



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

METABOLİK SENDROMLU SIÇANLARDA VİTAMİN D UYGULAMASININ TESTİS DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİ

Tuğçe ÖZBİLENLER

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Temmuz, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Tuğçe ÖZBİLENLER tarafından, **Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI** danışmanlığında hazırlanan "**Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Vitamin D Uygulamasının Testis Dokusu Üzerine Etkileri**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **14/07/2023** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Yıldız TÜTÜNCÜ Koç Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Sibel KÖKTÜRK İstanbul Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Gamze TANRIVERDİ	☐ Kabul ☐ Ret

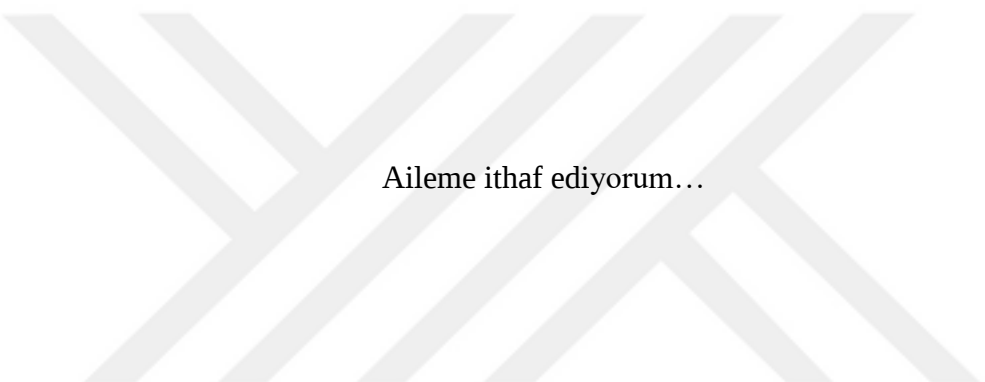
İstanbul Üniversitesi-
Cerrahpaşa
Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı



BEYAN

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

Tuğçe ÖZBİLENLER



Aileme ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

METABOLİK SENDROMLU SIÇANLARDA VİTAMİN D UYGULAMASININ TESTİS DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 36209.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni hep destekleyen, yol gösteren ve anaç tavırlarıyla bir danışmandan fazlası olan sevgili danışmanım Doç. Dr. Fatma Kaya Dağıstanlı'ya,

Her zaman desteklerini esirgemeyen ve tecrübesiyle her daim yol gösteren Prof.Dr. Melek Öztürk Sezgin'e,

İlk geldiğim günden itibaren bize laboratuvarıda yol gösteren, bir abla gibi her zaman sabırla ve anlayışla yaklaşan Uzm. Bio. Ayşe Seda Akdemir'e,

Çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Sakina Rzayeva ve Nergiz Bayramova' ya

Deneyin kurulmasındaki büyük katkılarından dolayı Prof. Dr. Ayşe Evrim Bayrak ve Uzm. Bio Betül Zorkaya' ya,

ELISA yöntemi sırasında bilgi ve yardımları ile bana kattıkları, çalışmamın başarıya ulaşmasında önemli katkıları için değerli hocamız Dr. Çiğdem Bayram Gürel'e,

Bu zorlu süreçte hep yanımda olan, manevi desteklerini eksik etmeyen ve motivasyonumun her düştüğü an beni tekrardan cesaretlendiren arkadaşım Elif Adempira'ya,

Hayatım boyunca hep destekçim olan, aldığım her kararda arkamda duran ve hem maddi hem de manevi olarak destelerini hissettiğim biricik aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2023

Tuğçe ÖZBİLENLER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iv
BÜTÇE DESTEKLERİ	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	6
2.1. TESTİS ANATOMİSİ.....	6
2.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ.....	7
2.3. SPERMATOGENEZ	10
2.4. STEROİDOGENEZ.....	12
2.4.1. Sitokrom P450 (CYP) Enzimleri.....	14
2.4.2. Hidroksisteroid Dehidrogenaz (HSD) Enzimleri	15
2.4.3. Testosteron Biyosentezi	18
2.5. METABOLİK SENDROM (MS).....	19
2.5.1. Tanımı	19
2.5.2. Metabolik Sendrom Patogenezi	21
2.5.3. Metabolik Sendromun Deneysel Hayvan Modelleri.....	23
2.5.4. Metabolik Sendrom ve Erkek İnfertilitesi.....	30
2.6. APOPTOZ	35
2.6.1. Apoptoz Mekanizmaları.....	37
2.6.2. Testis ve Apoptoz.....	39
2.7. OKSİDATİF STRES	41

