasarına katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (Comporti ve ark., 2010).

2.9. Kronik Alkol Tüketimi ve Alkol Bağımlılığı

Kronik alkol tüketimi, uzun süre boyunca düzenli olarak yüksek miktarda alkol alınması durumudur. Uzun süre ve yüksek miktarlarda alkol tüketimi kişinin alkol tüketimini kontrol edemediği durumlarda bağımlılığın gelişmesine neden olur (Pazarcıkcı M, 2020). Alkolün sağlığa zararı hep vurgulanmasına rağmen sadece son yüz yılda alkol bağımlılığı bir hastalık olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (Ilhan ve ark., 2020). DSÖ'nün 2014 yılında yayınladığı alkol ve sağlık alanındaki küresel durum raporu küresel hastalıkların % 5,1'inin alkol tüketimine bağlı olduğunu göstermektedir (DSÖ, 2014). Alkol ve türevleri tüketicilerde fizyolojik, davranışsal ve bilişsel işlev bozukluklarına neden olmaktadır (Finelli ve ark., 2021). Dünya 15 yaş üstü nüfusta kişi başına toplam alkol tüketiminin 2016 yılında 6,4 litre seviyesinde olduğu ve aralıklı ağır içme (ayda en az bir kez 60 gram veya daha fazla saf alkol tüketimi olarak tanımlanır) yaygınlığının, dünya çapında toplam nüfusta 2016'da %18,2 olduğu bildirilmiştir (DSÖ, 2020). Diğer yandan, alkol bağımlısı olan erkek bireyler, sıklıkla cinsel işlev bozukluğu veya infertiliteden şikayet etmektedirler (Sansone ve ark., 2018).

2.10. Erkek İnfertilitesi ve Etanol Kullanımı

Etanol gerek insanlarda gerekse deney hayvanlarında erkek üreme dokularının histolojisini ve fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir (Johnsen, 1970; Kuller ve ark., 1978; Maneesh ve ark., 2006; Talebi ve ark., 2011). Alkole bağlı erkek infertilitesine neden olan mekanizmaların anlaşılması, bağımlı olan erkeklerin çoğunun üreme çağında olmasından dolayı oldukça önemlidir (DSÖ, 2020). Aşırı alkol tüketimi bağımlılığa dönüştüğünde, önemli bir sağlık sorunu

ve erkek infertilitesi açısından olası bir risk halinde gerek steroidogenez gerekse spermatogenez üzerinde doğrudan etkilidir (Gabrielsen ve ark., 2016; İlhan ve ark., 2020). Ağır alkol kullanıcılarında kısmi veya tam spermatogenik duraksama (arrest) ve ortalama testis ağırlığında anlamlı bir düşüş olduğu bildirilmiştir (Pajarinen ve Karhunen, 1984). Alkol bağımlılığı olan erkeklerin seminal sıvı örneklerinin analizi ve hormonal değerlendirmesi ile ilgili sonuçlar, kronik alkol kullanıcılarının testosteron seviyelerinde, seminal sıvı hacminde ve sperm konsantrasyonunda önemli bir azalma olduğunu bunun da semen kalitesini olumsuz yönde etkilediğini bildirmiştir (Kucheria ve ark., 1985; Pajarinen ve ark., 1994; Balercia ve ark., 2005; Muthusami ve ark., 2005; Zhu ve ark., 2007; Li Y. ve ark., 2011; Jensen ve ark., 2014; Ricci ve ark., 2017; Bai ve ark., 2020). Ayrıca yoğun alkol tüketimi sonucu, testiküler germ hücrelerinde artan apoptoz ve Sertoli hücrelerinde lipid birikimi göstererek Sertoli cell-only sendromuna neden olabilir (Pajarinen ve ark., 1994).

İnfertil erkekler ile gerçekleştirilen kapsamlı çalışmalarda alkol tüketimi arttıkça sperm sayılarının düştüğü ve semen kalitesindeki kötüleşmenin arttığı belirtilmektedir (Balercia ve ark., 2005; Jensen ve ark., 2014; Borges ve ark., 2018; Bai ve ark., 2020). İlginç bir şekilde, Ricci ve ekibi, semen hacmi ve konsantrasyonu ile orta düzeyde alkol tüketimi arasında pozitif bir ilişki gözlemlemiştir. Ortaya konulan bulgular, sınırlı bir alkol tüketiminin semen kalitesini iyileştirebileceğini düşündürmüştür (Ricci ve ark., 2018). Bu durum, alkollü içeceklerde bulunan bazı bileşiklerin antioksidan ve anti-inflamatuvar etkilere ve semen kalitesi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olmaları ile açıklanabilir. Ayrıca kandaki artan alkol konsantrasyonu merkezi sinir sistemi ve damar sistemi üzerinde olumsuz etkiler yaparak erektil disfonksiyona neden olabilir (Rachdaoui ve ark., 2017).

Kronik olarak alkol kullanımı, gonadotropin salınımını bozarak LH ve FSH düzeylerini etkiler ve dolaylı olarak testislerde gerçekleşen sperm üretimi ve testosteron salınımı da bu durumdan etkilenir. Hayvan modellerinde yürütülen bir çalışmada genellikle EtOH maruziyeti sonrası dolaşımdaki LH ve FSH

seviyelerinde azalma ve Leydig hücrelerinde azalmış testosteron üretimi olduğu bildirilmiştir (Gavaler ve ark., 1983). Bu nedenle, kronik alkol alımının erkek üreme hormonlarını etkilediğini, özellikle Leydig hücre steroidogenezin inhibisyonuna neden olduğunu ve semen kalitesini olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir. 2005 yılında yapılan bir çalışmada kronik olarak alkol kullanan erkeklerin FSH, LH ve estradiol (E2) düzeyleri önemli bir seviyede artmışken, testosteron hormonu seviyesi önemli ölçüde azalmıştır (Muthusami ve ark., 2005). Diğer yandan Maneesh ve arkadaşları tarafından 45 alkol kullanıcısı erkekte gonadotropinlerin, FSH ve LH seviyelerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (Maneesh ve ark., 2006). Bu durum yoğun alkol kullanımının HPG eksenini bozabileceğini veya Leydig hücre hasarına neden olabileceğini göstermektedir (Muthusami ve ark., 2005; Herman ve ark., 2006; Maneesh ve ark., 2006; Zhu ve ark., 2007). Domuzlar ile yapılan bir çalışmada, EtOH'ın, serum testosteron ve LH seviyelerini azalttığı ve E2 seviyelerini yükselttiği bildirilmiştir. Aynı çalışma, Leydig hücrelerindeki kolesterol seviyesi artarken, StAR proteini, sitokrom P450scc, 3 β -HSD, 17 β -HSD enzimlerinde gerek mRNA gerekse protein ekspresyonları önemli oranda azalmalar olduğunu göstermiştir (Radhakrishnakartha ve ark., 2014). Jensen ve arkadaşları, 8344 sağlıklı erkekte FSH, LH ve inhibin B düzeyleri ile alkol alımı arasında herhangi bir ilişki gözlemlenmemiştir (Jensen ve ark., 2014). Mevcut literatür bilgisi, EtOH'a maruz bırakılan sıçanların Leydig hücre boyutlarının küçüldüğünü ve içerisinde bulunan mitokondrilerin genişlediğini ayrıca daha az miktarda sitozol olduğunu göstermektedir (Eid ve ark., 2019).

Alkolün metabolize edilmesi sırasında vücuttaki serbest radikal üretiminin artmasıyla, vücudun antioksidan savunma sistemi bozularak spermlerin zarar görmesine neden olabilir (Sansone ve ark., 2018). Bu durum spermatogenezin hormonal düzenlenmesinde yer alan spesifik genlerin ekspresyonunu değiştirerek yavrular üzerinde nesiller arası bir etki ile sperm DNA fragmentasyonunu artırmaktadır. Kronik alkol tüketimi ile spermatogenez ve sperm parametrelerinde bozulmaların yanı sıra artan DNA metilasyonu ve oksidatif stres gözlenmesi hem insanlarda hem de hayvanlarda yapılan çok sayıda

Çalışma ile gösterilmiştir (Finelli ve ark., 2021). 2024 yılında yapılmış bir çalışma ile sıçanlara yüksek miktarda ve uzun süre EtOH uygulanmasının epididimis ve seminal veziklde histopatolojiye neden olduğu ve iki dokuda da lipid peroksidasyonu gözlendiğini bildirilmiştir (Taoto ve ark., 2024). Bu iki dokunun lümeninde sperm olgunlaşması, metabolizması ve hareketliliği için salgılanan metabolitlerin miktarının azaldığı görülmüş ve bu sonuçların alkol tüketen erkeklerde infertilite nedenlerinden biri olduğu açıklanmıştır (Taoto ve ark., 2024).

2.11. Endoplazmik Retikulum Stresi (ERS)

ER, karyotik hücrelerde hayatta kalma ve gelişim için oldukça önemli bir organeldir. Hücresel protein üretimi ve katlanmasının üçte biri ER’de gerçekleşir. ER, plazma membranı altında yer alan nüklear zar yönünde uzanan, birbiriyle bağlantılı dallanmış tübüllerden ve sisterna yapısından oluşur (Ajooolabady ve ark., 2023). Yapısal ve işlevsel olarak farklı özellikleri olan iki tür ER vardır. Bunlardan biri yapısında ribozomları bulunduran granüllü ER (GER), diğeri ise ribozom bulundurmayan düz ER (DER)’dir. ER yapısında GER’den sentezlenen proteinlerin nüklear i zarda biriktiği nüklear zar domeyni, DER domeyni ve ribozomların bağlandığı GER domeyni bulunur (Schroder ve ark., 2005). GER, plazma hücreleri ve ̢ hücreleri gibi salgı hücrelerinde yoğun olarak bulunur. DER ise protein sentezinden sorumlu değildir. Bunun yerine lipid ve kolesterol sentezi, steroid hormon üretimi, endojen ve karbondhidrat metabolizması ve kalsiyum dengesinin sağlanması görevlidir (Wu ve ark., 2023).

ER’nin başlıca işlevleri şunlardır:

1. Sekretuvar ve membran proteinlerinin konum değiştirmelerini ve entegrasyonunu sağlar.
2. Protein katlanmasına ve taşınımına yardımcı olur.
3. Lipid biyosentezini gerçekleştirir.
4. Kalsiyum dengesini sürdürür.

5. Proteinlerin post translasyonel modifikasyonlar geçirmesini sağlar (Schuldiner ve ark., 2013; Schwarz ve ark., 2016).

GER’de bulunan ribozomlar protein sentezini ve salgılanmasını gerçekleşirken DER ribozom bulundurmadiğından protein sentezi yapamaz ancak fosfolipidlerin ve lipidlerin sentezlenmesi, karbonhidratların metabolize edilmesi ve kalsiyum dengesinin sağlanması gibi görevleri vardır. Bir hücrede ER’nin fonksiyonunu hücrenin tipi, işlevi ve ihtiyaı belirler (Schuldiner ve ark., 2013).

ER’de bulunan katlanma enzimleri ile birlikte moleküler şaperonlar, proteinlerin doğru konformasyona ulaşarak olgunlaşmasına yardımcı olur ve aynı zamanda yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını gerçekleştirir (Kincaid ve ark., 2007).

ER kapasitesi fizyolojik ya da patolojik sebepler ile aşıldığında protein katlanması kontrol edilemeyerek yanlış katlanma ya da hiç katlanamama gerçekleşir ve bu durum sonucu ortaya çıkan protein birikimi, ERS olarak bilinir (Schonthal, 2012). Oksidatif stres, demir eksikliği ya da fazlalığı, Ca^{2+} sızıntısı, aşırı protein yüklenmesi ve hipoksi gibi durumlar sonucu ERS oluşabilir. ERS oluştuktan sonra hücre yaşayabilmek ve az hasar alarak ERS’den kurtulmak için katlanmamış protein cevabı (Unfolded Protein Response: UPR) olarak bilinen UPR yolağını kullanır. ERS sürecinin uzaması UPR proteinlerin yanıtında başarısızlığa neden olarak apoptotik süreci başlatır (Ajooolabady ve ark., 2023). Etanol kaynaklı ERS’nin karaciğer, pankreas, testis ve kalpte organ hasarına katılımı ve kritik rolü gösterilmiştir (Ji, 2012).

2.11.1 Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)

Katlanamayan, yanlış katlanan veya mutasyona uğrayan proteinlerin birikimi, ER homeostazını bozarak ER’yi işlevsiz hale getirir. Burada devreye UPR adı verilen koruyucu bir mekanizma devreye girer. UPR, ER homeostazını yeniden dengelemeyi hedefler. Stres çok yoğun veya sürekli hale geldiğinde ER hücrenin ölümüne neden olabilir. UPR sinyal yolağı, üç farklı fakat aynı zamanda birbirine bağlı hücre içi sinyal iletim yolu ile çalışır. Bu yollar, ER’de yerleşik üç adet transmembran sensör proteini olan inositol gerektiren kinaz 1 (hem α hem de β

izoformları IRE1), protein kinaz benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6 hem α hem de β izoformları) tarafından başlatılır (Şekil2.9) (Harding ve ark., 1999; Galluzzi ve ark., 2018).

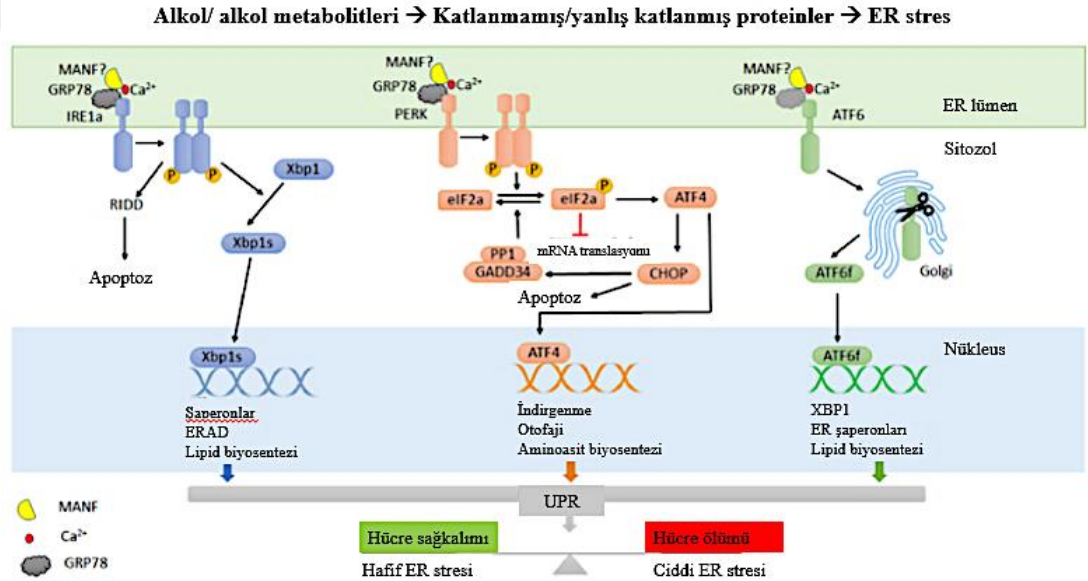
Protein, düz zincir halinde sentezlendikten sonra üç boyutlu hale geçer. Üç boyutlu yapıda herhangi bir sorun olduğunda katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein haline gelerek stres başlatır. ER stresi altında olmayan hücrelerdeki sensör proteinleri, N-terminalleri yoluyla bir ER şaperon 78 kDa glukoz-düzenlenmiş proteine (GRP78/BİP) bağlanarak inaktif halde kalır. ER stresi koşullarında, GRP78 sensör proteinlerinden ayrılarak UPR sinyali aktifleştirilir (Bertolotti ve ark., 2000). Aktifleşen UPR sinyal yolları, protein katlanmasını kolaylaştırmaya ve ER homeostazını sürdürmeye çalışır (Şekil 2.9).

IRE1, ER lümen domeyninden GRP78 ayrıldığında oligomerize olurken kinaz domeyni de otofosforile olur. Aktif hale geçen kinaz domeyni cJun N-terminal kinazı (JNK) aktivasyonunu başlatarak kaspaz aktivasyonunu tetikler. Bununla birlikte, yapısal değişikliklere karşı IRE1 α 'nın RNaz domaini aktifleşerek daha kararlı ve aktif bir form oluşturmak için transkripsiyon faktörü X kutu bağlayıcı protein 1'in (XBP1) eklenmesini düzenler (Yoshida ve ark., 2001). XBP1'ler nükleusa doğru yer değiştirir ve ER şaperonlarının ve endoplazmik retikulum ilişkili yıkım (ERAD) proteinlerinin ekspresyonlarını artırır (Yoshida ve ark., 2001; Acosta-Alvear ve ark., 2007; Ron ve ark., 2007). Ayrıca ER'nin genişlemesini sağlar.

PERK ise sitozolik ve kinaz alanlarından oluşan ER'de yerleşik bir kinazdır (Shi ve ark., 1998; Harding ve ark., 1999). IRE1'e benzer şekilde, PERK aktivasyonu ayrıca dimerizasyon ve trans-otofosforilasyonu içerir. Aktifleşmiş PERK, global protein sentezini azaltmak için translasyon başlatma faktörü eIF2'nin (ökaryotik translasyon başlatma faktörü-2) alt birimini fosforile ederek (Shi ve ark., 1998; Harding ve ark., 1999; Bertolotti ve ark., 2000) ER'ye giren protein miktarını azaltır ve ER stresini hafifletir. eIF2a'nın PERK tarafından fosforilasyonu protein katlanması, amino asit metabolizması ve otofaji ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenleyen aktive edici transkripsiyon faktörü 4'ün (ATF4)

seçici translasyonunu gerçekleştirir (Ameri ve ark., 2008; Luhr ve ark., 2019). ATF4, transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteini (CHOP), büyüme durdurma ve DNA hasarı ile indüklenebilir protein (GADD34) dahil olmak üzere proapoptotik moleküllerin ekspresyonunu düzenler (Şekil 2.9) (Ameri ve ark., 2008; Armstrong ve ark., 2010).

ATF6, N-terminalinde iki Golgi lokalizasyon sinyali (GLS1 ve GLS2) içerir. ERS olmadığı durumlarda, GRP78 (Bip olarak da bilinir), GLS1 ile etkileşim içindedir. Bu sayede ATF6'nın inaktif halde kalmasını sağlar. GRP78 katlanmamış proteinlerle bağlanarak ATF6'dan ayrılır. ATF6 ER'den Golgi aygıtına, ATF6'nın bZIP domeyni içeren N-terminal sitozolik domeyni [ATF6(N)], nükleusa geçer ve UPR'nin aktifleşmesini sağlayarak ER şaperonlarının ve Xbp1'in ekspresyonlarını artırır (Şekil 2.9) (Armstrong ve ark., 2010).



Şekil 2.9. ERS ve UPR mekanizmaları gösterilmiştir (Li H. ve ark., 2022).

2.12. Endoplazmik Retikulum Stres Mekanizmasının Apoptoz ile İlişkisi

ER stresi, hücrelerde protein katlama sürecinde sorunlara neden olabilir. Bu gibi durumlarda UPR mekanizmaları devreye girer. UPR yanıtları yeterli olmadığı zaman, hücre ölümü başlar (Şekil 2.10). CHOP, JNK ve kaspazlar gibi moleküller, bu süreçte oldukça önemli roller oynar ve apoptotik sinyallerin

etkilemektedir (Aldahhan ve ark., 2021). ERS şaperonu GRP78, pakiten spermatositlerde bulunur (Karna ve ark., 2020). Bu durum ERS sinyal yolunun spermatogenez için önemli olduğunu düşündürür (Karna ve ark., 2020). *Drosophila* ile yapılan bir araştırma, ERS geninin erkek aksesuar bezinde çok fazla ifade edildiğini ve güçlü ERS'nin fertilitiyi azalttığını göstermiştir (Chow ve ark., 2015). Farelerde yapılan çalışmalar, tekrarlayan testiküler hiperterminin IRE1-JNK ve PERK yolunun aktivasyonu ile spermatositlerin ERS ilişkili apoptoz ile sonuçlandığını göstermiştir (Soni ve ark., 2018). Varikosel modelinde yapılan çalışmalar da testisteki ROS'a bağlı ERS'nin infertiliteye neden olduğunu ve torsiyon/detorsiyon sonrası testis yaralanmasında ERS'nin germ hücre apoptozuna yol açtığını bildirmiştir (Huang ve ark., 2012). Yaşlanma ile birlikte Leydig hücrelerinin steroidogenik fonksiyonlarında dejenerasyon ve testosteron seviyesinde düşüş görülür. Yaşlanan sıçanların germ hücrelerindeki dejeneratif değişikliklerin nedeni oksidatif stres ve ERS sinyal yolunun spermatogenezdeki rolüne örnek olarak verilebilmektedir (Beattie ve ark., 2015). Hipoksi, sıçan testisinde androjen sentezleyen genleri, kalsiyum akışını, oksidatif stresi ve ERS sinyal moleküllerini artırarak aşağı regüle eder. Diyabetik sıçan modelinde streptozotosin ile indüklenen proapoptotik proteinlerin (kaspaz-3, Bax, Bad, Bid) ve testiküler oksidatif stresin aktivasyonu gözlenmiştir (Liu ve ark., 2012; Zhang G. L. ve ark., 2013). Sisplatin gibi kemoterapi ilaçları da ROS aracılı ERS ile testis toksisitesine yol açar (Soni ve ark., 2015). Bu tür kimyasallar ve ilaçlar, oksidatif stres ve ERS'nin erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir.