2.7.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Testis.....	42
2.8. VİTAMİN D	44
2.8.1. Vitamin D Sentez ve Metabolizması.....	45
2.8.2. Vitamin D'in Erkek Üreme Sistemine Olan Etkisi	47
2.8.3. Metabolik Sendrom ve Vitamin D İlişkisi	48
3. YÖNTEM	51
3.1. MATERYAL	51
3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları.....	51
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	51
3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	52
3.2. YÖNTEM	53
3.2.1. Deneysel Hayvan Modelinin Oluşturulması	53
3.2.2. Dokuların Morfolojik İncelenmesi.....	54
3.2.3. ELISA Yöntemi.....	60
3.2.4. İstatistiksel Analiz Yöntemi	61
4. BULGULAR	62
4.1. Kalori Alımı ve Vücut Ağırlığı.....	62
4.2. Açlık Kan Glukoz Seviyesi.....	64
4.3. Testosteron Seviyelerinin Ölçümü.....	65
4.4. Morfolojik Bulgular	65
4.5. İmmünohistokimya Bulguları	70
4.5.1. Aromataz	70
4.5.2. StAR (Steroidogenik Akut Düzenleyici Protein)	72
4.5.3. 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)	73
4.5.4. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)	75
4.5.5. Vitamin D reseptörü (VDR).....	76
4.5.6. Aktif Kaspaz-3	78
4.6. TUNEL Bulguları	79
5. TARTIŞMA.....	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR.....	93
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	109
ETİK KURUL İZİN YAZISI	110
KURUM İZNİ YAZILARI.....	111

ÖZGEÇMİŞ	112
----------------	-----



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Testis enine kesiti.	8
Şekil 2.2: Testis histolojik gösterimi	10
Şekil 2.3: İnsan seminifer epitelinde bulunan germ hücre tiplerinin şematik gösterimi	12
Şekil 2.4: : Hücre içi kolesterol kullanımı.	13
Şekil 2.5: Leydig hücre steroidogenezi.	19
Şekil 2.6: Fazla enerji alımı/obezite ile metabolik sendromun risk faktörleri arasındaki ilişki.	21
Şekil 2.7: Metabolik sendrom ve testis disfonksiyonu arasındaki etkileşim modeli (Goulis ve Tarlatzis, 2008).	31
Şekil 2.8: Metabolik sendromda hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin hormonal olarak düzenlenmesi	33
Şekil 2.9: Hipogonadal-obezite döngüsü.	34
Şekil 2.10: Apoptotik sinyaller, kaskad oluşturan kaspazlar üzerinde birleşir.	39
Şekil 2.11: Vitamin D sentez yolları.	46
Şekil 4.1: Deney gruplarının günlük ortalama kalori alımı	63
Şekil 4.2: Deney gruplarına ait vücut ağırlıkları takibi.	63
Şekil 4.3: Açlık kan glukoz değerleri	64
Şekil 4.4: Deney gruplarının serum testosteron seviyesi.	65
Şekil 4.5: Seminifer tübül çapları.	67
Şekil 4.6: Tübül epitel kalınlığı	67
Şekil 4.7: Bazal membran kalınlığı.	68
Şekil 4.8: Testis dokusunun Hematoksilen-Eozin (HE) boyanması.	68
Şekil 4.9: Testis dokusunun Periyodik asit-Schiff (PAS) boyanması.	69

Şekil 4.10: Grupların Johnsen Skorlama Sonuçları.....	70
Şekil 4.11: Aromataz ekspresyonunun HScore analizinin değişim grafiği.....	71
Şekil 4.12: Testis dokusunda immün pozitif Aromataz ekspresyonunun gösterimi. 71	
Şekil 4.13: Testis dokusunda immün pozitif StAR ekspresyonunun gösterimi.	72
Şekil 4.14: StAR ekspresyonunun HScore analizinin değişim grafiği.....	73
Şekil 4.15: Testis dokusunda immün pozitif 8-OHdG ekspresyonunun gösterimi.	74
Şekil 4.16: 8-OHdG ekspresyonunun HScore analizinin değişim grafiği.....	74
Şekil 4.17: Testis dokusunda immün pozitif PCNA ekspresyonunun gösterimi.	75
Şekil 4.18: PCNA immün pozitif (+) hücre yüzdesinin değişim grafiği.	76
Şekil 4.19: VDR immün pozitif (+) hücre yüzdesinin değişim grafiği.	77
Şekil 4.20: Testis dokusunda immün pozitif VDR ekspresyonunun gösterimi.....	77
Şekil 4.21: Testis dokusunda immün pozitif Aktif kaspaz-3 ekspresyonunun gösterimi. A78	
Şekil 4.22: Aktif kaspaz-3 immün pozitif (+) hücre yüzdesinin değişim grafiği.	79
Şekil 4.23: TUNEL pozitif (+) hücre yüzdesinin değişim grafiği.....	80
Şekil 4.24: Testis dokusunda TUNEL pozitif ekspresyonunun gösterimi. 81	

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1 Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar	51
Tablo 3.2 İmmünohistokimyada kullanılan kimyasallar.	52
Tablo 3.3: Kullanılan cihazlar.	52
Tablo 3.4: Kullanılan sarf malzemeler	53
Tablo 3.5: Johnsen skorlaması.....	55
Tablo 3.6: Kullanılan antikörler ve dilüsyonları	58

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
HSD	: Hidroksisteroid dehidrogenaz
AKR	: Aldo-keto redüktaz
11β-HSD	: 11 β -Hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi
17β-HSD	: 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi
3α-HSD	: 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaz
20α-HSD	: 20 α -hidroksisteroid dehidrogenaz
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
LH	: Luteinizan hormon
DHAP	: Dihidroksiaseton fosfat
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
Ad	: Koyu A tipi spermatagonyum
Ap	: Soluk A tipi spermatagonyum
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
POR	: P450 oksidoredüktaz
CYP19A1	: P450 Aromataz enzimi
StAR	: Steroidogenik akut regülatör protein
CYP	: Sitokrom P450
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
MPT	: Mitokondriyal permeabilite geçiş
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive eden faktör
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
UPR	: Katlanmamış protein cevabı
DBP	: Vitamin D bağlayıcı protein
RXR	: Retinoid X reseptörü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Vitamin D Uygulamasının Testis Dokusu Üzerine Etkileri

Tuğçe ÖZBİLENLER

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman : Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

Bu çalışmada metabolik sendromun erkek infertilitesi üzerindeki etkilerini araştırmak ayrıca vitamin D uygulamasının yüksek yağ ve yüksek fruktoz içeren diyetin sebep olduğu testis hasarına, hücre proliferasyonuna ve apoptoz üzerine etkisini açıklamak için 15 hafta süresince % 17 yağ ve %17 fruktoz içeren özel yem ve %20'lik fruktozlu sudan oluşan diyet uygulamasıyla bir metabolik sendrom modeli oluşturuldu. Çalışmaya 24 adet erkek Sprague Dawley sıçan dahil edildi. Diyet içerikleri ve vitamin D uygulamasına bağlı olarak Sağlıklı kontrol (SK), Metabolik Sendrom (MS), Metabolik Sendrom + Vitamin D uygulanan (MSD) ve Sağlıklı Kontrol + Vitamin D uygulanan Grup (SKD) olmak üzere 4 farklı grup oluşturuldu. Vitamin D uygulanan gruplara 12 hafta boyunca Vitamin D takviyesi (170 IU/hafta, oral) yapıldı. Deney hayvanları 15.haftanın sonunda sakrifiye edilerek testis dokuları alındı vefikse edildikten sonra parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla 5 µm'luk kesitler alındı. Deney süresince günlük yem ve su tüketimleri ölçüldü, ayrıca ağırlık ve açlık kan glukoz ölçümleri yapıldı. Testis doku kesitlerinin morfolojik incelemesi için Hematoksilen-Eozin (HE) ve PAS (Peryodik asit-Schiff) boyama yöntemleri uygulandı. Ayrıca Aromataz, StAR, 8-OHdG, Vitamin D reseptörü (VDR), PCNA ve Aktif kaspaz-3 proteinlerine karşı oluşturulmuş primer antikorlar kullanılarak immünohistokimya yöntemi uygulandı. Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL ve serumda testosteron seviyelerinin belirlenmesi amacıyla ise ELISA yöntemleri uygulandı. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