2.14. Programlı Hücre Ölümü: Apoptoz

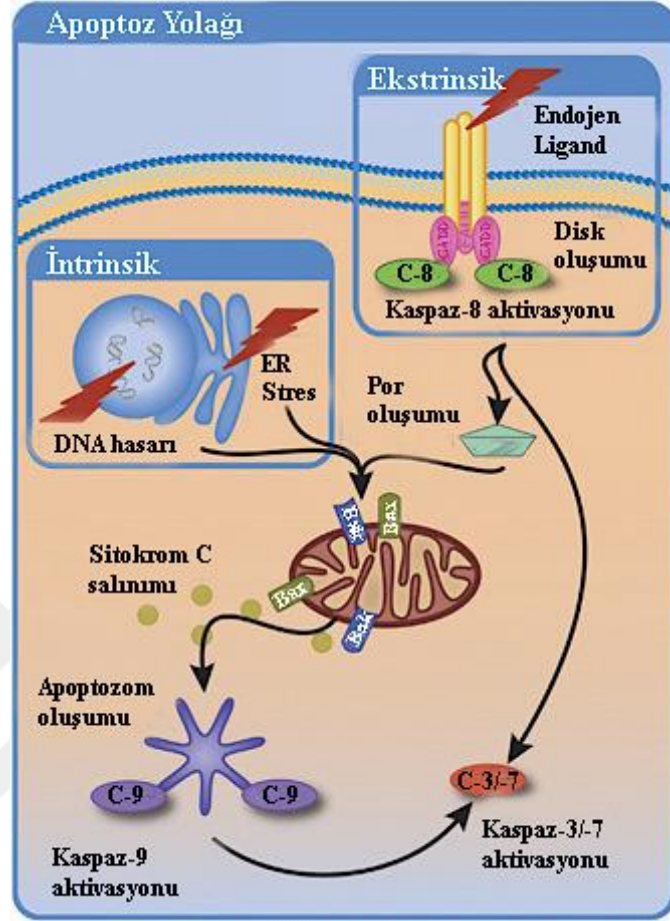
Apoptoz ilk kez 1972 yılında tanımlanmış olan programlanmış fizyolojik hücre ölümü sürecidir (Şekil 2.11) (Fadeel ve ark., 2005). Hızlı ve genetik olarak kontrol edilen bu süreç, hücre ölümünü indükleyen proteinlerin aktivasyonunu içeren çeşitli sinyallerin bir tanesine cevap oluşturmaktadır. Apoptoz mekanizması organizmaların gelişimi, homeostazi ve hastalık süreçlerinde önemli rol oynar. Apoptoz süreci, hücreler zarar gördüğünde veya potansiyel olarak tehlikeli hale geldiğinde kontrollü bir şekilde kaldırılmalarını sağlar. Bu

süreç, çeşitli patolojik durumların anlaşılması ve tedavisi için oldukça önemlidir (Fadeel ve ark., 2005).

Apoptoz, genellikle intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) yollar olmak üzere iki ana yolak üzerinden gerçekleşir. İntrinsik yolak hücrel stres, DNA hasarı, oksidatif stres veya büyüme faktörlerinin eksikliği gibi içsel sinyallerle tetiklenirken ekstrinsik yolak hücre dışı sinyallerin hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanması ile aktifleşir (Elmore, 2007).

Apoptozda görev alan temel moleküller kaspazlar, Bcl-2 protein ailesi ve apoptotik cisimciklerdir. Kaspazlar, apoptoz sürecinde hayati rol oynayan proteazlardır ve hücre içindeki proteinleri parçalayarak hücre ölümünü başlatırlar. Bu proteazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve kaspaz-9) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3 ve kaspaz-7) olarak iki gruba ayrılır. Başlatıcı kaspazlar apoptozu tetikler, efektör kaspazlar ise hücre ölümünü gerçekleştirir. Bcl-2 protein ailesi, hücre ölümünü düzenleyen pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerden oluşur. Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinler hücre ölümünü önlerken, Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinler apoptozu teşvik eder. Apoptoz sırasında hücreler küçülür ve küçük, zarla kaplı veziküller halinde paketlenir; bu yapılar apoptotik cisimcikler olarak adlandırılır. Bu cisimcikler, fagositik hücreler tarafından tanınarak temizlenir ve böylece inflamasyona neden olmadan hücre artıkları ortadan kaldırılır. Bu moleküller, hücre ölümünün düzenlenmesinde ve gerçekleşmesinde kritik öneme sahiptir (Abou-Ghali ve ark., 2015).

Serbest radikallerin fazla üretimi oksidatif stres ve hücre ölümünü indükler (Halliwell ve ark., 1990). Apoptoz modellerinin çoğunda hücrede değişen redoks durumu, kaspaz aktivasyonu ile birlikte daha çok değişmektedir. Tüm apoptoz yollarındaki kaspaz aktivasyonunda reaktif oksijen türevleri önemli bir rol oynamaktadır (Stridh ve ark., 1998). Çeşitli antioksidanların kullanımı ya da kaspaz inhibitörleri apoptozu bloke edebilmektedir (Hockenbery ve ark., 1993; Varesi ve ark., 2022).



Şekil 2.11. Apoptoz mekanizmasının gösterimi (Abou-Ghali ve ark., 2015).

2.15. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi antioksidan savunma mekanizmalarının kapasitesini aştığında bir başka ifadeyle oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkar. Bu dengesizlik, DNA, proteinler ve lipitler gibi hücresel bileşenlere zarar verir ve çeşitli hastalıkların gelişimi için kritiktir (Poprac ve ark., 2017). Serbest radikaller, eşlenmemiş bir elektrona sahip oldukları için hücrelerde tek elektron oksidasyonlarına katılırlar. ROS hem serbest radikal hem de radikal olmayan oksitleyici ajanları kapsar ve normal metabolizma süreçlerinde üretilir. ROS'un düşük seviyelerde hücre sinyalleşmesi ve savunma mekanizmaları için yararlı olabileceği gibi, yüksek konsantrasyonlarda hücre zarına, proteinlere ve nükleik asitlere zarar vererek toksik reaksiyonlara neden olabilir. Bu zararlı etkiler,

birçok hastalığın gelişiminde rol oynar ve oksidatif hasar ile ilişkilendirilmiştir (Pizzino ve ark., 2017).

Etanol metabolizması sonucu oluşan reaktif türevler, hücrelerde oksidatif stresin artmasına yol açabilir. Özellikle karaciğerde, etanolün metabolizması sırasında oluşan reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyon ürünleri, hücre zarına ve mitokondriyal fonksiyonlara zarar vererek oksidatif stresin artmasına katkıda bulunur. Bu durum, antioksidan savunma mekanizmalarının zayıflamasına ve hücrelerin oksidatif hasara karşı savunmasız hale gelmesine neden olabilir (Maneesh ve ark., 2006; Pizzino ve ark., 2017; Sharifi-Rad ve ark., 2020).

Antioksidanlar, oksidatif stresi önlemek ve hücreleri korumak için önemlidir. Bu bileşikler, radikaller ve ROS tarafından hedeflenen moleküllerin oksidasyonunu engelleyip hücre zararını önler. Antioksidan enzimler gibi savunma mekanizmaları, hücrelerin redoks dengesini korur ve oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltır. Antioksidan kapasitesinin ölçülmesi, hastalıkların patofizyolojik faktörlerini değerlendirmede önemli bir araçtır ve oksidatif stres seviyelerini belirlemek için çeşitli biyobelirteçler kullanılır (Varesi ve ark., 2022).

2.16. Antioksidanlar

Antioksidanlar, vücutta oluşabilecek serbest radikallerin oksidatif etkilerini engelleyen veya azaltan moleküllerdir. Serbest radikal oluşumu ve bu radikallerin etkilerinin nötralizasyonu, insan vücudunda önemli bir denge içinde gerçekleşir. Bu denge bozulduğunda hücre hasarı, apoptoz ve DNA hasarı meydana gelebilir. Antioksidanlar reaktif bileşenleri indirgeyerek ve lipid peroksidasyonlarını önleyerek veya doğrudan tepkimeye girerek etki gösterirler. Ayrıca antioksidanlar serbest radikalleri temizleyerek apoptozu inhibe edebilirler (Zhang Y. ve ark., 2002).

2.16.1. Asetil L-karnitin

Asetil-L-karnitin, ALCAR veya ALC olarak da bilinen L-karnitinin asetillenmiş, vücutta en çok bulunan bir açilkarnitin formudur. İnsan vücudundan doğal bir şekilde üretilebilirken takviye olarak dışarıdan da alınabilir (Ozcelik ve ark., 2010). Asetil L-karnitin, enerji (Aureli ve ark., 1994; Scafidi ve ark., 2010), asetilkolin (Schnackenberg ve ark., 2001), amino asit nörotransmitterleri ve lipidlerin (Ricciolini ve ark., 1998) sentezi için kullanılabilen karnitin ve bir açil bileşeni sağlama gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Ayrıca plazma esterazları tarafından parçalanarak karnitine dönüşür ve vücuttaki yağ asitlerinin parçalanması için mitokondriye taşınımını sağlar. Asetil L-karnitinin antiinflamatuvar etkileri olduğu (Aureli ve ark., 1994), membranların stabilizasyonuna yol açtığı (Jones ve ark., 2010), oksidatif strese karşı koruyucu bir antioksidan görevi gördüğü (Eleftheriadou ve ark., 2021) ve enerji metabolizmasını güçlendirdiği bilinmektedir (Scafidi ve ark., 2010). Asetil L-karnitin, glutasyonu arttırarak yağ asitlerinin peroksidasyonu ile bu tepkimenin son ürün olan malondialdehit (MDA) seviyesini düşürerek önemli bir koruyucu görev görür (Ozcelik ve ark., 2010). Ayrıca Asetil L-karnitinin ksantin oksidazı inhibe edebildiği ve bu sayede oksidatif hasarı engelleyebildiği bildirilmiştir.

Yetişkin ratların mide, böbrek, karaciğer ve testis dokuları ile yapılan bir çalışmada L-karnitin uygulamasının oksidatif ve apoptotik belirteçleri azalttığı gösterilmiştir (Kelek ve ark., 2019).

2.17. Erkek İnfertilitesi ve Asetil L-karnitin

Erkek infertilitesi sorunundan dünya genelinde birçok çift etkilenmektedir. Hormonal dengesizlikler, genetik faktörler, çevresel toksinler, yaşam tarzı faktörleri ve oksidatif stres erkek infertilitesinin nedenlerinden bazılarıdır. İnfertilite için antioksidan tedavilere ve besin desteklerine olan ilgi giderek artmaktadır. Bu bağlamda, asetil L-karnitin dikkate değer bir bileşen olarak öne çıkmaktadır.

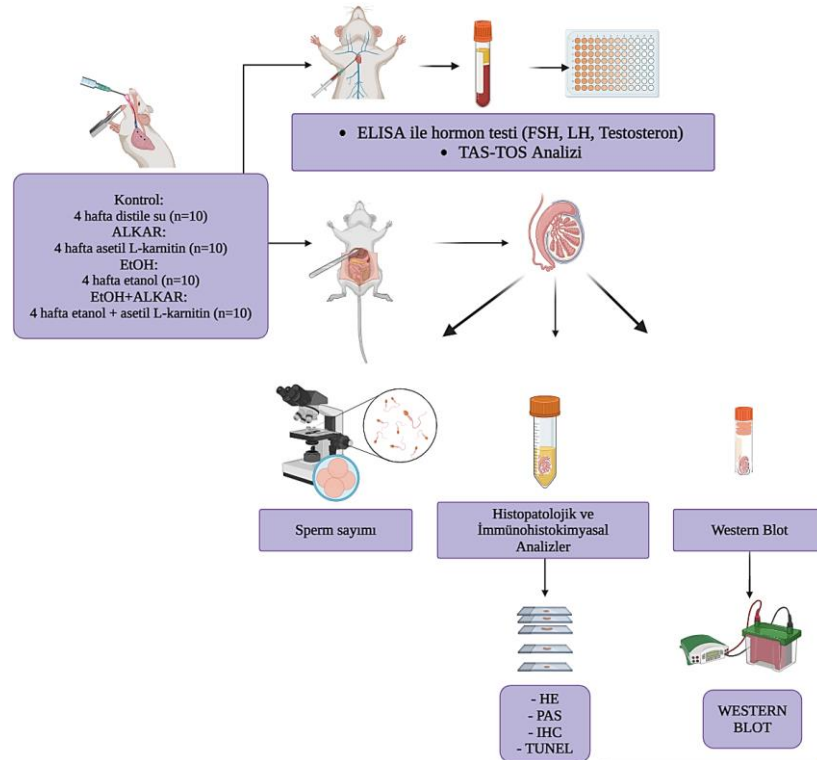
Klinik çalışmalar, asetil L-karnitin takviyesinin sperm hareketliliğinde ve sayısında anlamlı iyileşmeler sağladığı gözlemlenmiştir (Balercia ve ark., 2005).

2009 yılında yapılan bir çalışma sonucunda, lipopolisakkarit (LPS) sonucu artan proinflamatuvar ve oksidatif stres belirteçlerinin L-karnitin ile iyileşme gösterdiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada LPS sonucu testiküler disfonksiyon oluşurken L-karnitin sonrası LPS verildiğinde L-karnitin koruyucu bir rol oynayarak LPS'nin olumsuz etkilerini azaltmıştır (Abd-Allah ve ark., 2009). Çeşitli çalışmalar, asetil L-karnitin sperm hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonlarını desteklediğini ve oksidatif hasarı azalttığını doğrulamaktadır. Asetil L-karnitin tedaviden önce başlangıçta yüksek ROS düzeyleri olan infertil erkeklerde sperm kalitesini iyileştirdiğini de bildirilmiştir (Vessey ve ark., 2021). Bu etkiler, asetil L-karnitin erkek infertilitesine karşı potansiyel bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen 270-390 gram ağırlıklarında, 40 adet yetişkin Wistar erkek rat kullanılmıştır. Deney grupları aşağıda gösterildiği gibi oluşturulmuştur:

1. Kontrol grubu (K): gavaj yoluyla 4 hafta süreyle distile su verilmiştir (n=10),
2. Kronik etanol (EtOH) grubu: gavaj yoluyla 4 hafta süreyle 5gr/kg %25 etanol verilmiştir (Hughes ve ark., 2020). (n=10),
3. Asetil L-karnitin grubu (ALKAR): gavaj yoluyla 4 hafta süreyle (Akbari ve ark., 2017) 50 mg/kg asetil L-karnitin (Kelek ve ark., 2019) verilmiştir (n=10),
4. Kronik etanol ve asetil L-karnitin (EtOH+ALKAR) grubu: gavaj yoluyla 4 hafta süreyle aynı dozlarda etanol ve asetil-L-karnitin verilmiştir (n=10).



Şekil 3.1. Deney grupları ve yapılacak uygulamalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.

3.1. Testis Dokularının Eldesi ve Hazırlanması

Deney hayvanları, 4 hafta sonunda ketamin (50 mg/kg)-ksilazin (6 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edildikten sonra testis dokusu çıkarılarak ayrı ayrı tartılmış ve daha sonra ölçülecek parametreler için saklanmak üzere bir testis sıvı nitrojene, diğer testis ise parafine gömülmek için Bouin fiksatifine alınmıştır.

3.2. Testis Ağırlık İndeksi Hesaplaması

Hayvanlar sakrifiye edilmeden hemen önce ölçülen vücut ağırlıkları ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlıkları toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için testis ağırlık indeksi (TAİ) değerleri belirlenmiştir.

$$TAİ = \frac{(\text{sağ testis ağırlığı (g)} + \text{sol testis ağırlığı (g)})}{\text{tüm vücut ağırlığı (g)}} \times 100$$

3.3. Epididimal Sperm Örneklerinin Toplanması ve Sperm Motilite Değerlendirmeleri

Deney süreci tamamlandığında kontrol ve deney grubu hayvanlarda, skrotal kese üzerinde tek bir orta hat kesisi yapılarak deri kas tabakasından ayrılmıştır. Daha sonra kas üzerinden benzer bir enine kesik yapılarak testis dışarı çıkarılmış, kauda epididimis yağ tabakasıyla birlikte testisten ayrılmıştır. Çıkarılan epididimisin vaz deferense açılan kauda kısmı 37°C'de 1.5 mL önceden ısıtılmış fosfat tamponlu salin (PBS, pH = 7.4) içinde parçalanmıştır. Spermatozoanın dağılabilmesi için petride dokuya hafifçe çalkama yapılmıştır (5-10 dakika). Numuneler, 37°C'de 20-25 dakika inkübe edilmiş ve örnekten alınan 10 mikrolitrelik kısım, mikroskop altında Makler sayım kamerasında incelenmiştir. Sayımlar aynı hayvandan en az 2 örnek üzerinden (tek hayvandan en az 200 sperm sayılarak) yapılarak, hareketli sperm motilitesi yüzde (%) olarak belirlenmiştir (Celik-Ozenci ve ark., 2012).

3.4. Parafin Takibi

Testis dokuları bouin solüsyonunda +4°C’de 12 saat fikse edilerek laboratuvarımızdaki rutin doku takibi protokolü uygulanmıştır. %70, %80 ve %90’lık etanolde birer gün bekletilen testisler, %100’lük etanolde 3 saat tutulup, ksilol ile dokunun şeffaflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Şeffaflaştırma işlemi, üç seri ksilol solüsyonunda yapılmıştır. Şeffaflaştırmadan sonra parafin I, parafin II ve parafin III aşamalarında, birer saat 60°C’lik etüvde bekletilerek parafinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda testis örnekleri temiz parafin içinde uygun oryantasyonda gömülmüştür. Bloklardan rotari mikrotom (Leica RM2125 RTS) kullanılarak 5µm kalınlığında seri kesitler pozitif şarjlı lamaların üzerine alınmıştır.

3.5. Histopatolojik Analizler

Tüm hayvan örneklerine ait parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen Eozin (H&E) ve PAS (Periodic Acid Schiff) boyaması ile histopatolojik değerlendirme yapılmıştır.

3.5.1. Hematoksilen Eozin Boyaması

H&E, rutin incelemeler için kullanılan histolojik bir boyama tekniğidir. Hücre nükleuslarını mavi-mor arası boyayan bazik karakterdeki hematoksilen, hücre sitoplazmalarını, kas liflerini ve sitoplazmik organelleri pembe-kırmızı boyayan ise asidik karakterdeki eozindir.

Parafin bloklardan alınmış olan kesitler sıcaklığı 60°C olan etüv içerisinde gece boyu bekletilerek parafinden arındırıldıktan sonra ksilol ve alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirilmiştir. Daha sonra suya alınıp 5 dakika yıkandıktan sonra, 30 saniye Mayer hematoksilene daldırıldıktan sonra akarsu altında tekrar yıkanmıştır. Yıkamadan sonra eozine 2-3 kere daldırılıp çıkarılarak tekrar akarsu altında yıkanmıştır. Alkol serilerinden ve ksilolden geçirilip entellan ile kapatılmıştır.

3.5.2. Periyodik Asit-schiff Boyaması

PAS boyası, glikojen varlığında kırmızı ve mor karışımı bir renk verir. Periyodik asit ve Schiff solüsyonları arka arkaya kullanıldığında ise açık pembe bir renk alır. Farklı glikojen konsantrasyonlarında renk yoğunlukları farklılıklar gösterir. PAS boyası ile özellikle seminifer tübülde bulunan akrozomal kep yapısı ayırt edilmektedir.

Parafin bloklardan alınmış olan kesitler sıcaklığı 60°C olan etüv içerisinde gece boyu bekletilerek parafinden arındırıldıktan sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirilmiştir. Daha sonra musluk suyundan geçirilerek %1'lik periyodik asitte (H5IO6) 5 dakika oksidize edildikten sonra %70'lik alkolde çalkalanmıştır. 45 dakika Schiff solüsyonunda muamele edilmiş ve ardından akarsu altında yıkanmıştır. Hemaloun ile 30 saniye boyandıktan sonra akarsu altında yıkanmıştır. Alkol serilerinden ve ksilolden geçirilip entellan ile kapatılmıştır.

3.5.3. Testis Kesitlerinde Modifiye Johnsen Skorlaması

H&E ile boyanan testis kesitlerinde seminifer tübüllerin yapısını ve spermatogenezi değerlendirmek için Johnsen skorlaması yapılmıştır (Johnsen, 1970). Bu amaçla, testis örneklerine ait kesitlerde 20x objektifteki randomize farklı alanlar incelenerek, her grup için toplam 200 seminifer tübül değerlendirilmiş ve Johnsen kriterlerine göre 1'den 10'a kadar skorlanmıştır.

Tablo 3.1. Johnsen skorlama metodu (Johnsen, 1970).