MS grubundaki hayvanların günlük kalori alımının, ağırlık ve açlık kan glukozu değerlerinin diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanırken vitamin D'nin olası metabolik düzenleyici etkisiyle MSD grubunda kan glukozunun MS grubuna kıyasla düştüğü görüldü. Yapılan morfolojik incelemede MS grubunda seminifer tübüllerin düzensiz olduğu ve tübül çaplarının diğer gruplara kıyasla azaldığı, seminifer epitelin germ hücre kaybından kaynaklı olarak incelendiği ve bazal

membranda kalınlaşmalar meydana geldiği görüldü. Ayrıca seminifer tübüllerdeki spermatid hücre sayısında ve lümende bulunan sperm sayısında diğer gruplara kıyasla belirgin azalmalar olduğu saptandı. Vitamin D tedavisi uygulanan MS (MSD) grupta ise testis morfolojisinin MS grubuna kıyasla düzeldiği görüldü. Aromataz, 8-OHdG, Aktif kaspaz-3 ekspresyonlarının ve TUNEL pozitif apoptotik hücre sayılarının MS grubunda diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak arttığı; StAR, VDR ve PCNA ekspresyonlarının ve serum testosteron seviyelerinin ise azaldığı saptandı. Vitamin D tedavisi uygulanan grupta ise bu sonuçların sağlıklı kontrol gruplarına yaklaştığı görüldü. Ayrıca MS grubundaki hayvanların günlük kalori alımının ve açlık kan glukozu değerlerinin diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ancak vitamin D'nin olası metabolik düzenleyici etkisiyle MSD grubunda kan glukozunun MS grubuna kıyasla düştüğü görüldü.

Bu çalışmada yüksek yağ ve fruktoz içeren diyet ile oluşturulan metabolik sendromun testis yapısını bozarak erkek infertilitesinin gelişimine katkı sağladığı ve vitamin D uygulamasının bu hasarı düzelttiği sonucuna varıldı. |

Temmuz 2023 , |130| sayfa.

Anahtar kelimeler: | Metabolik sendrom, infertilite, vitamin D, aromataz |

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

EFFECTS of VİTAMİN D ADMINISTRATION on TESTİCULAR TİSSUE in METABOLİC SYNDROME RATS

Tuğçe ÖZBİLENLER

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

In this study, in order to investigate the effects of metabolic syndrome on male infertility and to explain the effect of vitamin D administration on testicular damage, cell proliferation and apoptosis induced by high fat and high fructose diet, we created a metabolic syndrome model with a special diet containing 17% fat and 17% fructose and a diet consisting of 20% fructose water for 15 weeks. Twenty-four male Sprague-Dawley rats were included in the study. Depending on the dietary contents and vitamin D administration, 4 different groups were formed as Healthy Control (SC), Metabolic Syndrome (MS), Metabolic Syndrome + Vitamin D (MSD) and Healthy Control + Vitamin D (HCV) groups. Vitamin D supplementation (170 IU/week, orally) was administered to the Vitamin D treated groups for 12 weeks. The experimental animals were sacrificed at the end of the 15th week and testicular tissues were removed. Testicular tissue samples obtained at the end of the study were fixed with 10% buffered neutral formalin and embedded in paraffin. 5 µm sections were taken with the help of a microtome. During the experiment, daily feed and water consumption were measured, and weight and fasting blood glucose were measured. Hematoxylin-Eosin (HE) and PAS (Periodic acid-Schiff) staining methods were used for morphologic examination of testicular tissue sections. In addition, immunohistochemistry was performed using primary antibodies raised against aromatase, StAR, 8-OHdG, Vitamin D receptor (VDR), PCNA and activated caspase-3 proteins. TUNEL and ELISA methods were used to determine apoptotic cells and testosterone levels in serum, respectively. All results were evaluated statistically. It was found that the daily caloric intake, weight and fasting blood glucose values of the animals in the MS group were statistically higher compared to the other groups, while blood glucose decreased in the MSD group compared to the MS group due to the possible metabolic regulatory effect of vitamin D. Morphologic examination revealed that seminiferous tubules were irregular and tubule diameters were decreased in the MS group compared to the other groups, seminiferous epithelium was thinned due to germ cell loss and thickening of the basement membrane occurred. In addition, the number of spermatid

cells in the seminiferous tubules and the number of spermatozoa in the lumen were significantly decreased compared to the other groups. Testicular morphology improved in the vitamin D-treated MS (MSD) group compared to the MS group. Aromatase, 8-OHdG, activated caspase-3 and TUNEL expressions were statistically increased in the MS group, while StAR, VDR and PCNA expressions and serum testosterone levels were statistically decreased. In this study, it was found that metabolic syndrome induced by high fat and fructose diet contributed to the development of male infertility by disrupting the testicular structure and vitamin D administration corrected this damage

July 2023, 130 pages.

Keywords: Metabolic syndrome, infertility, vitamin D, aromatase



1. GİRİŞ

Metabolik Sendrom (MS), abdominal obezite, insülin direnci, bozulmuş açlık glukozu, hipertansiyon ve dislipidemiye içeren bir dizi metabolik bozukluğu kapsar. İnsülin direnci baskın bir faktördür, vasküler ve metabolik problemlerden sorumludur (Goel ve Popa, 2018).

MS, yağlı ve şekerli beslenme yani yüksek enerji alımı, hareketsiz yaşam tarzı sonucunda ortaya çıkan obezite ile tüm dünyada giderek artan bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (Lanktree ve Hegele, 2013). Batı tarzı diyet, enerji bakımından yüksek gıdaların fazla miktarda tüketimi ile karakterizedir. Doymuş yağların ve fruktozun yüksek seviyeleri ile karakterize olan Batı tarzı diyetin tüketimi, metabolik hastalıkların gelişimine sebep olabilmektedir (Crescenzo ve diğ., 2014). Doymuş yağlar ve yüksek fruktozlu mısır şurubunu da içeren enerji bakımından yüksek olan gıdaların tüketimi insülin duyarsızlığı, dolaşımdaki yüksek trigliseritler ve artan vücut yağından dolayı kilo alımı ile karakterize edilen MS gelişmesine neden olmaktadır (Zaki ve diğ., 2018). Yağ bakımından zengin diyetle uzun süreli beslenmenin özellikle yetişkin ve hareketsiz insanlarda obezite, insülin direnci, karaciğerde lipid birikimine ve mitokondriyal düzensizliğin başlamasına neden olduğu bilinmektedir (Crescenzo ve diğ., 2014).

İnfertilite, dünya çapında çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen önemli bir sorundur. Vakaların %50'sinde erkek faktörü rol oynamaktadır. Sperm sayısındaki azalma, sperm DNA hasarındaki artışın yanı sıra uzun süreli epigenetik değişikliklerin altında yatan bir neden olarak paternal obezite karşımıza çıkmaktadır (Pearce ve diğ., 2019; Erdemir ve diğ., 2012).

Tüm steroid hormonlar diyetle alınan veya asetil CoA'dan *de novo* sentezlenen öncü kolesterolden sentezlenmektedir. Bu hormonlarının üretimi, çoğunluğu sitokrom P450 (CYP) süper ailesine ait enzimler tarafından düzenlenir. Steroid hormonlar, bağışıklık sistemi, protein ve karbonhidrat metabolizması, üreme sistemi ve cinsel özelliklerin gelişimi gibi çeşitli fizyolojik yanıtlarda görev almaktadır (Lundqvist, 2014). Testosteron, esas olarak Leydig hücrelerinde üretilir ve erkeklerdeki dolaşımdaki ana androjen olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkeklerde dolaşımdaki testosteronun yaklaşık olarak %95'inden fazlası testislerde üretilirken, çok az miktarda da olsa adrenal korteks ve periferik organlarda öncü steroidlerin dönüştürülmesiyle de üretimi bulunmaktadır (Flück ve Pandey, 2017).

Androjenler, erkek cinsiyet organlarının ve sekonder eşey özelliklerinin gelişiminden ve korunmasından sorumludur. Ergenlik döneminde testosteron, beyin maskülinizasyonunda, erkek cinsel davranışının gelişiminde, spermatogenezin başlatılmasında, desteklenmesinde ve kemik büyümesi gibi olaylarda rol almaktadır. Erkeklerde 30'lu yaşlardan itibaren testosteron üretiminin yılda %1 oranında azaldığı bilinmektedir. Obezite, diyabet ve kanser tedavilerinin serum testosteron seviyelerindeki bu düşüşü şiddetlendirerek geç başlangıçlı hipogonadizmin gelişmesine yol açtığı da bilinmektedir (Martin ve diğ., 2020).