	Morfoloji
Skor 1	Germ hücresi ve Sertoli hücresi yok
Skor 2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi mevcut
Skor 3	Sadece spermatogonya mevcut
Skor 4	Sadece birkaç spermatosit mevcut
Skor 5	Spermatozoa veya spermatid yok, ancak birçok spermatosit mevcut
Skor 6	Sadece birkaç spermatid mevcut
Skor 7	Spermatozoa yok ancak birçok spermatid mevcut

Skor 8	Sadece birkaç spermatozoa mevcut
Skor 9	Çok sayıda spermatozoa mevcut ve organizasyonu bozulmuş spermatogenez
Skor 10	Tam spermatogenez ve mükemmel tübüller

3.6. İmmünohistokimya

Deney gruplarından alınan testise ait parafin kesitlerde ERS belirteçlerinden GRP78, CHOP, XBP1, steroidogenez belirteçlerinden StAR, p450scc, 3 β -HSD, 17 β -HSD3, LHR ve apoptoz belirteci aktif kaspaz-3 proteinleri için Tablo 3.2’de belirtilen dilüsyonlar kullanılarak immünohistokimya yöntemi ile boyamalar gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. İmmünohistokimya Protokolü

1. Testislere ait parafin bloklardan 5 μ m kesitler alındıktan sonra 60°C etüvde bir gece bekletilmiştir.
2. Ksilol ile parafin kesitten uzaklaştırılmış ve alkol serilerinden geçirilerek (%100, %90, %80, %70) kesitler distile suya alınmıştır.
3. Antijen retrieval uygulaması sitrik asit solüsyonunda mikrodalgada 2 kez 7 dakika (800W) kaynatılarak gerçekleştirilmiş ve oda ısısında 20 dakika boyunca soğumaya bırakılmıştır.
4. Distile suda yıkama yapıldıktan sonra dokuda endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için dokulara 20 dakika boyunca %3’lük hidrojen peroksit solüsyonu [63 ml metanol (Merck, #106009) +7 ml hidrojen peroksit (Sigma, #18304)] ile inkübe edilmiştir.
5. Bu işlemde sonra kesitler TBS (Tris-buffered saline) solüsyonunda 3 kez beşer dakika yıkanmış ve dokuların etrafı hidrofobik kalem (Merck, #Z377821) ile çizilmiştir.
6. 7 dakika boyunca ‘Ultra V Block (Lab Vision, #TA-060-UB)’ ile muamele edilerek non-spesifik bağlanma bölgeleri bloklanmıştır.
7. Yıkama yapılmadan, antikor dilüenti (Thermo Scientific, #TA-125-UD) ile hazırlanan uygun dilüsyonlarda antikorlar (GRP78, CHOP, XBP1, StAR, p450scc, 3 β -HSD, 17 β -HSD3, LHR ve aktif kaspaz-3) kesitler üzerine

uygulanmıştır (Tablo 3.2). Negatif kontrol için kesitlere TBS damlatılmış ve dokular gece boyu +4°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

8. İnkübasyon sonrası, TBS solüsyonu ile 3 kez beşer dakika yıkama yapıldıktan sonra biyotinli anti rabbit sekonder antikor (Tablo 3.2) kesitlerin üzerine damlatılmış ve 45 dakika inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyon sonrası TBS solüsyonu içerisinde 3 kez beşer dakika yıkanan kesitler streptavidin peroksidaz solüsyonu (Thermo Fisher, #TS-060-HR) ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiş ve 20 dakikanın sonunda 3 kez beşer dakika TBS solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
10. Yıkama işleminden sonra DAB (Di-Amino Benzidine) (Sigma Aldrich, #D4168-50) kromojeni ile reaksiyon ışık mikroskobu altında görünür hale getirilmiş ve Mayer’in hematoksileninde zıt boyama yapıp artan alkol serileri ve ksilollerden geçirilen kesitler entellan ile kapatılmıştır.
11. Işık mikroskobu (Olympus CX23) düzeyinde tüm deney gruplarındaki hedef proteinlerin testisteki ekspresyon ve lokalizasyonları ImageJ analiz yöntemi ile değerlendirilmiştir. StAR, p450scc, 3β-HSD, 17β-HSD3 ve LHR proteinleri için pozitif boyanan Leydig hücre sayıları yüzde (%) olarak belirlenmiş ve bu amaçla her bir kesitten 200 adet hücre sayılmıştır. GRP78, CHOP ve XBP1 proteinlerinin ekspresyon yoğunluğu ve şiddetinin belirlenmesi için ImageJ analiz yöntemi kullanılmıştır. Aktif kaspaz-3 proteini için ise her hayvandan 200 adet tübül sayılarak aktif kaspaz-3 pozitif seminifer tübül indeksi çıkartılmıştır.

3.7. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling) Yöntemi

Apoptotik hücrelerin tespiti için TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Protokol, parafin kesitlerde üretici firmanın talimatları doğrultusunda kit (in situ cell death detection kit, ROCHE) yardımıyla uygulanmıştır.

3.7.1. Kit Protokolü

1. 5 µm kalınlığındaki parafin kesitler, öncelikle ksilol ile deparafinizasyon işlemine (ksilol 1 ve 2 de beşer dakika) tabii tutulmuş ve daha sonra azalan

alkol serileri (%100, %90, %80, %70 alkol serisinin her birinde 5 dakika) ile rehidratasyon protokolü uygulanmıştır.

2. Fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonuna alınan kesitlere, +4°C’de %0.1 Triton X-100 içerisinde hazırlanan sodyum sitrat solüsyonu ile permeabilizasyon işlemi uygulanmıştır.
3. PBS ile yıkanan kesitler, nemli ortamda (humidified chamber), uygun dilüsyon (1:2) ve sürede TUNEL reaksiyon karışımı içinde 37°C’de 90 dakika bekletilmiştir.
4. Negatif kontroller için kesitlere TUNEL dilüsyon buffer (Roche, #11966006001) ve işaretleme solüsyonu (1:1) eklenmiştir.
5. Converter-AP (Roche, #11684809910) ile 37°C’de, karanlık ve nemli olan bir ortamda inkübasyon yapıldı.
6. PBS ile yıkanan kesitler, oda sıcaklığında Fast Red substrat solüsyonunda (Sigma, #F4648) bekletilmiştir.
7. Mayer’in hematoksileni (Merck, #M105174.0500) kullanılarak zıt boyama yapılmış ve yıkama sonrasında Kaisers jelatin (Merck, #M1092420100) kullanılarak lamel ile kesitler kapatılmıştır.
8. Testis kesitlerinde kırmızı-pembe renkte boyanan TUNEL pozitif hücreler sayılarak seminifer tübüller için (%) apoptotik indeks hesaplanmıştır.

3.7. Western Blot Analizi

Deney gruplarından alınan testis örneklerinde ERS belirteçlerinden GRP78, CHOP, XBP1, steroidogenez belirteçlerinden StAR, p450scc, 3β-HSD, 17β-HSD3, LHR ve apoptoz belirteci aktif kaspaz-3 proteinlerinin Tablo 3.2’de belirtilen dilüsyonları kullanılarak semikantitatif değerlendirilmesi için western blot yöntemi ile analiz yapılmıştır.

3.7.1. Western Blot Protokolü

1. Total testiste, 0,2 gram dokuya 600 µl lysis buffer ile 10µl proteaz inhibitör kokteyli (Sigma, #P8340) olacak şekilde hesaplamalar yapılarak sonikatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Tüm örnekler, 15000×g hızında, +4°C

- sıcaklıkta 10 dakika boyunca santrifüj edilerek elde edilen süpernatantlar, protein lizatları hazırlamak üzere -80°C’de saklanmak üzere ayrılmıştır.
2. Dokularda bulunan protein miktarları BCA kiti (Vector Lab, #PK-6100) ile tespit edilerek, elektroforez öncesi, 100°C sıcaklıktaki su içerisinde örnekler 5 dakika boyunca kaynatılmıştır.
 3. Jel elektroforezi için %10’luk TGX FastCast Acrylamide Kit (BIORAD, #161073) ile jel hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 9 µl örnek, eşit protein miktarlarıyla yüklenmiş ve Mini Protean Sistem III tankının içine yerleştirilmiştir.
 4. Mini Protean Sistem III tankı içerisine elektroforez tamponu eklendikten sonra tank güç kaynağına bağlanmıştır. Proteinler, önce 15 dakika boyunca 80 voltta, ardından 100 voltta yaklaşık 100 dakika boyunca elektroforez edilmiştir.
 5. Elektroforezden sonra proteinler Mini Protean III sistemi ile PVDF membrana (BIORAD, #162-0177) transfer edilmiştir. Transferden sonra, TBS-T (Tris tamponlu tuz solüsyonu + %0.1 Tween-20) içinde % 5 oranında yağsız süt tozu (BioRad, #170-6404) ile hazırlanan bloklama çözeltisi, oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde membranlara uygulandı.
 6. Bloklama solüsyonu içinde sulandırılmış olan primer antikorlar (GRP78, CHOP, XBP1, StAR, p450scc, 3β-HSD, 17β-HSD3, LHR, aktif kaspaz-3 ve β-aktin) kullanılarak +4°C’de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir (Tablo 3.2).
 7. İnkübasyondan sonra TBS-T ile 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek membranlar toplam 30 dakika yıkanmıştır.
 8. Membran, bloklama solüsyonu ile seyreltilmiş horseradish peroksidaz (HRP) konjuge anti rabbit sekonder antikorla (Tablo 3.2) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 45 dakika inkübe edilmiştir.
 9. İnkübasyondan sonra toplam 30 dakika, her 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu değiştirilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
 10. Membran SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (Thermo, #170-6404) ile karanlıkta 5 dakika inkübe edilmiş ve 5 dakikanın

sonunda membran üzerindeki fazla solüsyon toplanarak Azure C280 cihazında okutulmuştur. Testis örneklerinde GRP78, CHOP, XBP1, StAR, p450scc, 3 β -HSD, 17 β -HSD3, LHR ve aktif kaspaz-3 protein ekspresyonları belirlenmiş ve β -aktin ile normalize edilerek semikantitatif olarak ImageJ analizi ile protein seviyeleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.2. İmmünohistokimya ve Western Blot yöntemlerinde kullanılan primer ve sekonder antikorların dilüsyonları sunulmuştur.

		Firma/ Katalog no	İmmünohistokimya	Antijen retrieval metodu	Western Blot
			Dilüsyon		Dilüsyon
Primer antikorlar	GRP78	Bioss #bs-1219R	1:250	Sitrik Asit	1:1000 (TBS-T solüsyonu içinde)
	CHOP	Bioss #bs-1361R	1:250	Sitrik Asit	1:250 (TBS-T solüsyonu içinde)
	XBP1	Abcam #ab37152	1:300	Sitrik Asit	1:500 (TBS-T solüsyonu içinde)
	StAR	Proteintech #12225-1-AP	1:250	Sitrik Asit	1:1000 (TBS-T solüsyonu içinde)
	p450scc	Abcam # ab175408	1:1500	Sitrik Asit	1:1500 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	3 β -HSD	Santa Cruz Biotechnology #sc-515120	1:300	Sitrik Asit	1:1000 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	HSD17B3	Invitrogen # PA5-30063	1:1500	Sitrik Asit	1:500 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	LHR	Abcam #ab125214	1:5000	Sitrik Asit	1:200 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	Aktif kaspaz-3	Cell Signalling #9661L	1:300	Sitrik Asit	1:1000 (%5 yağsız süt tozu içinde)
	Beta-aktin	Abcam #ab6276			1:3000 (%5 yağsız süt tozu içinde)
Sekonder antikorlar	Biotinylated anti-rabbit	Vector Laboratories #BA-1000	1:500		
	HRP-conjugated anti rabbit	Vector Laboratories #PI-1000			1:3000 (%5 yağsız süt tozu içinde)

3.9. Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELİSA) Yöntemi ile Serum Hormon Düzeylerinin Belirlenmesi

Kontrol ve deney gruplarının abdominal aortundan kan örnekleri heparinize kan tüplerine alınmıştır. Kan örnekleri 1000×g'de 20 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve analizler gerçekleştirilinceye kadar kan serum örnekleri - 80°C'de muhafaza edilmiştir. ELISA deneylerinden hemen önce kan örnekleri oda sıcaklığına alınmıştır.

3.9.1. Sandviç ELİSA Yöntemi ile Serum LH ve FSH Düzeylerinin Belirlenmesi

Rodent LH (Elabsciences, #E-EL-R0391) ve FSH (Elabsciences #E-EL-R0026) düzeylerinin belirlenmesi amacı ile uygun sandviç ELİSA kiti kullanılmıştır.

1. Serum örnekleri oda ısısına getirildikten sonra stok standart çözeltisi seyreltme çözeltisi ile seyreltilerek standart çalışma serisi hazırlanmıştır (20 ng/mL'lık stok standart çözeltisinden 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0. ng/mL konsantrasyonlarında).
2. Standartlar (S0, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 ve S8), blank ve serum örnekleri 100µL ve 2 kopya olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiştir.
3. 96 kuyucuklu plakanın üzeri kit içerisinde bulunan kapatıcıyla kapatılarak 37°C sıcaklıktaki etüvde 90 dakika inkübe edilmiştir.
4. Örnekler kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan tüm kuyucuklara 100 µl biotin ile işaretlenmiş antikör eklenmiş ve 37°C'deki etüvde 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon karışımı kuyucuklardan uzaklaştırılıp her kuyucuğa 350 µL yıkama solüsyonu eklendikten sonra 1 dakika beklenerek bu solüsyon ile 3 kez yıkanmıştır.
5. Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjuge çalışma solüsyonu eklenmiş ve plakanın üzeri yeni bir kapatıcı ile kapatılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

6. İnkübasyon karışımı kuyucuklardan uzaklaştırılıp 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Bütün kuyucuklara 90 µL Substrat reaktifi eklenmiş ve karanlık ortamda 37°de 15 dakika inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyonun ardından, tüm kuyucuklara 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiş ve kuyucuklardaki mavi renk sarıya dönüşmüştür.
8. Oluşan reaksiyonlar, BioTek EPOCH mikropłaka okuyucusu (BioTek, Vermont, ABD) kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.
9. Optik dansite (OD) değerleri, kontrol ve deney gruplarından elde edilen serumlar için kaydedilmiştir.
10. Standart çalışma çözeltilerinin absorbansı kullanılarak bir standart eğri oluşturularak bu eğri üzerinden serumdaki hormon konsantrasyonları hesaplanmıştır. LH ve FSH konsantrasyonları ng/mL birimiyle ifade edilmiştir.

3.9.2. Yarışmacı (Competitive) ELİSA Yöntemi ile Serum Testosteron Düzeyinin Belirlenmesi

Rodent testosteron düzeylerinin belirlenmesi amacı ile yarışmacı ELİSA kiti (Elabsciences, #E-EL-0155) kullanılmıştır.

1. Serum örnekleri oda ısısına getirildikten sonra stok standart çözeltisi seyreltme çözeltisi ile seyreltilerek standart çalışma serisi hazırlanmıştır (20 ng/mL'lık stok standart çözeltisinden 20; 10; 5; 2.5; 1.25; 0.62; 0,31; 0. 0 ng/mL konsantrasyonlarında).
2. Standartlar (S0, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 ve S8), blank ve serum örnekleri dublike olarak 50µL kuyucuklara yüklenmiştir.
3. Her kuyucuğa hemen 50 µL Biotinlenmiş Tespit Ab çalışma solüsyonu eklenmiş ve plaka kitte sağlanan kapatıcıyla kapatılarak 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.
4. Solüsyon kuyucuklardan uzaklaştırılıp bütün kuyucuklar 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjuge çalışma solüsyonu eklenerek plaka yeni bir kapatıcıyla kapatılmış ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

5. Bütün kuyucuklardan solüsyon uzaklaştırılmış ve 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanmıştır.
6. Tüm kuyucuklara 90 µL Substrat Reaktifi eklenerek 37°C'deki inkübatörde yaklaşık 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklenmiş ve kuyucuklardaki mavi renk sarıya dönüşmüştür.
7. Oluşan reaksiyon BioTek EPOCH microplaka okuyucu (BioTek, Vermont, USA) kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Standart çalışma çözeltilerinin absorbansı kullanılarak bir standart eğri oluşturularak bu eğri üzerinden serumdaki hormon konsantrasyonları hesaplanmıştır. Testosteron konsantrasyonları ng/mL birimiyle ifade edilmiştir.

3.10. Total Antioksidan Seviyenin (TAS) Belirlenmesi

Total antioksidan seviyesi, Rel assay total antioxidant status (TAS) assay kit (#RL0017) ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar spektrofotometre (BioTek, MQX200 microplate reader) cihazıyla ölçülmüştür.

Ticari olarak satın alınan kit içerisinde Standart, kalite kontrol-seviye 1 (L1), kalite kontrol-seviye 2 (L2), reaktif 1-tampon ve reaktif 2-ABTS radikal katyonu bulunmaktadır.

3.10.1 Kit Protokolü

1. Steril 96 kuyucuklu plakaya, sırasıyla standart, L1 ve L2 solüsyonları ve oda ısısına getirilmiş serum örnekleri 9 µl eklenmiştir.
2. Tüm kuyucuklara reaktif 1 tamponu 150 µl eklenerek pipetleme yapılmıştır.
3. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, plaka spektrofotometrede 660 nm'de ölçülmüş ve elde edilen ilk absorbans değeri A1 olarak kaydedilmiştir.
4. Aynı plakadaki tüm örneklere reaktif 2 solüsyonu 22,5 µl şeklinde eklenmiş ve 5 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında

660 nm’de ölçülmüş ve elde edilen ikinci absorbans değeri A2 olarak kaydedilmiştir.

5. Sonuç olarak aşağıdaki formüle göre bir hesaplama yapılmıştır.

$$\Delta std1 = std1'in\ 2.\ absorbans\ -\ std1'in\ 1.\ absorbans$$

$$\Delta std2 = std2'nin\ 2.\ absorbans\ -\ std2'nin\ 1.\ absorbans$$

$$\Delta Örnek = örneğin\ 2.\ absorbans\ -\ örneğin\ 1.\ absorbans$$

$$TAS\ (\frac{mmol}{L}) = \frac{[\Delta std1 - \Delta Örnek]}{[\Delta std1 - \Delta std2]}$$

3.11. Total Oksidan Seviyenin (TOS) Belirlenmesi

Total oksidan seviyesi, rel assay total oxidant status assay kit (#RL0024) ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar spektrofotometre (BioTek, MQX200 microplate reader) cihazıyla ölçülmüştür. TOS analizi kolorimetrik bir yöntemdir ve temeli Ferröz (Fe⁺²) demir kompleksinin okside olarak ferrik (Fe⁺³) demir kompleksine dönüşmesine dayanır.

Ticari olarak satın alınan kit içerisinde standart, kalite kontrol-seviye 1 (L1), kalite kontrol-seviye 2 (L2), reaktif 1-tampon ve reaktif 2- prokromojen bulunmaktadır.

3.11.1. Kit Protokolü

1. Steril 96 kuyucuklu plakaya, sırasıyla standart, L1 ve L2 solüsyonları ve oda ısısına getirilmiş serum örnekleri 22,5 µl eklenmiştir.
2. Tüm kuyucuklara reaktif 1 tamponu 150 µl eklenerek pipetleme yapılmıştır.
3. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, plaka spektrofotometrede 530 nm’de ölçülmüş ve elde edilen ilk absorbans değeri A1 olarak kaydedilmiştir.
4. Aynı plakadaki tüm örneklerle reaktif 2 solüsyonu 7,5 µl şeklinde eklenmiş ve 5 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 530 nm’de ölçülmüş ve elde edilen ikinci absorbans değeri A2 olarak kaydedilmiştir.

Sonuç olarak aşağıdaki formüle göre bir hesaplama yapılmıştır.

$\Delta_{std} = \text{std'nin 2. absorbansı} - \text{std'nin 1. absorbansı}$

$\Delta_{\text{Örnek}} = \text{örneğin 2. absorbansı} - \text{örneğin 1. absorbansı}$

$$\text{TOS} \left(\mu \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta_{\text{Örnek}}}{\Delta_{std}} \times 10$$

3.12. Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi

Dokulardaki oksidan-antioksidan dengenin bir göstergesi olarak kullanılan OSİ, TOS ve TAS değerlerinin oranlanmasıyla hesaplanmaktadır. Bu hesaplama sonucu çıkan değer, oksidatif stres derecesini belirler. OSİ, TOS ve TAS deney sonuçlarına dayanarak hesaplanmıştır. Hesaplama sırasında TAS düzeyleri mikromol (μmol) birimine dönüştürülmüş ve sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edilmiştir.

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. L.}}{\text{TAS, mmol trolox Equiv. L.}} \times 100$$

3.13. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler GraphPad Prism 9 programı ile tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma değerleri ile sunuldu. Normallik varsayımı Shapiro Wilk Testi ile kontrol edildi. Daha sonra One way-ANOVA testinin ardından Tukey post hoc testi yapılarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkların anlamlı olup olmadığı belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p \leq 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

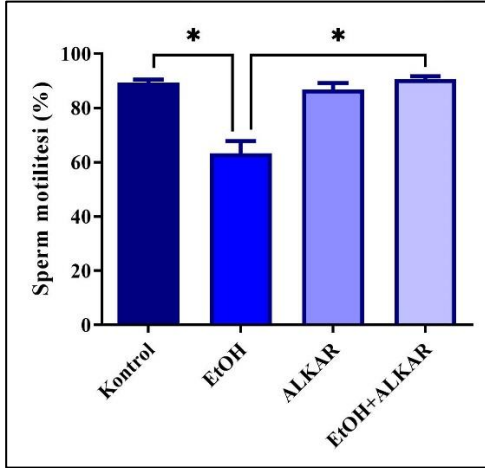
4. BULGULAR

4.1. Testis Ağırlık İndeksinin Değerlendirilmesi

Deney hayvanlarının sakrifiye edilmesinden sonra çıkarılan testis dokuları ile testis ağırlık indeksi hesaplanmıştır. Testis ağırlıklarının vücut ağırlığına oranı (TAİ) değerlendirildiğinde kontrol (0.99 ± 0.04) ile EtOH (0.92 ± 0.03), ALKAR (0.88 ± 0.04) ve EtOH+ALKAR (0.87 ± 0.03) grupları karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 4.1).

4.2. Epididimal Sperm Örneklerinin Toplanması ve Sperm Motilite Değerlendirmeleri

Deney gruplarına ait epididimal sperm motilite değerlendirmelerinde kontrol grubuna göre, EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş kaydedilirken EtOH ve ALKAR'ın birlikte uygulandığı grupta kontrol ile benzer motilite yüzdeleri olduğu görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 4.4).



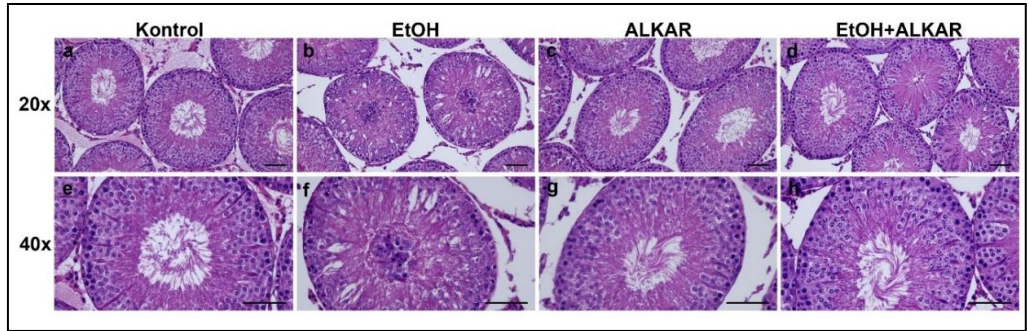
Şekil 4.1. Kontrol ile deney gruplarına ait epididimal sperm motilitesi grafik halinde sunulmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak grafik edilmiştir. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. * $p<0.001$.

4.3. Histopatolojik Analizler

Deney gruplarına ait hayvanlardan alınan testis dokularının ayrıntılı histopatolojik değerlendirmesi amacı ile H&E ve PAS boyamaları yapılmıştır.

4.3.1. Hematoksilen Eozin Boyanması ile Testis Kesitlerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Testis kesitlerinde ışık mikroskobu ile yapılan histopatolojik değerlendirmelerde, kontrol grubu ile benzer bir şekilde ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarında testisin dış yüzeyini saran tunika albuginea ve seminifer tübül duvarında bulunan spermatogenik seri hücreleri organizasyonunda bütünlük gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bu bağlamda, seminifer tübül epitelinin bazal membranından tübül lümenine doğru olan spermatogenik hücre diziliminde sırasıyla spermatogonyum, spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzayan spermatid hücrelerinin yer aldığı ve spermlerin tübül lümeninde bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.2a,e,c,g,d,h). Ayrıca, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinin doğru konumlarda bulunduğu tespit edilmiştir. EtOH maruziyetine bırakılan sıçanların seminifer tübül yapıları incelendiğinde ise seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür germ hücreleri ve intertübüler alanlarda vakuolizasyonların varlığı dikkat çekmiştir (Şekil 4.2b,f).



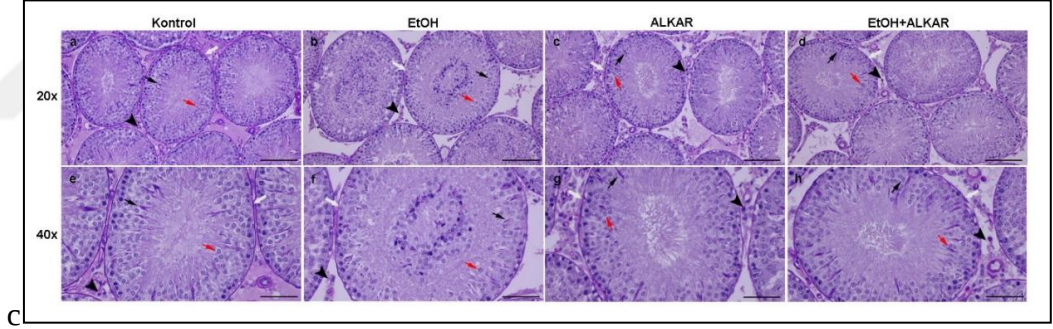
Şekil 4.2. Deney grupları ile kontrol gruplarına ait testis dokularındaki H&E boyanmaları. Skala bar 50 µM'yi göstermektedir. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.

4.3.2. PAS Boyaması

PAS boyaması, dokulardaki polisakkaritleri belirlemek için kullanılan histolojik bir boyama yöntemidir. Periyodik asit ve şekerlerin komşu diolleri arasında oluşan bir çift aldehit Schiff solüsyonu ile tepkimeye girerek mor-magenta bir renk ortaya çıkarır. PAS boyası, hematoksilen ile boyandığında glikoproteinler ve dolayısıyla akrozom yapıları mor renkte boya alırken, nükleuslar mavi renkte boyanır. PAS ile boyalı preparatların ışık mikroskobu altında incelenmesi

sonucu, tüm gruplarda seminifer tübüller değerlendirilerek, Leydig hücreleri, seminifer tübül bazal membranı ve akrozom yapısı net bir şekilde izlenmiştir. PAS boyanmalarına ait görüntüler Şekil 4.3'te verilmiştir.

Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde, düzgün bir seminifer tübül bazal membranı, Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri, spermatogonyumlar ve spermatogenik seri hücreleri ve akrozom yapısı net bir şekilde izlenmiştir (Şekil 4.3a,e). EtOH grubunda ise, H&E boyanmasındaki gözlemlere benzer olarak bozulmuş spermatogenik seri ve vakuolizasyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.3b,f). EtOH uygulamasının olumsuz etkilerine karşı ALKAR'ın nasıl bir etki gösterdiğini ortaya koymak amacıyla oluşturulan EtOH+ALKAR gruplarında, kontrol grubuna çok benzeyen, düzgün seminifer tübül duvarı, spermatogenik seri ve Sertoli hücreleri görülmüştür (Şekil 4.3c,g,d,h).



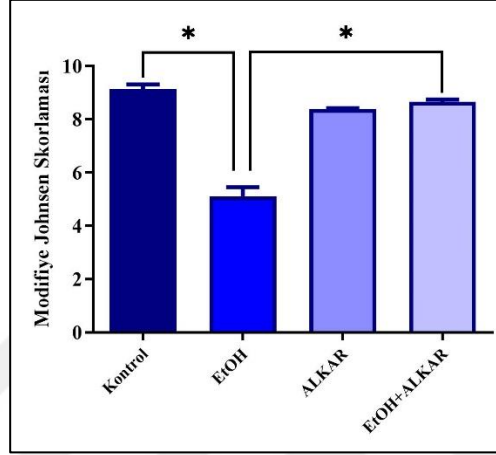
Şekil 4.3. Deney grupları ile kontrol gruplarına ait testis dokularındaki PAS boyanmaları. Skala bar 50 µM'yi göstermektedir. Beyaz oklar bazal membranı, kırmızı oklar akrozom yapısını, siyah oklar uzayan spermatidleri, ok başları ise Leydig hücrelerini işaret etmektedir.

4.3.3. Testis Kesitlerinde Modifiye Johnsen Skorlamasının Değerlendirilmesi

H&E ile boyanan testis kesitlerinde ışık mikroskobu altında seminifer tübüllerin yapısının ve spermatogenezin değerlendirilmesi için Johnsen skorlaması yapılmıştır. Modifiye Johnsen skorlamasında kesitler iki farklı gözlemci arasındaki uyum ICC (intraclass correlation coefficient) testi ile değerlendirilmiş olup farklı gözlemci arasında yüksek bir uyum olduğu görülmüştür ($ICC > 0,80$).

Deney grupları kontrol grubuna ($9,230 \pm 0,1270$) göre kıyaslandığında; Johnsen skoru açısından EtOH grubunda ($5,050 \pm 0,1559$) istatistiksel olarak önemli bir

azalış gözlenmiştir ($p<0,001$). ALKAR ($8,383 \pm 0,064$) ($p=0,15$) ve EtOH+ALKAR ($8,663 \pm 0,177$) ($p=0,39$) gruplarında kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte EtOH+ALKAR grubunda EtOH grubuna göre önemli derecede artış görülmüştür ($p<0,0001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait Johnsen skor değerlendirmeleri. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak grafik edilmiştir. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. * $p<0.001$.

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Testise ait parafin kesitlerde ER stresi belirteçlerinden GRP78, CHOP ve XBP1, steroidogenez belirteçlerinden StAR, p450scc, 3β -HSD, 17β -HSD3, LHR ve apoptoz belirteci olarak aktif kaspaz-3 proteinleri için immünohistokimyasal boyamalar ile ekspresyon paternleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Şekil 4.5, 4.7, 4.9, 4.11, 4.13, 4.15, 4.17, 4.19, 4.21 sırasıyla).

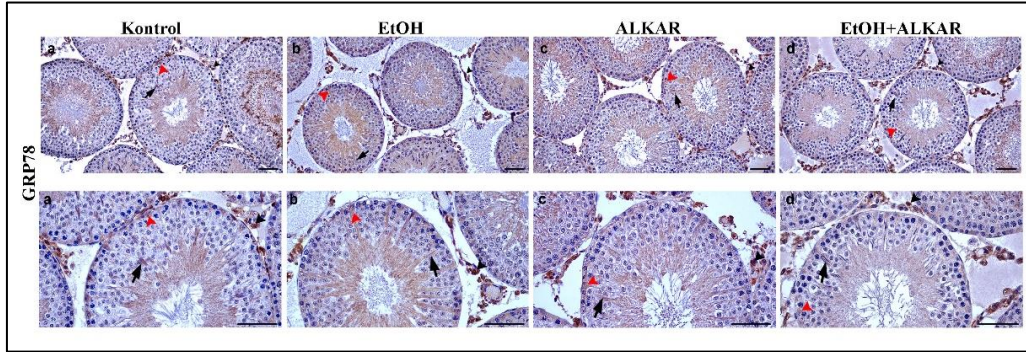
4.4.1. ERS Belirteçlerinin İmmünohistokimya Bulguları

ER stresi koşullarında aktifleşerek ER stresini başlatan **GRP78** proteinini immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde tüm deney gruplarına ait kesitlerde Sertoli hücrelerinde, uzayan spermatidlerde ve interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde nüklear boyanma paterni göstermiştir (Şekil 4.5). Deney gruplarındaki GRP78 protein ekspresyonunun ImageJ versiyon 1.46 (NIH) programı ile yapılan threshold analizleri sonucuna göre, GRP78 ekspresyonunun EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğu izlenmiştir

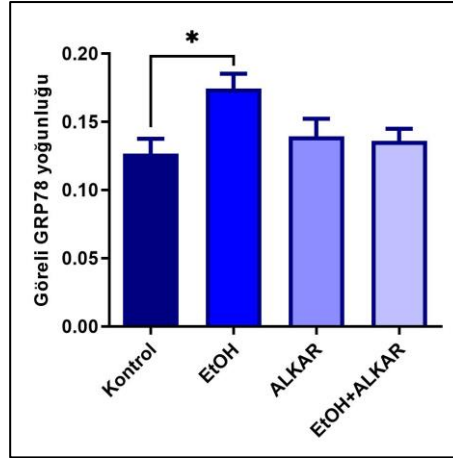
($p<0.05$). Bununla birlikte diğer deney grupları kontrol grubu ile benzer düzeyde bir ekspresyon göstermiştir (Şekil 4.6).

ER stres yanıtının bir diğer spesifik belirteci olan **CHOP/Gadd153** ekspresyonu Sertoli hücre sitoplazmalarında, seminifer tübül lümeninde bulunan sitoplazmik dropletlerde, uzayan spermatidlerde ve interstisyel alandaki Leydig hücre nükleuslarında eksprese olduğu dikkat çekmiştir (Şekil 4.7). ImageJ programı ile yapılan threshold analizlerinde kontrol grubu ile deney grupları kıyaslandığında belirgin bir farklılık gözlenmezken, dikkat çekici bir şekilde EtOH uygulaması ile birlikte ALKAR uygulamasının, EtOH grubunda artan CHOP ekspresyonunu önemli bir düzeyde azalttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.8).

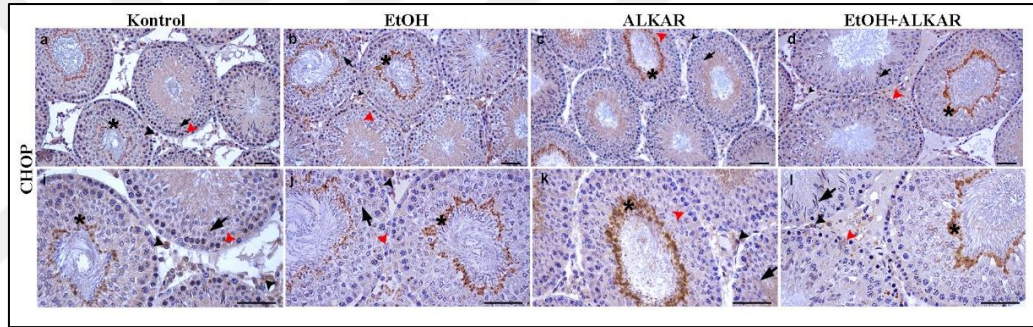
ER stres koşulları altında aktifleşen **XPB1** proteininin Sertoli hücrelerinde, uzayan spermatidlerde ve Leydig hücrelerinde sitoplazmik bir ekspresyon paterni gösterdiği izlenmiştir (Şekil 4.9). XPB1 antikoru ile boyanan testis kesitlerinde, ImageJ programı ile threshold analizleri yapılmıştır. Ancak analiz sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.10).



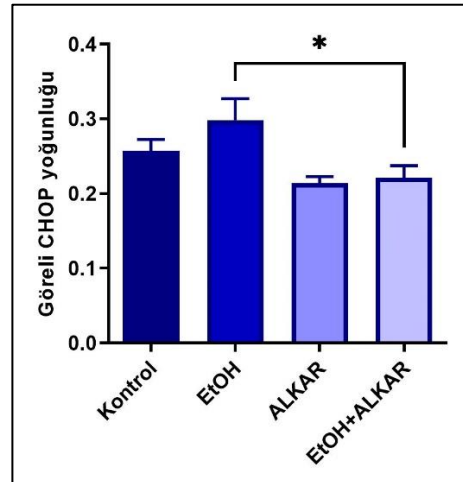
Şekil 4.5. Sertoli hücrelerinde (kırmızı ok başı), interstisyel Leydig hücreleri (siyah ok başı) ve uzayan spermatidlerde (siyah ok) gözlenen GRP78 proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



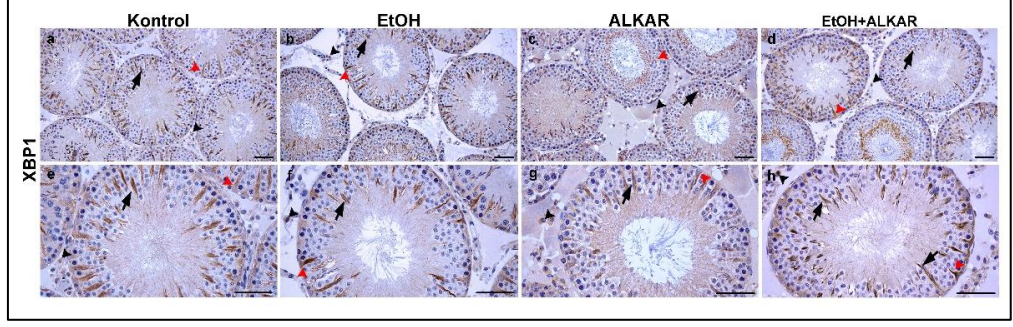
Şekil 4.6. GRP78 proteininin ekspresyon düzeyinin ImageJ programı kullanılarak yapılan threshold analizi. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *: $p < 0.05$.



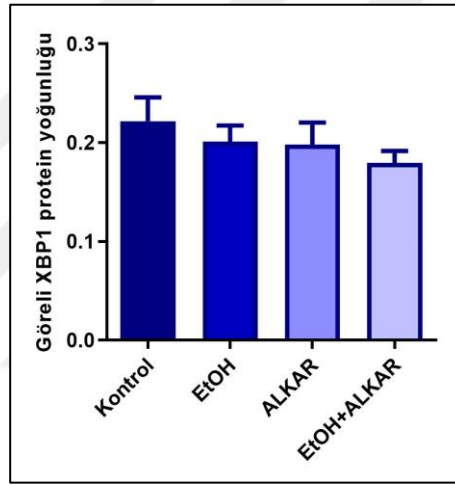
Şekil 4.7. Sertoli hücrelerinde (kırmızı ok başı), interstisyel Leydig hücreleri (siyah ok başı), uzayan spermatidlerde (siyah ok) ve sitoplazmik dropletlerde (*) gözlenen CHOP proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



Şekil 4.8. CHOP proteininin ekspresyon düzeyinin ImageJ programı kullanılarak yapılan threshold analizi. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *: $p < 0.05$.



Şekil 4.9. Sertoli hücrelerinde (kırmızı ok başı), interstisyel Leydig hücreleri (siyah ok başı) ve uzayan spermatidlerde (siyah ok) gözlenen XBP1 proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



Şekil 4.10. XBP1 proteini ekspresyon düzeyinin ImageJ programı kullanılarak yapılan threshold analizi. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup *: $p<0.05$.

4.4.2. Steroidogenez ve Apoptoz Belirteçlerinin İmmünohistokimya Bulguları

Steroidogenez belirteçlerinden biri olan **StAR** proteininin testiste seminifer tübül içerisindeki uzayan spermatidlerde ve interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde eksprese olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11). Deney gruplarındaki Leydig hücrelerindeki StAR protein ekspresyonunda kontrol grubuna göre, EtOH ($p<0.01$), ALKAR ($p<0.05$) ve EtOH+ALKAR ($p<0.001$) gruplarında önemli derecede azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.12).

Bir diğer steroidogenez belirteci olan **sitokrom p450_{scc}** proteininin testiste seminifer tübül epitelinde uzayan spermatidlerde ve interstisyel alanda Leydig hücrelerinde sitoplazmik ekspresyon göstermiştir (Şekil 4.13). Leydig

hücrelerindeki p450scc protein ekspresyonları açısından deney grupları karşılaştırıldığında, EtOH grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu izlenmiştir ($p<0.001$). EtOH+ALKAR grubu EtOH grubu ile karşılaştırıldığı durumda ise istatistiksel açıdan anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.14).

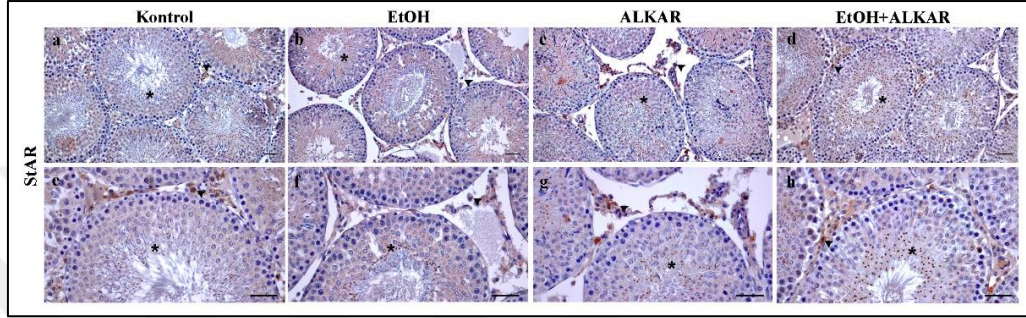
3 β -HSD proteininin testiste özellikle interstisyel alanda lokalize olan Leydig hücrelerinde sitoplazmik ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 4.15). Leydig hücrelerindeki 3 β -HSD protein ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.0001$). Bununla birlikte EtOH grubu EtOH+ALKAR grubu ile karşılaştırıldığında, 3 β -HSD ekspresyonunun anlamlı derecede artarak kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür ($p<0.0001$) (Şekil 4.16).

17 β -HSD3 proteininin immüno lokalizasyonu değerlendirildiğinde, seminifer tübül içerisinde bulunan primer spermatositlerde, yuvarlak spermatidlerde ve interstisyel alandaki Leydig hücrelerinde sitoplazmik bir ekspresyon paterni sergilediği görülmüştür (Şekil 4.17). Kontrol grubunda Leydig hücrelerindeki 17 β -HSD3 protein ekspresyonu deney grupları ile karşılaştırıldığında, EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu izlenmiştir ($p<0.05$). EtOH+ALKAR grubu EtOH grubu ile karşılaştırıldığında ise daha yüksek bir ekspresyon olduğu kaydedilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.18).

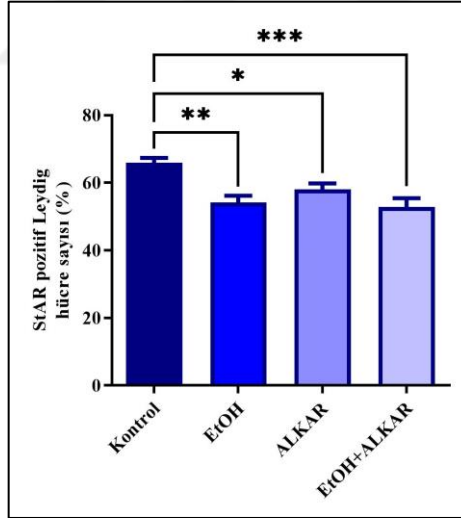
Steroidogenez belirteçlerinden **LHR** proteini, interstisyel alanda lokalize olan Leydig hücrelerinde sitoplazmik ekspresyon göstermiştir (Şekil 4.19). Deney gruplarındaki LHR protein ekspresyonu kontrol grubu karşılaştırıldığında, ekspresyonun EtOH ($p<0.0001$) ve EtOH+ALKAR ($p<0.0001$) gruplarında önemli bir şekilde azaldığı izlenmiştir. EtOH+ALKAR grubu EtOH ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak daha yüksek bir ekspresyon görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 4.20).

Apoptotik hücre belirteci olarak **aktif kaspaz-3** proteini immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde ise yuvarlak spermatidler ve spermelerde eksprese

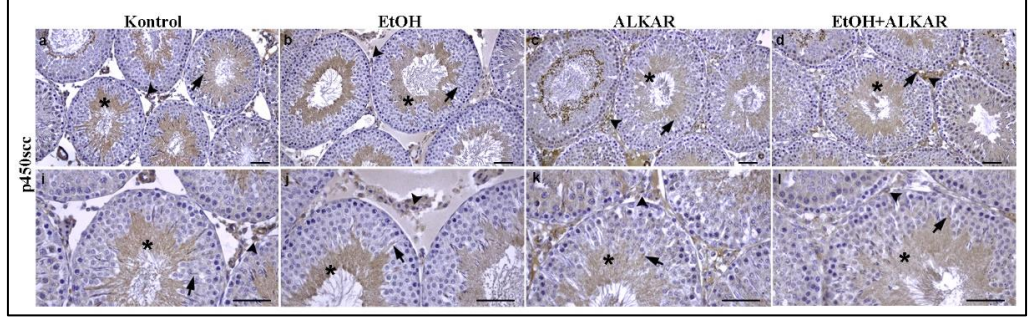
olduğu görülmüştür (Şekil 4.21). Aktif kaspaz-3 antikoru ile boyanan her kesitte 200 adet tübül sayılarak yapılan seminifer tübül analizine göre ALKAR ($p<0.05$), EtOH ($p<0.001$) ve EtOH+ALKAR ($p<0.001$) grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında boyanan seminifer tübül yüzdeleri istatistiksel olarak daha düşük olarak izlenmiştir (Şekil 4.22).