Testosteronun kolesterolden biyosentezi, bir dizi enzimatik reaksiyon ile gerçekleşmektedir. Leydig hücresi testosteron üretimi için özelleşmiştir ve LH tarafından uyarıldığında, Leydig hücresi steroid üretimini artırmaktadır. İlk adımda, kolesterol molekülleri steroidojenik akut düzenleyici protein (STAR) tarafından iç mitokondriyal membrana taşınır ve ardından bir dizi enzimatik reaksiyon geçirir. İç mitokondriyal membranda, CYP11A1 (P450_{scc}) enzimi yardımı ile pregnenolona dönüştürür. Bir dizi sentez basamağı sonucu testosteron sentezlenir ve sentezlendikten sonra Leydig hücre membranından pasif difüzyonla interstisyel alana geçer (Flück ve Pandey, 2017).

Erkek fertilitésinin yeterince yüksek kalitede spermatozoa miktarına bağlı olduğu bilinmektedir. İnsanlar da dahil olmak üzere memeliler üzerinde yapılan çalışmalar aşırı kilonun ve fazla yağlanmanın sperm konsantrasyonunu, meni hacmini, akrozom reaksiyonunu ve sperm motilitesini etkilediğini ve bu durumun gebelik başarısının azalmasına yani infertiliteye yol açtığını göstermektedir (Verderame ve diğ., 2018). Obezite ve erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi açıklamak için çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu mekanizmada testosteronun aromatisasyonu östrojen sentezindeki önemli bir basamaktır ve aromataz enzim sistemi tarafından katalize edilmektedir (Erdemir ve diğ., 2012).

Aromataz enzimi, sitokrom p450 enzim kompleksine ait (CYP19A1) 19 karbonlu androjenlerin 18 karbonlu östrojenlere dönüşümü sırasında birbirini izleyen üç hidroksilasyon basamağını katalizleyen bir enzimdir (Lin ve diğ., 2006). Steroidogenez, steroidojenik akut düzenleyici protein aracılığı ile sitozolik kolesterolün mitokondriye girişiyle başlar. Sonrasında kolesterolün aktif östrojen olan östradiole dönüşümünde farklı enzimler rol oynar ve aromataz bu dönüşümdeki son basamağı katalizler (Flück ve Pandey, 2017).

Cohen'in (1999) sunmuş olduğu hipogonadal-obezite döngü hipotezine göre; testosteron trigliseritleri serbest yağ asitlerine parçalayan enzim olan adiposit lipoprotein lipaz

aktivitesini inhibe etmektedir. Düşük testosteron seviyeleri ise merkezi obezite ve karın içi yağ birikiminin gelişimine neden olmaktadır. Bu hipotezde, yüksek aromataz enzimi aktivitesinden kaynaklanan düşük testosteronun adipositlerin yağ birikimini artırdığı ve kademeli olarak testosteron seviyelerini daha da düşürdüğü görülmüştür (Goel ve Popa, 2018). Testosteronun östradiole dönüşümünü katalizleyen aromataz enzimi periferik yağ dokusunda yüksek oranda eksprese edilmektedir. Obez erkeklerde östrojenlerdeki artışın, yağ dokusundaki artmış aromataz aktivitesiyle birlikte artan testosteron dönüşümüne bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu periferik dönüşüm ise testosteron düzeylerinin azalmasına ve östradiol düzeylerinin artışına sebep olmaktadır (Arslan ve Akdevelioğlu, 2018). Artan östradiol düzeyleri ise HPG (hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen) eksenini inhibe ederek Hipogonadizme neden olmaktadır. Gonadotropinlerin azalması ise testosteron üretiminin uyarılmasında azalmalara sebep olur ve sonuç olarak obezitede düşük testosteron seviyeleri görülmektedir. Obeziteyle birlikte artan serbest yağ asidi birikimi ise insülin direncine sebep olmaktadır. Oluşan hiperinsülinemik durum ise, leydig hücrelerinden sentezlenen testosteron miktarının daha fazla azalmasına sebep olmaktadır (Goel ve Popa, 2018).