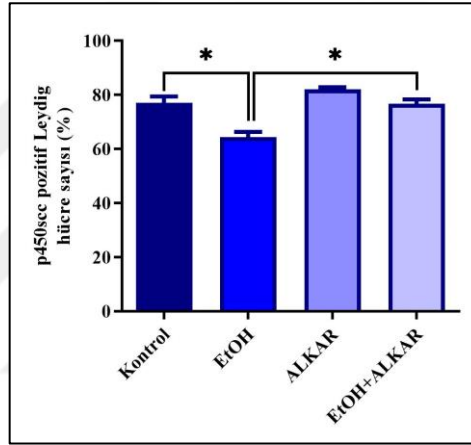
Şekil 4.11. İnterstisyel Leydig hücreleri (siyah ok başı) ve sitoplazmik dropletlerde (*) gözlenen StAR proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



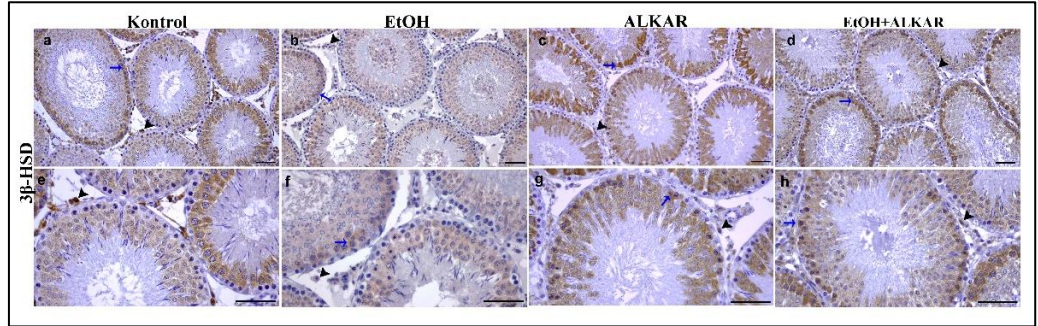
Şekil 4.12. StAR pozitif Leydig hücre sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *: $p<0.01$; **: $p<0.05$; ***: $p<0.001$.



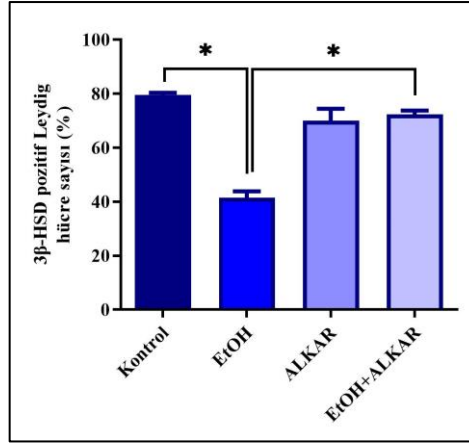
Şekil 4.13. İnterstisyel Leydig hücreleri (siyah ok başı) ve uzayan spermatidlerde (siyah ok) ve sitoplazmik dropletlerde (*) gözlenen p450scc proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



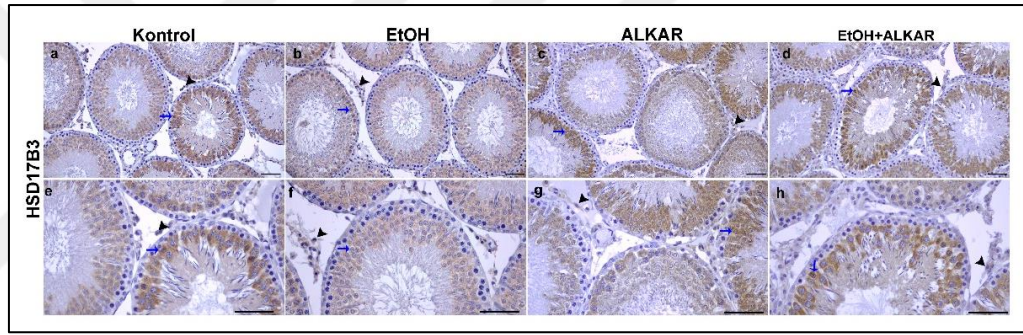
Şekil 4.14. p450scc pozitif Leydig hücre sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *: $p < 0.001$.



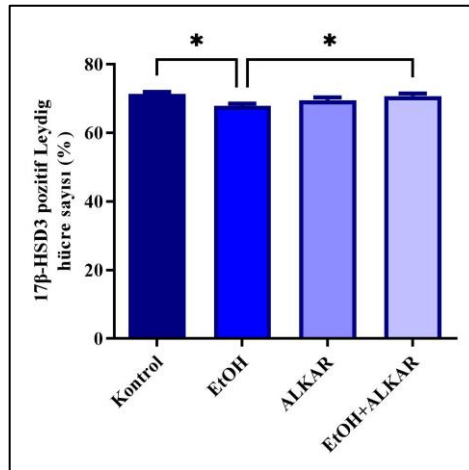
Şekil 4.15. İnterstisyel Leydig hücreleri (siyah ok başı) ve primer spermatidlerde (mavi ok) gözlenen 3β-HSD proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



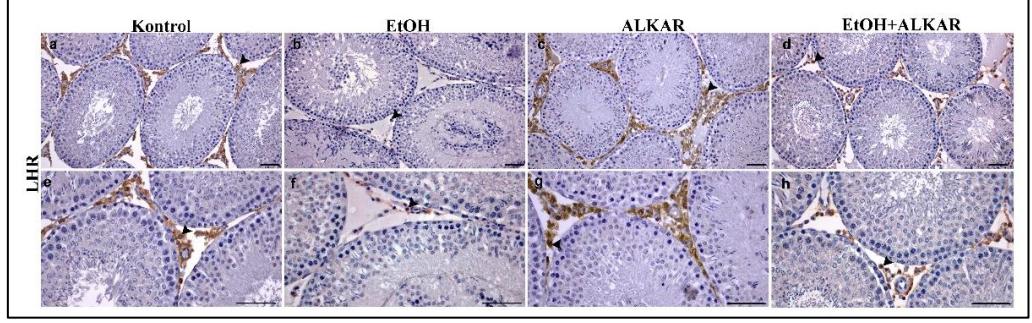
Şekil 4.16. 3β-HSD pozitif Leydig hücre sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *: $p < 0.001$.



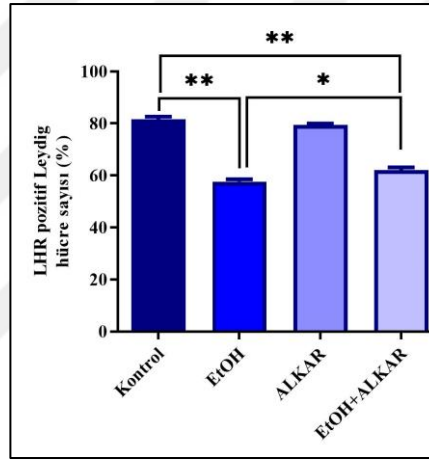
Şekil 4. 17. İnterstitial Leydig hücreleri (siyah ok başı) ve primer spermatidlerde (mavi ok) gözlenen 17β-HSD3 proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



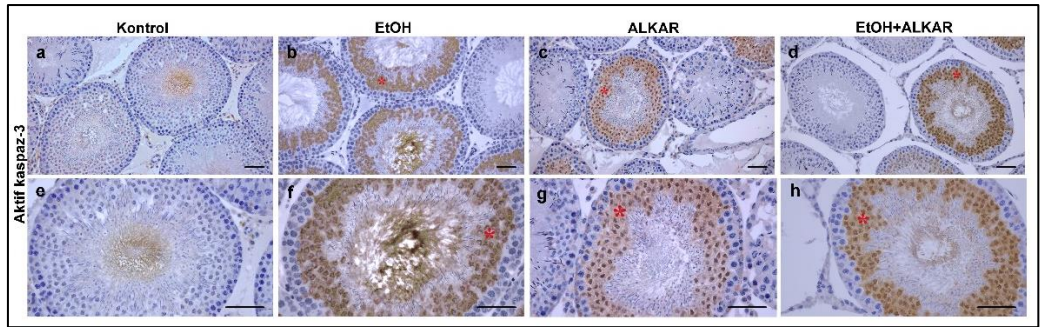
Şekil 4.18. 17β-HSD3 proteininin ekspresyon düzeyinin ImageJ programı kullanılarak yapılan threshold analizi. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *: $p < 0.05$.



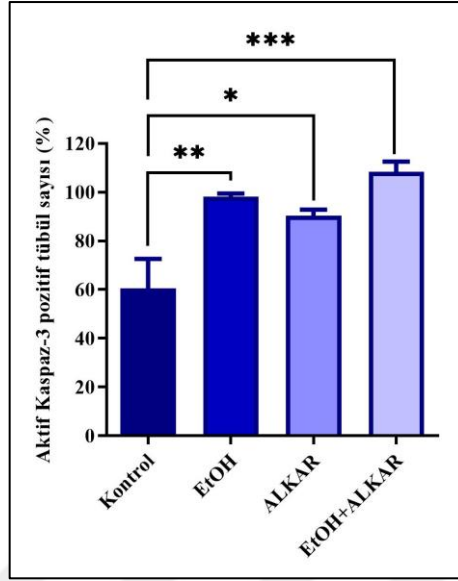
Şekil 4.19. İnteristiyel Leydig hücrelerinde (siyah ok başı) görülen LHR proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



Şekil 4.20. LHR proteininin ekspresyon düzeyinin ImageJ programı kullanılarak yapılan threshold analizi. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *: $p < 0.001$; **: $p < 0.0001$



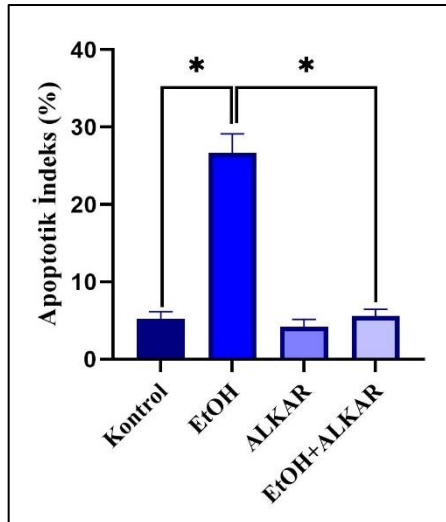
Şekil 4.21. Yuvarlak spermatositlerde (kırmızı *) görülen aktif kaspaz-3 proteinine ait immünohistokimyasal boyanmalar sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup.



Şekil 4.22. Aktif kaspaz-3 pozitif tübül sayısının (%) kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *: $p<0.05$; ***: $p<0.001$.

4.5. TUNEL

Apoptoz sırasında oluşan çift zincirli DNA kırıklarını tespit etmek için yapılan TUNEL analizlerinde EtOH grubunda kontrol grubuna kıyasla apoptotik hücre indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenirken ($p<0.05$), bu artış ALKAR uygulaması ile anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Deney grupları ile kontrol gruplarına ait testis dokularındaki TUNEL analizlerine ait bulgular sunulmuştur. Veriler ortalama SEM olarak grafik edilmiştir. *: $p<0.001$.

4.6. Western Blot Analizleri

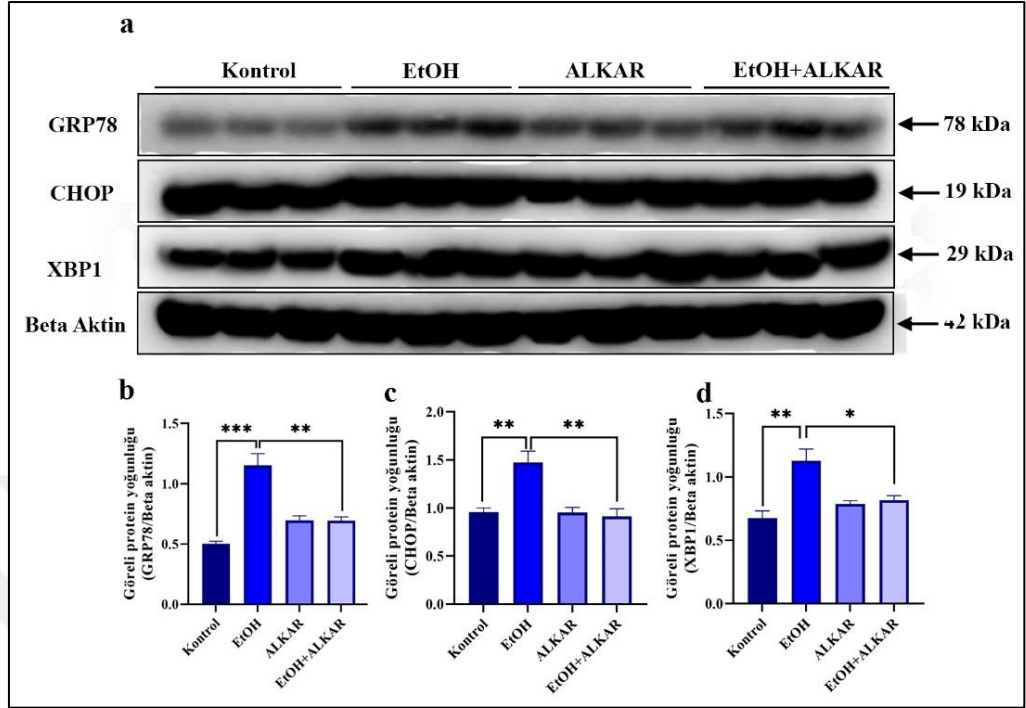
Kontrol ve deney gruplarına ait dokular ile hazırlanan testis doku lizatlarında GRP78, CHOP, XBP1, StAR, p450scc, 3 β -HSD, 17 β -HSD3, LHR ve aktif kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonları Western Blot yöntemi ile değerlendirilerek elde edilen sonuçlar semikantitatif olarak analiz edilmiştir. Bulgular, β -aktin ile normalize edilmiş ve protein seviyeleri ImageJ programı ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.24 ve 4.25).

4.6.1. ERS Belirteçlerinin Western Blot Analizleri

GRP78 ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.24). EtOH+ALKAR ($p<0.0001$) grubunda ise EtOH grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.24a, b).

Deney gruplarındaki **CHOP** proteininin ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, EtOH grubunda ekspresyon seviyesinin arttığı görülmüştür ($p<0.05$). ALKAR ve EtOH+ALKAR grupları ise kontrole benzer değerler gösterirken, EtOH grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak daha düşük bir ekspresyon izlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.24a, c).

XBP1 protein ekspresyonları açısından, kontrol grubuna kıyasla EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenirken ($p<0.0001$), EtOH grubuna kıyasla EtOH+ALKAR grubunda XBP1 ekspresyonu açısından anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.24a, d).



Şekil 4.24. Kontrol ve deney gruplarındaki GRP78, CHOP ve XBP1 proteinine ait western blot bantları (a) ve beta aktin ile normalize edilmiş veriler grafik şeklinde (b) sunulmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak grafik edilmiştir. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitin birlikte uygulandığı grup. *, $p<0.05$, **, $p<0.001$, ***, $p<0.0001$.

4.6.2. Steroidogenez ve Apoptoz Belirteçlerinin Western Blot Analizleri

Deney gruplarındaki **StAR** protein ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece EtOH+ALKAR grubunda anlamlı bir azalma olduğu izlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.25a, b).

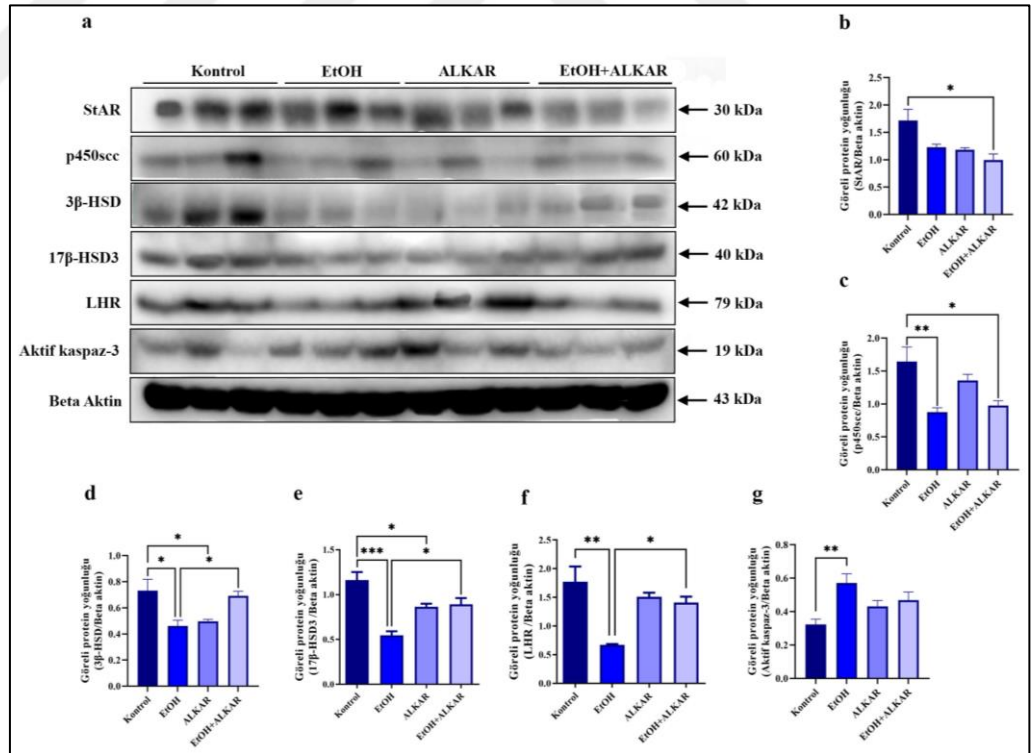
p450scc ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, EtOH ($p<0.001$) ve EtOH+ALKAR ($p<0.05$) grubunda kontrol grubundaki p450scc proteinine göre önemli seviyede bir azalış görülmüştür (Şekil 4.25a, c).

3 β -HSD protein ekspresyonları kontrol ve deney grupları arasında değerlendirildiğinde EtOH grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bununla birlikte EtOH+ALKAR grubunda EtOH grubuna göre önemli bir yükselme olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.25a, d).

Western blot analizlerinde **17 β -HSD3** protein ekspresyonları EtOH ($p<0.0001$) ve ALKAR ($p<0.05$) gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha düşük olarak izlenirken, EtOH+ALKAR grubunda EtOH grubundaki azalmış ekspresyon seviyesi anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.25a, e).

LHR protein ekspresyon seviyelerinde EtOH grubunda kontrol grubuna nispeten anlamlı bir şekilde düşüş gözlenirken ($p<0.01$), EtOH+ALKAR grubu EtOH grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış izlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.25a, f).

Kontrol ve deney gruplarındaki **aktif kaspaz-3** protein ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.25a, g).

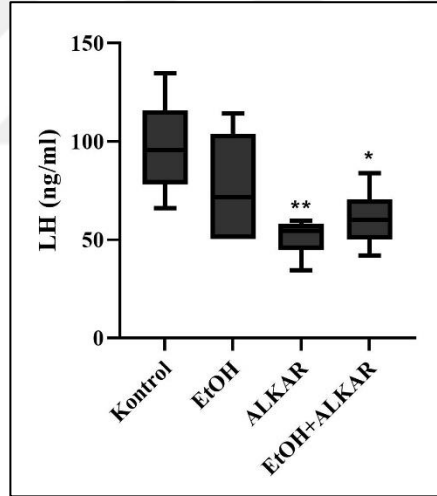


Şekil 4.25. Kontrol ve deney gruplarındaki StAR, p450scc, 3 β -HSD, 17 β -HSD3, LHR ve aktif kaspaz-3 proteinlerine ait western blot bantları (a) ve beta aktin ile normalize edilmiş veriler grafik şeklinde (b) sunulmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak grafik edilmiştir. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitin birlikte uygulandığı grup. *, $p<0.05$, **, $p<0.001$, ***, $p<0.0001$.

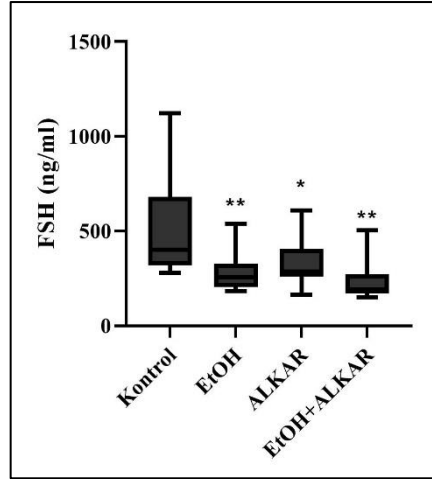
4.7.1. Serum LH ve FSH Düzeylerinin ELİSA Yöntemi ile Belirlenmesi

Kontrol ve deney gruplarına ait serum örneklerinden LH için elde edilen konsantrasyon değerleri karşılaştırıldığında, ALKAR ($p<0.001$) ve EtOH+ALKAR ($p<0.05$) gruplarının konsantrasyon değerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş izlenmiştir (Şekil 4.26).

Kontrol ve deney gruplarına ait serum örneklerinden FSH için elde edilen konsantrasyon değerleri karşılaştırıldığında, EtOH ($p<0.01$), ALKAR ($p<0.05$) ve EtOH+ALKAR ($p<0.01$) gruplarındaki konsantrasyon değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.27).



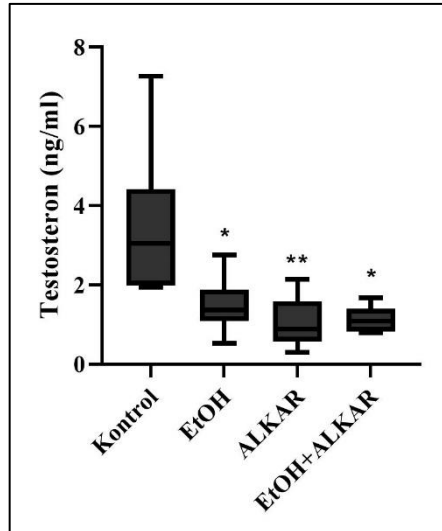
Şekil 4.26. Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait LH değerleri sunulmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak grafik edilmiştir. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitin birlikte uygulandığı grup. *, $p<0.05$, **, $p<0.001$.



Şekil 4.27. Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait FSH değerleri sunulmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak grafik edilmiştir. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *, $p<0.05$, **, $p<0.01$.

4.7.2. Serum Testosteron Düzeyinin ELİSA Yöntemi ile Belirlenmesi

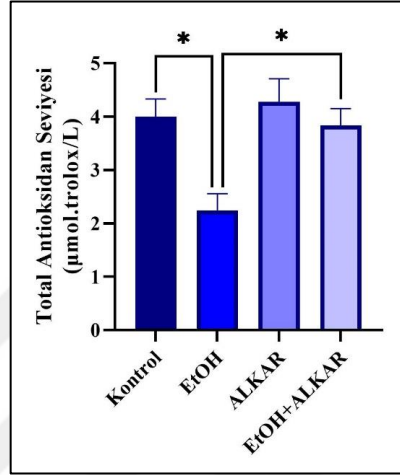
Kontrol ve deney gruplarına ait serum örneklerinden testosteron için elde edilen konsantrasyon değerleri karşılaştırıldığında, EtOH ($p<0.05$), ALKAR ($p<0.001$) ve EtOH+ALKAR ($p<0.05$) gruplarının konsantrasyon değerlerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait testosteron değerleri sunulmuştur. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak grafik edilmiştir. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *, $p<0.05$, **, $p<0.001$.

4.8. Total Antioksidan Seviyenin (TAS) Değerlendirilmesi

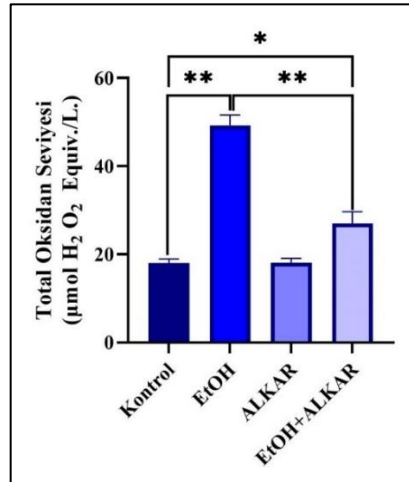
TAS düzeyleri, EtOH ($p<0.05$) grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak azalmıştır ($p<0.05$). EtOH+ALKAR grubunda ise EtOH grubuna kıyasla anlamlı derecede artış izlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait total antioksidan değerleri sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *; $p<0.05$.

4.9. Total Oksidan Seviyenin (TOS) Değerlendirilmesi

TOS düzeyleri açısından kontrol ve ALKAR grupları birbirine benzer olarak bulunurken, kontrol grubuna kıyasla EtOH ($p<0.0001$) ve EtOH+ALKAR ($p<0.05$) gruplarında belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. EtOH+ALKAR grubunda ise EtOH grubuna göre anlamlı seviyede azalma tespit edilmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.30).

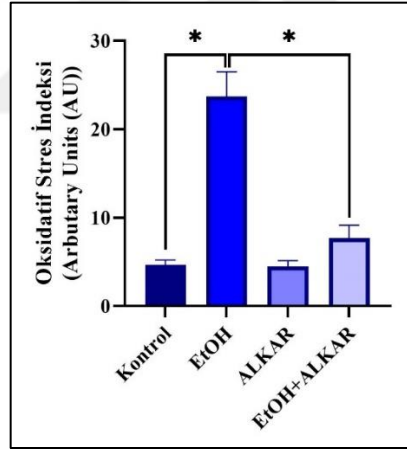


Şekil 4.30. Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına ait total oksidan değerleri sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *, $p<0.05$, **, $p<0.0001$.

4.10. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)'nin Belirlenmesi

OSİ değerlendirilmesi, TOS ve TAS deney sonuçları kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.31). Hesaplama sonucunda, birden küçük OSİ değerleri, antioksidan sistemlerin hücrelerde serbest radikalleri etkili bir şekilde kontrol ettiğini, birden büyük OSİ değerleri ise hücrelerin oksidatif stres yaşadığını göstermektedir.

Kontrol grubuna kıyasla EtOH grubunda OSİ değeri istatistiksel olarak daha yüksek bulunurken ($p<0.001$), ALKAR ve EtOH+ALKAR değerleri kontrol grubuna benzer düzeyde çıkmıştır. Bununla birlikte, EtOH+ALKAR grubunun OSİ değerinin, EtOH grubuna kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Kontrol, EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarına oksidatif stres indeksi sunulmuştur. EtOH: Etanol; ALKAR: asetil L-karnitin; EtOH+ALKAR: etanol ve asetil L-karnitinin birlikte uygulandığı grup. *, $p<0.0001$.

5. TARTIŞMA

Alkol bağımlılığı günümüzde ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. DSÖ, uzun süreli tüketiminde alkolü hem fizyolojik hem de psikolojik bağımlılığa neden olan maddeler arasında saymaktadır (DSÖ, 2020). Yatıştırıcı bir ajana ve farmakolojik olarak diğer hipnotik ilaçlara benzemesi nedeni ile alkol dünya çapında ciddi sorunlara neden olabilecek bir potansiyele sahiptir. Alkol tüketimi tüm biyolojik sistemleri ve organları etkileyebilmektedir. Kronik alkol tüketimine bağlı gerçekleşen olumsuzluklardan erkek üreme sisteminin en önemli organlarından biri olan testisler de etkilenmektedir. Klinik ve deneysel araştırmalar, alkol tüketiminin erkek fertilitesi için bir risk faktörü olduğunu ve hem testosteron metabolizması hem de spermatogenez üzerinde önemli etkileri olduğunu bildirmiştir (Gabrielsen ve ark., 2016).

Alkolün metabolize edilmesi ile oluşan asetaldehit, oksitlendiğinde serbest süperoksit radikallerinin üretimine neden olur, bu da apoptotik süreçleri, oksidatif stresi, ERS ve steroidogenezi tetiklemektedir. Erkek fertilitesi açısından testiküler steroidogenez oldukça önemli bir süreçtir ve ana ürün olarak ortaya çıkan testosteron, erişkinlerde özellikle spermatogenezin sürdürülmesi için kritik bir role sahiptir. ALKAR'ın çeşitli durumlarda oluşan oksidatif ve apoptotik süreçler üzerinde etkileri olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Aureli ve ark., 1994; Ricciolini ve ark., 1998; Balercia ve ark., 2005; Scafidi ve ark., 2010; Coskun ve ark., 2013; Khaw ve ark., 2020; Er ve ark., 2023). Bu noktadan hareketle çalışmamızda, sıçan modelleri kullanılarak deneysel kronik alkolizm modelinde ALKAR uygulamasının, serum hormon düzeylerine, testiküler apoptoza, ERS ve steroidogenik yolak belirteçleri üzerindeki olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, kronik alkole maruz kalan yetişkin sıçanlarda ALKAR uygulamasının testis histopatolojisine, ERS belirteçlerinden GRP78, CHOP ve XBP1 proteinleri ile steroidogenezin önemli belirteçleri olan StAR, 17 β HSD3, 3 β -HSD, p450scc ve LHR'nin testis dokularındaki ekspresyonlarına, serum FSH, LH ve testosteron hormon düzeylerine olan etkileri ortaya konulmuştur. Bu parametrelere ek olarak,

sıçanlardan elde edilen serumlarda oksidan ve antioksidan kapasite ölçümü gerçekleştirilmiş olup testis dokularında apoptotik belirteçler üzerinde değerlendirmeler yapılmıştır.

Literatürde, kronik olarak alkol tüketen bireylerin %52,3'ünde kısmi veya tam spermatogenik duraksama olduğu, testis hücrelerinde oksidatif stres ve apoptotik süreçlerin tetiklendiği ve testis ağırlığının azaldığı bildirilmiştir (Kuller ve ark., 1978; Pajarinen ve ark., 1994; Maneesh ve ark., 2006; Comporti ve ark., 2010; Jensen ve ark., 2014; Gabrielsen ve ark., 2016; Smith, 2023). Bu kapsamda çalışmamızda deney gruplarına ait hayvanların vücut ağırlıkları ve testis ağırlıkları kaydedilerek TAI hesaplaması yapılmıştır. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu bulgu, literatürde yaygın olarak bildirilen kronik alkol tüketiminin testis ağırlığında azalmaya yol açtığına dair verileri desteklememekle birlikte bu durum araştırma süresi, alkol dozu ve hayvanların genetik yapısı gibi farklılıklara bağlı olabilir.

EtOH maruziyetinin sperm canlılığında ve motilitesinde olumsuz etkileri olduğu literatür tarafından birçok çalışma ile bildirilmiştir (Kucheria ve ark., 1985; Zhu ve ark., 2007; Li Y. ve ark., 2011; Jensen ve ark., 2014). Bununla birlikte idiopatik erkek infertilitesi için karnitin takviyesinin etkinliğini değerlendirmek için yapılan bir sistematik inceleme ve meta-analizde, karnitinlerin (L-karnitin ve ALKAR) toplam sperm hareketliliğini ve sperm morfolojisini önemli ölçüde iyileştirdiği, ancak sperm konsantrasyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Khaw ve ark., 2020). Deney gruplarında yaptığımız sperm motilite değerlendirmeleri, literatüre benzer nitelikte olup kontrol grubuna kıyasla EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşüş bulunmuştur. Bu durumun nedeni EtOH metabolizması sonucu ortaya çıkan ROS birikimi kaynaklı olabilir (Comporti ve ark., 2010; Bisht ve ark., 2017; Bai ve ark., 2020). ALKAR'ın oksidatif strese karşı koruyucu bir antioksidan görevi gördüğü bildirilmiştir (Reuter ve ark., 2012). Bu bilgiyi destekler nitelikte EtOH ile beraber ALKAR uyguladığımız EtOH+ALKAR grubunda EtOH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş görülmüş olup sperm motilite seviyesi

kontrol grubu ile benzer çıkmıştır. Bu durumda sperm motilitesi açısından literatür ile benzer olan bulgularımız hem EtOH'ın olumsuz etkilerini hem de belirtildiği gibi sperm motilitesi açısından ALKAR'ın antioksidan görevi gördüğünü desteklemektedir.

Klinik açıdan erkek üreme sisteminde semen örneğinde sperm yokluğu veya düşük sperm konsantrasyonları, sperm morfolojisi ve motilitesi infertilite için tanımlayıcı kriterlerdendir (Hammer ve ark., 2018). Çevresel kirleticilere ve toksinlere maruz kalma, gamet sayılarının azalmasına ve kalitesiz olmasına neden olarak infertiliteye yol açabilmektedir (Horak ve ark., 2003; Cederbaum, 2012; Finelli ve ark., 2021). Çalışmamızdaki testiküler histopatoloji değerlendirmelerinde, bu bilgileri destekler nitelikte EtOH grubunda seminifer tübüllerin bazal membran bütünlüğünde düzensizlik, seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür germ hücreleri ve intertübüler alanlarda vakuolizasyonların varlığı dikkat çekmiştir. Literatürde iki, dört ve sekiz haftalık alkol maruziyeti sonrası testiküler histopatoloji değerlendirildiğinde 2. haftadan itibaren seminifer tübül organizasyonunda bozulmaların başladığı ve tübül içerisinde vakuolizasyonların görüldüğü bildirilmiştir (Smith, 2023). Bu bağlamda çalışmalar, alkol tüketimini erkek fertilitesi için bir risk olarak incelemiş ve testis mimarisinde, sperm sayısı, morfolojisi ve motilitesinde değişikliklere ve semen kalitesinde düşüşe neden olduğunu ortaya koymuştur ve bulgularımızı desteklemektedir (Kucheria ve ark., 1985; Pajarinen ve ark., 1994; Muthusami ve ark., 2005; Sengupta ve ark., 2017; Ricci ve ark., 2018; Sansone ve ark., 2018; Eid ve ark., 2019; Smith, 2023). ALKAR grubuna ait kesitler değerlendirildiğinde ise EtOH grubunun aksine kontrol grubu ile çok benzer seminifer tübül organizasyonu, düzenli spermatogenik seri hücreleri ve normal testis içi hücresel mimari görülmüştür. EtOH uygulamasının olumsuz etkisine karşılık ALKAR'ın nasıl etki göstereceğini araştırdığımız EtOH+ALKAR grubunda ise kontrol grubuna benzer şekilde düzgün seminifer tübül ve bütünlüğünü koruyan bazal membran organizasyonu, spermatogenik seri hücrelerinin bulunduğu tübüller görülmüştür. EtOH ve ALKAR'ın birlikte uygulandığı bu gruptaki kontrol grubuna benzerlik, ALKAR'ın antiinflamatuvar

etkileri olduğunu (Aureli ve ark., 1994), membranların stabilizasyonuna yol açtığını (Jones ve ark., 2010) ve oksidatif strese karşı koruyucu bir antioksidan görevi gördüğünü (Reuter ve ark., 2012) ifade eden literatür bulgularını desteklemiştir. Testis kesitlerinde yapılan modifiye Johnsen skorlamasına ait bulgular, EtOH grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ki bu bulgular da histopatolojik değerlendirme sonuçlarını destekler niteliktedir.

EtOH kullanımının neden olduğu patolojik değişiklikler organa, bölgeye ve yaşa göre değişiklik göstermektedir. Oksidatif stres ve ERS'nin EtOH kaynaklı çoklu organ hasarına neden olduğu ileri sürülmektedir (Comporti ve ark., 2010). Yanlış katlanma ya da hiç katlanmama sonucu protein birikimi gözlenmesi ERS olarak bilinmektedir (Hosoi ve ark., 2012). ER kapasitesi fizyolojik ya da patolojik durumlarla aşıldığında protein katlanması kontrol mekanizması bozulur. Çevresel etkileşimler veya aerobik hücresel metabolizmaya özgü ROS üretimindeki kalıtsal dengesizlikler nedeniyle sistemik veya lokal olarak ortaya çıkan oksidatif stres, ERS ve erkek infertilitesiyle yakından ilişkilidir (Fujii ve ark., 2014; Bisht ve ark., 2017; Hosseini ve ark., 2020; Karna ve ark., 2020). Varikosel, diyabet, yaşlanma, enflamasyon veya yaşam tarzı faktörleri sonucu oluşan testis fonksiyon bozukluğuna genellikle katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi eşlik eder, bu da ER fonksiyonunun bozulduğunu gösterir (Bisht ve ark., 2017). Varikoselden etkilenen testislerde, artmış ROS, hatalı ya da katlanmamış proteinlerin ve ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) birikimi, ERS ve UPR aktivasyonuna ek olarak oksidatif stres, ERS ve mitokondri kaynaklı apoptozun varlığı bilinmektedir (Fujii ve ark., 2014; Soni ve ark., 2018; Karna ve ark., 2020; Razi ve ark., 2021). Özellikle, ERS belirteçlerinin, GRP78, IRE1 α 'nın fosforile formları (p-IRE1 α) ve JNK (p-JNK) gibi belirteçlerin yanı sıra apoptotik faktörlerden kaspaz-3 ve Bax/Bcl2 oranının arttığı bildirilmiştir (Hosseini ve ark., 2020). Gerek hayvan gerekse insan varikosel modellerinde testisteki ERS varlığı ve erken ERS şaperonu GRP78'in artan aktivasyonu olduğu bilinmektedir (Karna ve ark., 2020). İnsan ve hayvan modellerinde obezite ve üreme ilişkisi ile ilgili çalışmalarda doymuş

serbest yağ asitleri aracılığıyla Leydig hücrelerinde fonksiyonel bozulmalar ve sağkalımın azaldığı bildirilmiştir (Kuhn-Velten ve ark., 1986). Ayrıca, doymuş serbest yağ asitlerinin GRP78 ifadesini artırdığı, ER membran sensörü PERK'i aktive ettiği ve ER aracılı apoptotik sinyal güçlendiricisi CHOP proteininin ekspresyonunu artırdığı gözlemlenmiştir (Esmaeili ve ark., 2015; Chen ve ark., 2019). Yüksek yağlı diyetin BIP ve CHOP ifadesini artırması dışında diğer ERS sensörlerinden, ATF6 ve XBP-1'i de aktive ettiği gösterilmiştir (Ghosh ve ark., 2015). Bu aktivasyonun zararları, çeşitli antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser bileşiklerden olan melatonin, resveratrol ya da sulforafan gibi antioksidan takviyesi ile hafifletilebilmiştir (Faid ve ark., 2015; Mu ve ark., 2019; Kizilay ve ark., 2021). Son zamanlarda oldukça popüler bir antioksidan bileşik olan ALKAR'ın rat testisinde kemoterapi gibi normal hücrelere zarar veren cisplatinden önce uygulanması kemoterapinin neden olduğu mitokondriyal ve nükleer hasara karşı testisi ve hücreleri koruduğu bildirilmiştir (Coskun ve ark., 2013). Antioksidan takviyesi kullanıldığında gebelik oranlarında genel bir iyileşme olduğu ve bunun da ALKAR'ın erkek fertilesine yönelik sperm sayısı, sperm konsantrasyonu ve hareketlilik artışına katkıda bulunmasıyla potansiyel faydalarını gösterdiği belirtilmiştir (Szymanski ve ark., 2022; Yaris ve ark., 2022). Kronik alkol tüketimi sonucu midede oluşan ERS'yi ALKAR uygulamasının baskılayabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Er ve ark., 2023). Çalışmamızda testiste ERS yolağının belirteçlerinden GRP78, CHOP ve XBP1 proteinlerinin ekspresyonları immünohistokimya ve western blot yöntemleriyle incelenmiştir. İmmünohistokimya ve western blot sonuçları değerlendirildiğinde, EtOH grubundaki GRP78 ekspresyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir. Western blot bulgularımızda ALKAR uygulaması ile GRP78 ekspresyonundaki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte immünohistokimya değerlendirmelerinde bu artış anlamlı bir şekilde izlenmese de fark edilebilecek düzeyde bulunmuştur. Bu durum western blot yönteminin temelini total protein konsantrasyonuna dayanması ile ilgili olabilir. Testis kesitlerindeki CHOP ekspresyonu değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla deney grupları

arasında anlamlı bir fark görülmezken, EtOH grubu ile EtOH+ALKAR grubu karşılaştırıldığında ALKAR'ın bir antioksidan görevi üstlenerek EtOH'ın arttırdığı CHOP ekspresyonunu önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. ALKAR'ın ERS belirteçleri üzerindeki olumlu etkisi özellikle CHOP protein ekspresyonu açısından dikkat çekmiştir. XBP1 protein ekspresyonu diğer ERS belirteçlerinde olduğu gibi EtOH grubunda anlamlı bir artış göstermiş ve EtOH+ALKAR grubunda bu artış kontrole benzer görülmüştür. XBP1 için bu değişiklikler immünohistokimya değerlendirmelerinde net bir şekilde izlenememiştir. ERS belirteçleri kontrol, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarında birbirine yakın değerler gösterirken GRP78, CHOP ve XBP1 protein ekspresyonları EtOH grubunda önemli derecede yükseliş göstermiştir. Bu durum yoğun EtOH maruziyeti konusunda literatürdeki bulguları destekler bir şekilde ERS'yi başlattığını düşündürmüştür. EtOH+ALKAR grubu EtOH grubu ile kıyaslandığında GRP78, CHOP ve XBP1 proteinleri için görülen anlamlı düşüş ise ALKAR'ın stres koşullarında iyileştirici bir ajan olarak olumlu etki gösterebildiğini desteklemektedir. Aynı zamanda, EtOH'ın zararlı etkilerinden testisi koruma potansiyeli olduğunu düşündürmektedir. ERS koşulları altında aktifleşen bu 3 protein ile ilgili yaptığımız immünohistokimya ve western blot değerlendirmeleri, çeşitli çalışmalarda belirtildiği gibi EtOH metabolizması sonucu oluşan oksidatif stresle birlikte ERS'nin artması ve ALKAR'ın literatürde belirtildiği gibi bir antioksidan görev görerek ERS belirteçlerinin ekspresyonlarını azaltması mevcut yayınlar ile benzer doğrultuda olup sonuçlarımız literatür tarafından desteklenmektedir.

Çalışmamızda testiste apoptoz süreci, aktif kaspaz-3 ekspresyonları ve TUNEL yöntemi ile incelenmiştir. Aktif kaspaz-3 ekspresyonu, kontrol grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel olarak artmış olsa da EtOH grubunda izlenen yükseliş dikkat çekmiştir. Bununla birlikte immünohistokimya bulgularında, EtOH ve EtOH+ALKAR grupları arasında herhangi bir farklılık izlenmemiştir. Buna karşın western blot bulgularında ise belirgin bir farklılık görülmüştür. Apoptotik indeks hesaplaması için yapılmış olan TUNEL yönteminde ise literatürde EtOH'ın apoptozu tetiklediğini ve ALKAR'ın farklı nedenlerle oluşan apoptozu

engelleyebildiğini gösteren bulgulara benzer şekilde, kontrol grubuna nispeten EtOH grubunda istatistiksel olarak ciddi bir artış izlenmiş ve EtOH grubu ile EtOH+ALKAR grubu değerlendirildiğinde ise EtOH+ALKAR grubunda izlenen anlamlı azalış ALKAR'ın apoptozu azaltma potansiyeli olduğunu düşündürmüştür. Aktif kaspaz-3 dışında JNK, kaspaz-9 ve kaspaz-12'nin de ERS'ye yanıt olarak apoptozda önemli rol oynadığı bilinmektedir (Morishima ve ark., 2002). hCG'nin hücrelerde ERS aracılı apoptozu indükleyip indüklediğini doğrulamak için zamana ve miktara bağlı hCG enjeksiyonunun yanı sıra ERS indükleyici de kullanılan bir çalışmada fosfo-JNK, aktif kaspaz-12 ve aktif kaspaz-3 proteinleri analiz edilmiştir. Aktif kaspaz-12 seviyeleri erken zamanlardan itibaren önemli ölçüde artarken aktif kaspaz-3 ekspresyonu, aktif kaspaz-12 ve JNK ekspresyonlarından çok daha sonra artmaya başlamıştır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda aktif kaspaz-3 ekspresyonunda gördüğümüz farklılıklar apoptoz mekanizmasının aktif kaspaz-12 ya da JNK aracılığı ile gerçekleşmiş olabilme ihtimalini düşündürmektedir (Morishima ve ark., 2002; Park ve ark., 2013).

Alkol bağımlısı erkeklerde testosteron seviyesinin azalması, FSH ve LH seviyelerinin yükselmesi, alkol kullanımının HPG eksenini bozabileceğini veya Leydig hücre hasarına neden olabileceğini göstermektedir (Muthusami ve ark., 2005; Maneesh ve ark., 2006; Zhu ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada, alkolün intragastrik veya buhar yoluyla uygulandığı deneylerde, intragastrik modelde hCG uygulamasından sonra steroidogenik belirteçlerden StAR proteini ve PBR seviyeleri 10 dakika içinde önemli ölçüde azaldığı bu süreyi takiben 24 saat boyunca StAR seviyeleri sabit kalırken, PBR seviyeleri değişkenlik göstermiştir ve 48 saat sonra StAR, PBR ve p450scc seviyeleri kontrol değerlerinin üzerine çıkmıştır (Herman ve ark., 2006). Alkol buharı modellerinde, her iki alkol uygulama rejimi de StAR ve PBR protein konsantrasyonlarını önemli ölçüde baskımlarken, testosteron yanıtını durdurmuş ve p450scc seviyelerini değiştirmemiştir. Ayrıca sistemik alkol uygulamasının, yetişkin sıçanlarda Leydig hücre aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Herman ve ark., 2006). Domuzlar üzerinde yapılan bir çalışma sonuçlarına göre EtOH uygulaması

sonrası, Leydig hücrelerindeki kolesterol seviyesi artarken, StAR proteini, sitokrom P450_{scc}, 3 β -HSD, 17 β -HSD enzimlerinde hem mRNA hem de protein ekspresyonlarının önemli oranda azaldığı bildirilmiş ve askorbik asit ile tedavi edildiğinde domuzlarda, bu olumsuz etkilerin azaldığı ortaya konulmuştur (Radhakrishnakartha ve ark., 2014).

Çalışmamızda EtOH kullanımının testislerde steroidogenik belirteçlerinden StAR, p450_{scc}, 3 β -HSD 17 β -HSD3 ve LHR proteinlerinin ekspresyonları immünohistokimya ve western blot yöntemleriyle incelenmiştir. p450_{scc} ekspresyonu EtOH grubunda anlamlı seviyede azalırken EtOH+ALKAR grubu EtOH grubu ile karşılaştırıldığında p450_{scc} ekspresyonu artarak kontrol grubuna benzer seviyeye ulaşmıştır. Buna karşın western blot analizleri sonucunda p450_{scc} ekspresyonunun EtOH+ALKAR grubunda da EtOH grubunda olduğu gibi bir azalış gösterdiği tespit edilmiştir. 3 β -HSD, 17 β -HSD ve LHR protein ekspresyonları, EtOH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalırken EtOH+ALKAR grubunda EtOH grubuna kıyasla önemli seviyede arttığı izlenmiştir. Bu bulgulara ek olarak western blot sonuçları ALKAR grubunda da kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış göstermiştir. StAR proteininde ise kontrol grubuna göre tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış seyredilmiştir. StAR proteini için bu bulguları western blot analizleri de doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, kronik alkol kullanımının steroidogenez yolağını olumsuz yönde etkilediğine dair bulgular ile aynı doğrultudadır (Herman ve ark., 2006; Radhakrishnakartha ve ark., 2014). Ancak literatür bilgilerinin ALKAR'ın antioksidan görevi gördüğü ve testis üzerindeki olumsuzlukları engelleyebildiğine dair bulgular, bu yolak açısından tespit edilememiştir (Coskun ve ark., 2013; Khaw ve ark., 2020; Szymanski ve ark., 2022).

Her ne kadar western blot ve immünohistokimya teknikleri, antikor-antijen etkileşimi ilkesine dayansa da immünohistokimya ve western blot analizleri arasındaki farklılıklar, numune preparasyonları, metodoloji, duyarlılık ve spesifikite farkları, antikor kullanımı ve teknik değişkenliklerden kaynaklanabilir.

İmmünohistokimya için doku örneklerinden alınan kesitlerin kullanılması ve örnek boyutunun 5 µm olması önemli dezavantajlardan biridir. İmmünohistokimya dokudaki lokal değişikliklere daha duyarlı olabilirken, western blot genel protein ekspresyonunu ölçer ve bu nedenle her iki yöntemin sonuçları farklılık gösterebilir.

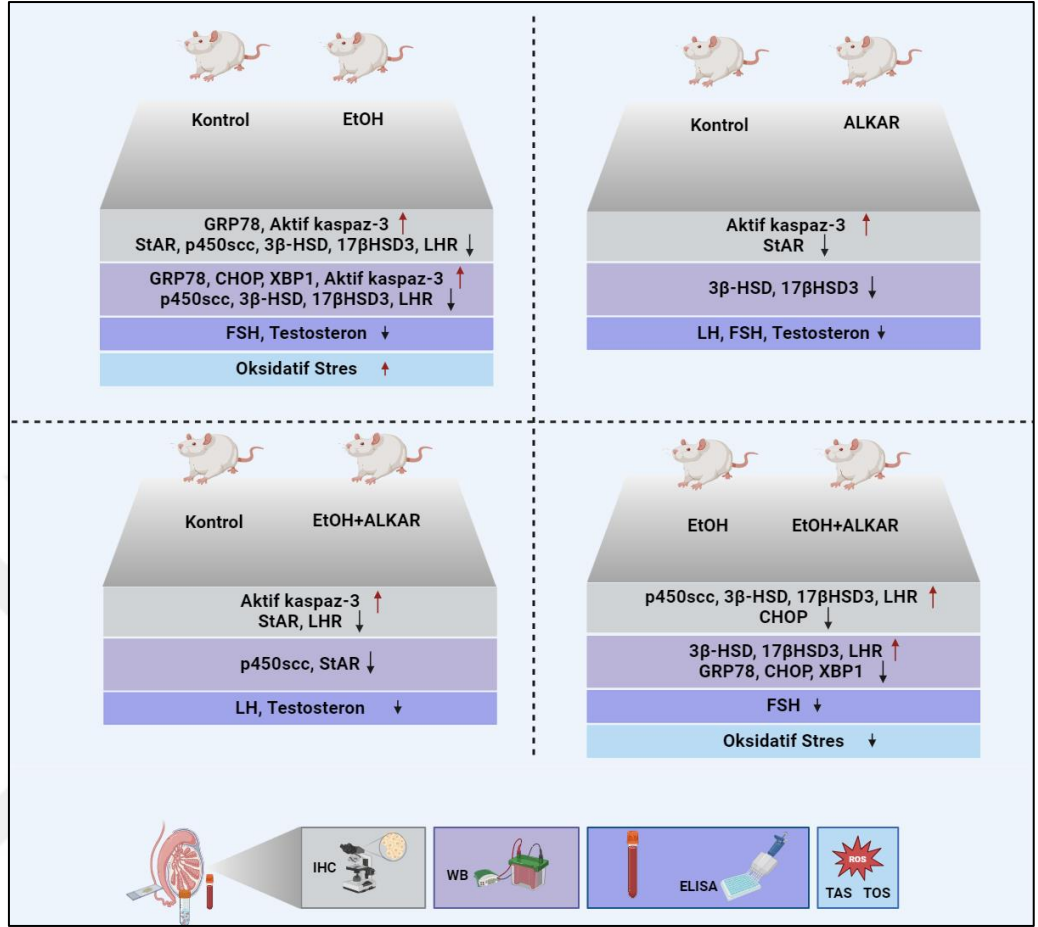
Kronik alkol kullanımı, testis fonksiyonlarını bozarak Leydig hücrelerinin aktivitelerini inhibe ederek serum testosteron seviyelerini düşürmektedir (Gavaler ve ark., 1983). Bu durum, alkolün testosteron biyosentezinde rol oynayan enzimlerin ve proteinlerin ekspresyonunu ve fonksiyonunu azaltmasına bağlıdır (Herman ve ark., 2006). Çalışmamızda serum örneklerinden LH, FSH ve testosteron seviyeleri ELİSA yöntemi ile ölçülmüştür. ELİSA bulguları değerlendirildiğinde FSH ve testosteron seviyeleri tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir azalma göstermiştir. Literatürde alkol uygulaması ile FSH, LH ve testosteronun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Gavaler ve ark., 1983; Maneesh ve ark., 2006; Radhakrishnakartha ve ark., 2014). FSH, spermatogenez sürecini destekleyen Sertoli hücrelerinin fonksiyonunu düzenlerken, LH Leydig hücrelerinden testosteron üretimini uyarır. Alkolün bu hormonların seviyelerini azaltarak spermatogenezi ve steroidogenezi olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Araştırmamızda elde edilen bulgular, FSH ve testosteron seviyelerindeki önemli azalmanın, alkolün bu hücreler üzerindeki inhibe edici etkisi ile uyumlu olduğunu desteklemektedir. Bununla birlikte LH ve FSH açısından literatürde farklı bulgular da bulunmaktadır (Gavaler ve ark., 1983; Muthusami ve ark., 2005; Jensen ve ark., 2014; Radhakrishnakartha ve ark., 2014). Muthusami ve arkadaşları, kronik olarak alkol kullanan erkeklerde FSH, ve LH düzeylerinde önemli artış, testosteron hormonu seviyesinde ise önemli ölçüde azalma olduğunu bildirmiştir (Muthusami ve Chinnaswamy, 2005). Diğer yandan Jensen ve arkadaşları, 8344 sağlıklı erkekte FSH, LH ve inhibin B düzeyleri ile alkol alımı arasında herhangi bir ilişki gözlemlemediklerini belirtmişlerdir (Jensen ve ark., 2014). ALKAR, mitokondriyal fonksiyonu iyileştirici ve antioksidan özellikleriyle hücrelerin enerji metabolizmasını destekleyerek stresle başa çıkmalarına yardımcı olur. Bu

sayede spermatogenezi olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir (Khaw ve ark., 2020). Bu çalışmada, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarında tüm hormon seviyelerinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Bu durum, ALKAR'ın, alkolün zararlı etkilerine karşılık koruyucu bir etki gösteremediğini düşündürmüştür. Sonuç olarak, çalışmamız, kronik alkol tüketiminin FSH, LH ve testosteron seviyeleri üzerinde rapor edilen olumsuz etkileri desteklemesine karşın, ALKAR'ın bu süreçlerde olumlu etkisi izlenememiştir. Bu bulgular ve literatürdeki farklılıklar göz önüne alındığında konunun daha fazla araştırılması gerektiği aşikardır. Araştırmalar sonucu görülen bu farklılıklar, çalışma tasarımlarındaki heterojenlikten, dahil edilen popülasyonlardan ve alkol tüketimi alışkanlıklarını sınıflandırmaya yönelik farklı yaklaşımlardan kaynaklanıyor olabilir. Bu farklılıklar ayrıca takviye dozu, süresi ya da hayvanlar arasındaki genetik farklılık ile ilişkili olabilir.

Oksidatif stres ve ERS, etanol kaynaklı çoklu organ hasarına neden olabilen önemli patofizyolojik mekanizmalardır (Comporti ve ark., 2010). Oksidatif stres, çevresel etkileşimler veya aerobik hücresel metabolizmanın doğal bir sonucu olarak ROS üretimindeki artış ile ortaya çıkabilir. Bu durum, hücrelerin biyokimyasal süreçlerini bozarak birçok organın fonksiyonunu olumsuz etkiler. Çalışmamızda, oksidatif stres belirteçleri olan TAS ve TOS ölçülerek, OSİ hesaplanmıştır. Bu değerlendirmeler, hücrelerdeki oksidatif dengeyi ve oksidatif stresin derecesini belirlememize yardımcı olmuştur. OSİ, TOS ve TAS arasındaki oranı temsil eder ve bu şekilde hücresel oksidatif stresin genel durumunu yansıtır. Oksidatif strese yönelik sonuçlarımızda, OSİ değeri kontrol grubuna kıyasla EtOH grubunda istatistiksel anlamda yüksek olduğu belirlenmiştir. ALKAR'ın EtOH üzerindeki etkisini araştırdığımız EtOH+ALKAR grubunda ise OSİ değeri EtOH grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir şekilde azalmıştır. Dolayısıyla çalışmamızın bulguları, yoğun EtOH kullanımının, oksidatif stresi arttırabileceğini ve ALKAR gibi antioksidan özelliği bulunan maddelerin ortaya çıkan olumsuz etkiyi azaltabileceğini düşündürmüştür. Bu bulgular, literatürdeki EtOH ve oksidatif stres ilişkisi ile

ilgili çalışmalarla uyumludur (Abd-Allah ve ark., 2009; Comporti ve ark., 2010; Er ve ark., 2023).

Kronik alkol kullanımının sıçan testis dokusunda ERS, steroidogenez, oksidatif stres ve apoptoz üzerinde sebep olduğu değişiklikleri değerlendirmek ve ALKAR'ın bu değişikliklere olan etkisini araştırdığımız çalışmamız, bulguları ve deney modeli itibariyle son derece zgn olup günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülen erkek infertilitesinin mekanizmalarını anlamak, erkek infertilitesine potansiyel bir çözüm sunabilmek ve giderek artan alkol bağımlılığının testis üzerindeki olumsuz özelliklerini detaylandırmak için oldukça önemli bir çalışmadır. Aynı zamanda çalışmamızda günümüzde popüler olan ERS ve ALKAR kullanımı açısından oldukça önemli bulgular elde edilmiştir. Dolayısıyla son yıllarda alkol tüketimindeki artışın neden olduğu sorunların, antioksidan moleküllerden biri olarak kabul edilen ALKAR uygulaması ile nasıl etkilendiğini gösteren çalışmamızın, konuya ve literatüre yeni bir bakış açısı sağlayarak gelecek çalışmalarda kurulacak olan hipotezlere kaynaklık edebileceği kanaatindeyiz.



Şekil 5.1. Çalışmamızdaki immünohistokimya, Western Blot, ELİSA ve TOS/TAS analizlerine ait yapılan karşılaştırmalar ve sonuçlar özetlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Deney gruplarının testis ağırlık indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.
2. EtOH grubunun sperm motilitesinde azalma görülürken EtOH+ALKAR grubunda EtOH grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek sperm motilite yüzdesi olduğu kaydedilmiştir.
3. Histopatolojik değerlendirmelerde özellikle EtOH grubunda seminifer tübül mimarisinde düzensizlik, spermatogenik seri hücrelerin organizasyonunda bozulmalar, seminifer tübüllerin içerisinde vakuolizasyonlar, seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrışmalar olduğu gözlenmiştir. EtOH+ALKAR grubunda bu patolojilerin azaldığı dikkat çekmiştir. Bu bulgular modifiye Johnsen skorlaması bulguları ile de desteklenmiştir.
4. İmmünohistokimya ve western blot analizlerinde ERS belirteçlerinden GRP78, CHOP ve XBP1 ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla EtOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlenirken, EtOH grubuna kıyasla EtOH+ALKAR grubunda istatistiksel açıdan önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir.
5. İmmünohistokimya ve western blot analizlerinde steroidogenez belirteçlerinden p450scc, 3BHSD, HSD17B3 ve LHR protein ekspresyonları kontrol grubuna kıyasla EtOH grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde azalırken, EtOH grubuna kıyasla EtOH+ALKAR grubunda istatistiksel açıdan önemli bir artma olduğu tespit edilmiştir. StAR ekspresyonu ise kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda azalmıştır.
6. Aktif kaspaz-3 ve TUNEL bulguları değerlendirildiğinde, aktif kaspaz-3 ekspresyonu özellikle EtOH grubu dikkat çekmek üzere, tüm gruplarda apoptotik tübül sayısı ve indeksi açısından istatistiksel olarak artış göstermiştir. TUNEL sonuçlarında ise EtOH grubundaki istatistiksel açıdan dikkat çeken artış EtOH+ALKAR grubunda anlamlı bir şekilde azalarak kontrol grubundaki değerlere yaklaşmıştır.

7. LH, FSH ve testosteron seviyelerinde tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalış izlenmiştir.
8. TAS ve TOS düzeylerinin ve oksidatif stresi belirten OSİ değerinin EtOH grubunda en yüksek olduğu tespit edilirken, ALKAR ve EtOH+ALKAR grubunda bu değerlerin oldukça azaldığı belirlenmiştir.
9. EtOH, ALKAR ve EtOH+ALKAR gruplarında, hayvanların stres yaşamasını engellemek amacıyla oldukça dikkatli bir şekilde gavaj yapılmıştır. Bu durum çalışmamızın kısıtlayıcı noktası olabilir. Stres sonucu hormon seviyeleri ve oksidatif stres tetiklenebilir ve değerlendirmelerin farklı çıkmasına neden olabilir.
10. Çalışmamızda kullanılan ALKAR, EtOH maruziyeti sonucu oluşan histopatolojik değişiklikleri, ERS'nin başlatılmasını, sperm motilitesini, oksidatif stresi ve kısmen steroidogenez yolağındaki bozulmaları düzeltebilmek için potansiyel tedavi edici bir antioksidan olarak kullanılabilir. Bu bakımdan ALKAR uygulaması EtOH kaynaklı erkek fertilitesinde rol oynayarak fertilitenin korunmasına ve iyileştirilmesine katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Abd-Allah AR, Helal GK, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Bakheet SA. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by l-carnitine. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009; 2: 73-81.
- Abou-Ghali M, Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi journal of biological sciences*. 2015; 22: 760-772.
- Abraham LK. *Histoloji ve hücre biyolojisi*. Ankara: Palme yayıncılık; 2006.
- Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C , ve ark. Xbp1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Molecular cell*. 2007; 27: 53-66.
- Ajoolabady A, Lebeaupin C, Wu NN, Kaufman RJ, Ren J. Er stress and inflammation crosstalk in obesity. *Medicinal research reviews*. 2023; 43: 5-30.
- Akbari A, Nasiri K, Heydari M, Mosavat SH, Iraj A. The protective effect of hydroalcoholic extract of zingiber officinale roscoe (ginger) on ethanol-induced reproductive toxicity in male rats. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*. 2017; 22: 609-617.
- Aldahhan RA, Stanton PG. Heat stress response of somatic cells in the testis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2021; 527: 111216.
- Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008; 40: 14-21.
- Armstrong JL, Flockhart R, Veal GJ, Lovat PE, Redfern CP. Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by atf4 in neuroectodermal tumor cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285: 6091-6100.
- Aureli T, Miccheli A, Di Cocco ME, Ghirardi O, Giuliani A, Ramacci MT , ve ark. Effect of acetyl-l-carnitine on recovery of brain phosphorus metabolites and lactic acid level during reperfusion after cerebral ischemia in the rat--study by 13p- and 1h-nmr spectroscopy. *Brain research*. 1994; 643: 92-99.

- Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*. 2000; 109: 33-44.
- Bai S, Wan Y, Zong L, Li W, Xu X, Zhao Y , ve ark. Association of alcohol intake and semen parameters in men with primary and secondary infertility: A cross-sectional study. *Frontiers in physiology*. 2020; 11: 566625.
- Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of l-carnitine, l-acetylcarnitine, or combined l-carnitine and l-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertility and sterility*. 2005; 84: 662-671.
- Beattie MC, Adekola L, Papadopoulos V, Chen H, Zirkin BR. Leydig cell aging and hypogonadism. *Experimental gerontology*. 2015; 68: 87-91.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of bip and er stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*. 2000; 2: 326-332.
- Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nature reviews. Urology*. 2017; 14: 470-485.
- Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK. Phenotyping male infertility in the mouse: How to get the most out of a 'non-performer'. *Human reproduction update*. 2010; 16: 205-224.
- Borges E, Jr., Braga D, Provenza RR, Figueira RCS, Iaconelli A, Jr., Setti AS. Paternal lifestyle factors in relation to semen quality and in vitro reproductive outcomes. *Andrologia*. 2018; 50: e13090.
- Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clinics in liver disease*. 2012; 16: 667-685.
- Celik-Ozenci C, Tasatargil A, Tekcan M, Sati L, Gungor E, Isbir M , ve ark. Effect of abamectin exposure on semen parameters indicative of reduced sperm maturity: A study on farmworkers in antalya (turkey). *Andrologia*. 2012; 44: 388-395.
- Chemes HE. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *International journal of andrology*. 2001; 24: 2-7.
- Chen Z, Wen D, Wang F, Wang C, Yang L. Curcumin protects against palmitic acid-induced apoptosis via the inhibition of endoplasmic reticulum stress in testicular leydig cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2019; 17: 71.

- Chikka MR, McCabe DD, Tyra HM, Rutkowski DT. C/ebp homologous protein (chop) contributes to suppression of metabolic genes during endoplasmic reticulum stress in the liver. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288: 4405-4415.
- Chow CY, Avila FW, Clark AG, Wolfner MF. Induction of excessive endoplasmic reticulum stress in the drosophila male accessory gland results in infertility. *PloS one*. 2015; 10: e0119386.
- Clermont Y, Harvey SC. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology*. 1965; 76: 80-89.
- Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Gardi C, Ciccoli L, Giardini A , ve ark. Ethanol-induced oxidative stress: Basic knowledge. *Genes & nutrition*. 2010; 5: 101-109.
- Coskun N, Hatipoglu MT, Ozogul C, Korkmaz C, Akyol SN, Micili SC , ve ark. The protective effects of acetyl l-carnitine on testis gonadotoxicity induced by cisplatin in rats. *Balkan medical journal*. 2013; 30: 235-241.
- Costabile R. Anatomy and physiology of the male reproductive system. In N York (Ed.), *Surgical and medical management of male infertility*. New York: Cambridge University Press; 2013, p. 1-7.
- Creasy DM. Histopathology of the male reproductive system i: Techniques. *Current protocols in toxicology*. 2002; Chapter 16: Unit16 13.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Human reproduction*. 1998; 13 Suppl 1: 1-8.
- De Rooij DG, Van Dissel-Emiliani FM, Van Pelt AM. Regulation of spermatogonial proliferation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1989; 564: 140-153.
- DSÖ. (2014). *Global status report on alcohol and health 2014*. Retrieved from Geneva, Switzerland:
- DSÖ. (2020). Retrieved from Dünya Sağlık Örgütü:
- Dym MvW, L. Tissue biology: A textbook of histology. 6th ed. ed. Baltimore: Urban and Schwarzenberg; 1988.
- Ehmcke J, Simorangkir DR, Schlatt S. Identification of the starting point for spermatogenesis and characterization of the testicular stem cell in adult male rhesus monkeys. *Human reproduction*. 2005; 20: 1185-1193.

- Eid N, Ito Y, Horibe A, Otsuki Y, Kondo Y. Ethanol-induced mitochondrial damage in sertoli cells is associated with parkin overexpression and activation of mitophagy. *Cells*. 2019; 8.
- Eleftheriadou M, Medici-van den Herik E, Stuurman K, van Bever Y, Hellebrekers D, van Slegtenhorst M , ve ark. Isobutyryl-coa dehydrogenase deficiency associated with autism in a girl without an alternative genetic diagnosis by trio whole exome sequencing: A case report. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2021; 9: e1595.
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007; 35: 495-516.
- Er H, Gemici A, Tas GG, Sati L, Zengin G, Bilmen S , ve ark. Acetyl-l-carnitine attenuates chronic ethanol-induced oxidative stress, er stress and apoptosis in rat gastric tissue. *Alcohol*. 2023; 112: 51-59.
- Esmaeili V, Shahverdi AH, Moghadasian MH, Alizadeh AR. Dietary fatty acids affect semen quality: A review. *Andrology*. 2015; 3: 450-461.
- Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of internal medicine*. 2005; 258: 479-517.
- Faid I, Al-Hussaini H, Kilarkaje N. Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-jun n-terminal kinase signaling in rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015; 289: 482-494.
- Finelli R, Mottola F, Agarwal A. Impact of alcohol consumption on male fertility potential: A narrative review. *International journal of environmental research and public health*. 2021; 19.
- Fujii J, Imai H. Redox reactions in mammalian spermatogenesis and the potential targets of reactive oxygen species under oxidative stress. *Spermatogenesis*. 2014; 4: e979108.
- Gabrielsen JS, Tanrikut C. Chronic exposures and male fertility: The impacts of environment, diet, and drug use on spermatogenesis. *Andrology*. 2016; 4: 648-661.

- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell death and differentiation*. 2018; 25: 486-541.
- Gavaler JS, Perez HA, Estes L, Van Thiel DH. Morphologic alterations of rat leydig cells induced by ethanol. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1983; 18 Suppl 1: 341-347.
- Ghosh AK, Garg SK, Mau T, O'Brien M, Liu J, Yung R. Elevated endoplasmic reticulum stress response contributes to adipose tissue inflammation in aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2015; 70: 1320-1329.
- Griswold MD. Spermatogenesis: The commitment to meiosis. *Physiological reviews*. 2016; 96: 1-17.
- Gurung P, Yetiskul E, Jialal I. Physiology, male reproductive system. In Statpearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Ekrem Yetiskul declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Ishwarlal Jialal declares no relevant financial relationships with ineligible companies.; 2024.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in enzymology*. 1990; 186: 1-85.
- Hammer JH, Parent MC, Spiker DA. Mental help seeking attitudes scale (mhsas): Development, reliability, validity, and comparison with the atspph-sf and iasmhs-po. *Journal of counseling psychology*. 2018; 65: 74-85.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999; 397: 271-274.
- Heffner LJvS, D. J. The reproductive system at a glance. 4th ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons; 2014.
- Heindel JJ, Treinen KA. Physiology of the male reproductive system: Endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicologic pathology*. 1989; 17: 411-445.
- Herman M, Kang SS, Lee S, James P, Rivier C. Systemic administration of alcohol to adult rats inhibits leydig cell activity: Time course of effect and role of nitric oxide. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2006; 30: 1479-1491.

- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 1993; 75: 241-251.
- Holstein AFvW, Ch. Über die wirkung der glatten muskulatur in der tunica albuginea im hoden des kaninchens; messungen des interstitiellen druckes. *Z. ges. exp. Med*. 1967; 142: 334-337.
- Horak S, Polanska J, Widlak P. Bulky DNA adducts in human sperm: Relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutation research*. 2003; 537: 53-65.
- Hosoi T, Korematsu K, Horie N, Suezawa T, Okuma Y, Nomura Y , ve ark. Inhibition of casein kinase 2 modulates xbp1-grp78 arm of unfolded protein responses in cultured glial cells. *PloS one*. 2012; 7: e40144.
- Hosseini M, Shaygannia E, Rahmani M, Eskandari A, Golsefid AA, Tavalae M , ve ark. Endoplasmic reticulum stress (er stress) and unfolded protein response (upr) occur in a rat varicocele testis model. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020; 2020: 5909306.
- Huang KH, Weng TI, Huang HY, Huang KD, Lin WC, Chen SC , ve ark. Honokiol attenuates torsion/detorsion-induced testicular injury in rat testis by way of suppressing endoplasmic reticulum stress-related apoptosis. *Urology*. 2012; 79: 967 e965-911.
- Hughes BA, Crofton EJ, O'Buckley TK, Herman MA, Morrow AL. Chronic ethanol exposure alters prelimbic prefrontal cortical fast-spiking and martinotti interneuron function with differential sex specificity in rat brain. *Neuropharmacology*. 2020; 162: 107805.
- Ilhan MN, Yapar D. Alcohol consumption and alcohol policy. *Turkish journal of medical sciences*. 2020; 50: 1197-1202.
- J. Gordon Betts PD, Hill Eddie Johnson, Jody E. Johnson, Oksana Korol, Dean Kruse, Brandon Poe, Springfield James A. Wise, Mark Womble, Kelly A. Young. *Anatomy & physiology*. OpenStax Rice University 2013.
- Jensen TK, Swan S, Jorgensen N, Toppari J, Redmon B, Punab M , ve ark. Alcohol and male reproductive health: A cross-sectional study of 8344 healthy men from europe and the USA. *Human reproduction*. 2014; 29: 1801-1809.

- Ji C. Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. *Biochemistry research international*. 2012; 2012: 216450.
- Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970; 1: 2-25.
- Jones LL, McDonald DA, Borum PR. Acylcarnitines: Role in brain. *Progress in lipid research*. 2010; 49: 61-75.
- Karna KK, Shin YS, Choi BR, Kim HK, Park JK. The role of endoplasmic reticulum stress response in male reproductive physiology and pathology: A review. *The world journal of men's health*. 2020; 38: 484-494.
- Kelek SE, Afsar E, Akcay G, Danisman B, Aslan M. Effect of chronic l-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of adult wistar rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2019; 134: 110851.
- Khaw SC, Wong ZZ, Anderson R, Martins da Silva S. L-carnitine and l-acetylcarnitine supplementation for idiopathic male infertility. *Reproduction & fertility*. 2020; 1: 67-81.
- Kierszenbaum AL. *Histoloji ve hücre biyolojisi- patolojiye giriş*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
- Kim E. Barrett SMB, Scott Boitano, Heddwen Brooks. *Ganong's review of medical physiology*. 24. baskı ed.: McGraw Hill Professional; 2012.
- Kincaid MM, Cooper AA. Eradicate er stress or die trying. *Antioxidants & redox signaling*. 2007; 9: 2373-2387.
- Kizilay G, Ersoy O, Cerkezkayabekir A, Topcu-Tarladacalisir Y. Sitagliptin and fucoidan prevent apoptosis and reducing er stress in diabetic rat testes. *Andrologia*. 2021; 53: e13858.
- Kohn FM, Schuppe HC, Haidl G. [andrology]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2010; 61: 787-785; quiz 806.
- Kubota H, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. *Biology of reproduction*. 2018; 99: 52-74.

- Kucheria K, Saxena R, Mohan D. Semen analysis in alcohol dependence syndrome. *Andrologia*. 1985; 17: 558-563.
- Kuhn-Velten N, Codjambopoulo P, Haider SG, Passia D, Kley HK, Herberg L, ve ark. Biochemical and histochemical studies on the pituitary-testicular axis in obese (c57bl/6j-ob/ob) mice. *International journal of andrology*. 1986; 9: 123-131.
- Kuller LH, May SJ, Perper JA. The relationship between alcohol, liver disease, and testicular pathology. *American journal of epidemiology*. 1978; 108: 192-199.
- Lakshmi C. Hormone therapy in acne. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. 2013; 79: 322-337.
- Leisegang K, Dutta S. Do lifestyle practices impede male fertility? *Andrologia*. 2021; 53: e13595.
- Li C, Zhang H, Mo J, Zuo J, Ye L. Caspase-3/gsdme dependent pyroptosis contributes to offspring lung injury induced by gestational pfos exposure via perk/atf4 signaling. *Archives of toxicology*. 2024; 98: 207-221.
- Li H, Wen W, Luo J. Targeting endoplasmic reticulum stress as an effective treatment for alcoholic pancreatitis. *Biomedicines*. 2022; 10.
- Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: Systematic review and meta-analyses. *Fertility and sterility*. 2011; 95: 116-123.
- Liu GL, Yu F, Dai DZ, Zhang GL, Zhang C, Dai Y. Endoplasmic reticulum stress mediating downregulated star and 3-beta-hsd and low plasma testosterone caused by hypoxia is attenuated by cpu86017-rs and nifedipine. *Journal of biomedical science*. 2012; 19: 4.
- Luhr M, Torgersen ML, Szalai P, Hashim A, Brech A, Staerk J, ve ark. The kinase perk and the transcription factor atf4 play distinct and essential roles in autophagy resulting from tunicamycin-induced er stress. *The Journal of biological chemistry*. 2019; 294: 8197-8217.
- Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 2006; 50: 291-296.

- Mawhinney M, Mariotti A. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontology* 2000. 2013; 61: 232-251.
- Mescher AL. Junqueira's temel histoloji, atlas kitap. S Solakoğlu, Trans. 13th ed. İstanbul, Esenyurt, Türkiye Cumhuriyeti: Nobel Tıp Kitabevleri; 2015.
- Molina PE. Endocrine physiology. New York: McGraw-Hill Lange Medical; 2013.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 34287-34294.
- Mu Y, Yin TL, Huang XX, Hu X, Yin L, Yang J. Sulforaphane ameliorates high-fat diet-induced spermatogenic deficiency in micedagger. *Biology of reproduction*. 2019; 101: 223-234.
- Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertility and sterility*. 2005; 84: 919-924.
- Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of cell biology*. 2000; 150: 887-894.
- Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *The American journal of anatomy*. 1956; 99: 507-516.
- Ozcelik B, Turkyilmaz C, Ozgun MT, Serin IS, Batukan C, Ozdamar S , ve ark. Prevention of paclitaxel and cisplatin induced ovarian damage in rats by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertility and sterility*. 2010; 93: 1609-1614.
- Pajarinen JT, Karhunen PJ. Spermatogenic arrest and 'sertoli cell-only' syndrome--common alcohol-induced disorders of the human testis. *International journal of andrology*. 1994; 17: 292-299.
- Park SJ, Kim TS, Park CK, Lee SH, Kim JM, Lee KS , ve ark. Hcg-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in leydig cells of the testis. *Journal of molecular endocrinology*. 2013; 50: 151-166.

- Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*. 2004; 25: 947-970.
- Pazarcıkçı M EAA. Denetimli serbestlik tedbirine tabi kişilerde sigara, alkol ve patolojik kumar bağımlılığının araştırılması. *Bağımlılık Dergisi*. 2020; 21: 190-200.
- Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003; 48: 1-19; quiz 20-12.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V , ve ark. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017; 2017: 8416763.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*. 2017; 38: 592-607.
- Rachdaoui N, Sarkar DK. Pathophysiology of the effects of alcohol abuse on the endocrine system. *Alcohol research : current reviews*. 2017; 38: 255-276.
- Radhakrishnakartha H, Appu AP, Indira M. Ascorbic acid supplementation enhances recovery from ethanol induced inhibition of leydig cell steroidogenesis than abstention in male guinea pigs. *European journal of pharmacology*. 2014; 723: 73-79.
- Razi M, Tavalae M, Sarrafzadeh-Rezaei F, Moazamian A, Gharagozloo P, Drevet JR , ve ark. Varicocoele and oxidative stress: New perspectives from animal and human studies. *Andrology*. 2021; 9: 546-558.
- Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: Pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clinical pharmacokinetics*. 2012; 51: 553-572.
- Ricci E, Al Beitawi S, Cipriani S, Candiani M, Chiaffarino F, Vigano P , ve ark. Semen quality and alcohol intake: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2017; 34: 38-47.
- Ricci E, Noli S, Ferrari S, La Vecchia I, Cipriani S, De Cosmi V , ve ark. Alcohol intake and semen variables: Cross-sectional analysis of a prospective cohort study of men referring to an italian fertility clinic. *Andrology*. 2018; 6: 690-696.

- Ricciolini R, Scalibastri M, Kelleher JK, Carminati P, Calvani M, Arduini A. Role of acetyl-l-carnitine in rat brain lipogenesis: Implications for polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Journal of neurochemistry*. 1998; 71: 2510-2517.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007; 8: 519-529.
- Rosati E, Sabatini R, Rampino G, De Falco F, Di Ianni M, Falzetti F , ve ark. Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in b-cll. *Blood*. 2010; 116: 2713-2723.
- Ross MHP, W. *Histology: A text and atlas*. 6th edition ed.: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2011.
- Ross MHvP, W. Male reproductive system. In MH Ross, Pawlina, W. (Ed.), *Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 7th ed., China: Wolters Kluwer Health; 2016, p. 790-833.
- Ross MHvW, P. *Histoloji konu anlatımı ve atlas. İlişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji ile*. Altıncı Baskıdan Çeviri ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2014.
- Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, Menafrà D, Pozza C, Pivonello R , ve ark. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2018; 16: 3.
- Scafidi S, Fiskum G, Lindauer SL, Bamford P, Shi D, Hopkins I , ve ark. Metabolism of acetyl-l-carnitine for energy and neurotransmitter synthesis in the immature rat brain. *Journal of neurochemistry*. 2010; 114: 820-831.
- Schnackenberg CG, Wilcox CS. The sod mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney international*. 2001; 59: 1859-1864.
- Schonthal AH. Endoplasmic reticulum stress: Its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica*. 2012; 2012: 857516.
- Schroder M, Kaufman RJ. Er stress and the unfolded protein response. *Mutation research*. 2005; 569: 29-63.
- Schuldiner M, Weissman JS. The contribution of systematic approaches to characterizing the proteins and functions of the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013; 5: a013284.

- Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016; 73: 79-94.
- Sengupta P, Dutta S, Krajewska-Kulak E. The disappearing sperms: Analysis of reports published between 1980 and 2015. *American journal of men's health*. 2017; 11: 1279-1304.
- Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox report : communications in free radical research*. 2004; 9: 145-152.
- Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E , ve ark. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in physiology*. 2020; 11: 694.
- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ , ve ark. Best practice policies for male infertility. *Fertility and sterility*. 2002; 77: 873-882.
- Shi Y, Vattam KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L , ve ark. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, pek, involved in translational control. *Molecular and cellular biology*. 1998; 18: 7499-7509.
- Smith JD, Jane. Alcohol induced testicular damage: Can abstinence equal recovery? *Journal of Reproductive Health*. 2023; 45: 123-130.
- Soni KK, Zhang LT, Choi BR, Karna KK, You JH, Shin YS , ve ark. Protective effect of motiliperm in varicocele-induced oxidative injury in rat testis by activating phosphorylated inositol requiring kinase 1alpha (p-ire1alpha) and phosphorylated c-jun n-terminal kinase (p-jnk) pathways. *Pharmaceutical biology*. 2018; 56: 94-103.
- Soni KK, Zhang LT, You JH, Lee SW, Kim CY, Cui WS , ve ark. The effects of motiliperm on cisplatin induced testicular toxicity in sprague-dawley rats. *Cancer cell international*. 2015; 15: 121.
- Stridh H, Kimland M, Jones DP, Orrenius S, Hampton MB. Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS letters*. 1998; 429: 351-355.

- Stukenborg JB, Colon E, Soder O. Ontogenesis of testis development and function in humans. Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation. 2010; 4: 199-212.
- Szymanski M, Domaracki P, Szymanska A, Wandtke T, Szyca R, Brycht L , ve ark. The role and place of antioxidants in the treatment of male infertility caused by varicocele. Journal of clinical medicine. 2022; 11.
- Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol. 2011; 45: 403-409.
- Taoto C, Tangsrisakda N, Thukhammee W, Phetcharaburanin J, Iamsaard S, Tanphaichitr N. Rats orally administered with ethyl alcohol for a prolonged time show histopathology of the epididymis and seminal vesicle together with changes in the luminal metabolite composition. Biomedicines. 2024; 12.
- Teves ME, Roldan ERS. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. Physiological reviews. 2022; 102: 7-60.
- Tiwana MS, Leslie SW. Anatomy, abdomen and pelvis: Testes. In Statpearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Stephen Leslie declares no relevant financial relationships with ineligible companies.; 2024.
- Tung PS, Fritz IB. Morphogenetic restructuring and formation of basement membranes by sertoli cells and testis peritubular cells in co-culture: Inhibition of the morphogenetic cascade by cyclic amp derivatives and by blocking direct cell contact. Developmental biology. 1987; 120: 139-153.
- Tung PS, Skinner MK, Fritz IB. Cooperativity between sertoli cells and peritubular myoid cells in the formation of the basal lamina in the seminiferous tubule. Annals of the New York Academy of Sciences. 1984; 438: 435-446.
- Varesi A, Chirumbolo S, Campagnoli LIM, Pierella E, Piccini GB, Carrara A , ve ark. The role of antioxidants in the interplay between oxidative stress and senescence. Antioxidants. 2022; 11.
- Vessey W, Saifi S, Sharma A, McDonald C, Almeida P, Figueiredo M , ve ark. Baseline levels of seminal reactive oxygen species predict improvements in sperm function

- following antioxidant therapy in men with infertility. *Clinical endocrinology*. 2021; 94: 102-110.
- White B, PhD ve Porterfield, Susan, MD. *Endocrine and reproductive physiology*. 4th ed.: Paperback; 2013.
- Wu D, Huang LF, Chen XC, Huang XR, Li HY, An N , ve ark. Research progress on endoplasmic reticulum homeostasis in kidney diseases. *Cell death & disease*. 2023; 14: 473.
- Yang Y, Workman S, Wilson M. The molecular pathways underlying early gonadal development. *Journal of molecular endocrinology*. 2018.
- Yaris M, Akdogan N, Ozturk M, Bozkurt A, Karabakan M. The effects of two different antioxidant combinations on sperm parameters. *Urologia*. 2022; 89: 629-635.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. Xbp1 mrna is induced by atf6 and spliced by ire1 in response to er stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001; 107: 881-891.
- Zakhari S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 2006; 29: 245-254.
- Zhang GL, Dai DZ, Zhang C, Dai Y. Apocynin and raisanberine alleviate intermittent hypoxia induced abnormal star and 3beta-hsd and low testosterone by suppressing endoplasmic reticulum stress and activated p66shc in rat testes. *Reproductive toxicology*. 2013; 36: 60-70.
- Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. *Mechanisms of ageing and development*. 2002; 123: 245-260.
- Zhu Q, Emanuele MA, LaPaglia N, Kovacs EJ, Emanuele NV. Vitamin e prevents ethanol-induced inflammatory, hormonal, and cytotoxic changes in reproductive tissues. *Endocrine*. 2007; 32: 59-68.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve	Uyruğu	T.C
Soyadı	GÖRGÜLÜ	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Hacı Malike Mehmet Bileydi Anadolu Lisesi	2016
Lisans	İzmir Ekonomi Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü	2021
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans	2024
Doktora	-	

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	82,50

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Deneyisel Kronik Alkolizm Modelinde Asetil L-Karnitin Uygulamasının Testiküler Steroidogenik Yolak Üzerindeki Etkisi	TUSEB-31815	1 Yıl
Kronik Etanole Maruz Kalan Sıçanların Testis Dokusunda Asetil L-Karnitin Uygulamasının	TÜBİTAK-124S371	6 Ay

Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptoz ile İlişkisi		
Kronik Etanole Maruz Kalan Sıçanların Testis Dokusunda Asetil L-Karnitin Uygulamasının Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptoz ile İlişkisi	BAP-TYL-2022-6144	24 Ay
Gebelik ve Laktasyon Dönemleri Boyunca Maternal Sirkadiyen Ritim Değişikliğinin, Erişkin Yavru Erkek Sıçanlardaki Davranış, Gonadal DNA Metilasyonu ve Transkriptomu Üzerindeki Transgenerasyonel Etkisi	TÜBİTAK-219S636	1 Yıl

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

1. M. Gorgulu¹, G. Zengin¹, G.G. Tas¹, L. Sati¹ - Stress-activated JNK/p38 MAPK signaling and circadian rhythm changes in the maternal ovary during pregnancy and lactation periods, NICHE, Türk Histoloji Derneği, 2022
2. M. Gorgulu¹, G.G. Tas¹, L. Sati¹- Effects of maternal circadian rhythm changes: intergenerational influences on testicular steroidogenesis in offspring - p636 - ESHRE - Amsterdam, 2024