Vitamin D3, genel olarak kalsiyum ve fosfor homeostazının korunması ve düzenlemesinde görevlidir. Mineral metabolizması üzerindeki etkilerinin yanı sıra vitamin D3, erkek ve dişi üreme süreçlerinin düzenlenmesinde görevli endokrin hormon olarak karşımıza çıkmaktadır (Blomberg, 2012; Kinuta ve diğ., 2000). Vitamin D, bazı biyolojik fonksiyonlarını vitamin D reseptörü (VDR) aracılığı ile gerçekleştirmektedir (Prosser ve Jones, 2004). VDR erkek üreme sistemini döşeyen epitel hücrelerinde, spermatozoada, leydig hücrelerinde, germ hücrelerinde ve sertoli hücrelerinde bulunmaktadır (Blomberg ve diğ., 2010).

Aktif vitamin D lokal regülasyonunun spermatogenezis ve sperm fonksiyonları için oldukça önemli olabileceği ileri sürülmüştür. Spermdede VDR özellikle motilitenin sağlandığı boyun bölgesinde yoğun olarak bulunmaktadır ve bu durum ise sperm motilitesinde vitamin D'nin önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca vitamin D akrozom reaksiyonlarının gerçekleşmesinde de oldukça önemlidir. Tüm bu veriler erkek üremesinde vitamin D ve VDR'nin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Goel ve Popa, 2018).

Yapılan çalışmalarda vitamin D eksikliği ile androjen seviyesinin düşüklüğü arasında korelasyon görülmüş ve vitamin D eksikliğinde takviyesinin yapılmasından sonra testosteron seviyesinde düzeltilmeler olduğu görülmüştür (Yılmaz ve Seven, 2021). Yapılan tüm bu çalışmalara göre vitamin D'nin spermatogenezde oldukça önemli olduğu her ne kadar bilinse

de spermatogenezde testisteki rolü tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca VDR'nin testisteki dağılımı da henüz net olarak bilinmemektedir (Zanatta ve diğ., 2011).

1 α ,25-dihydroxy vitamin D3 erkek üremesinde oldukça önemli etkilere sahip olmasının yanı sıra aromatazin gen ekspresyonunu doku spesifik olarak değiştirdiği bilinmektedir (Lundqvist, 2014). Vitamin D, aromataz ekspresyonunun düzenleyicisidir fakat çeşitli dokularda farklı promotörlerin aktivitesi nedeniyle dokuya özgüdür (Blomberg, 2012). Yapılan çalışmalarda 1 α ,25-dihydroxy vitamin D3'ün plasental hücrelerde, prostat hücrelerinde ve osteoblastlarda aromataz aktivitesini değiştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca meme kanseri hücre soylarında vitamin D tedavisi aromataz gen ekspresyonunu azaltırken, aynı tedavinin osteosarkoma hücre soyunda aromataz gen ekspresyonunu artırdığı görölmüştür. 1 α ,25-Dihidroksivitamin D3'ün bu nedenle doku seçici bir aromataz modölatörü olduğu öne sürölmüştür (Flück ve Pandey, 2017).

Obezite ile ilgili diğer olası mekanizma ise oksidatif strestir. Yapılan bazı çalışmalarda obezite olgularında metabolik sendromun veya hiperlipidemi gibi bileşenlerinden birinin oksidatif strese neden olabileceği gösterilmiştir. Oksidatif stres, yaygın olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen oksijen ve oksijen türevli oksidanların neden olduğu artan hücresel hasar oranı ile ilişkilidir. ROS'un ana hedefi ise membran lipidleridir ve lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır (Erdemir ve diğ., 2011).

Erkek üreme sağlığıyla ilgili yapılan birçok çalışmada oksidatif stresin sperm motilitesinde ve sperm-oosit etkileşimindeki bozulmayla birlikte sperm membran peroksidasyonuna sebep olduğu ortaya konulmuştur. Bunun sebebinin ise testis dokularının ve spermilerin ROS'a ve lipid peroksidasyonuna karşı çok duyarlı olduğundan kaynaklandığı öne sürölmektedir. Testis dokularının oksidasyona duyarlılığı ise sperm membranının oldukça zengin çoklu doymamış yağ asidi içeriğine bağlanmıştır (Erdemir ve diğ., 2011). Adiposit inflamasyonu ve oksidatif stres obezite ile ilgili komplikasyonların gelişiminde oldukça önemli olarak karşımıza çıkmaktadır. Sperm DNA'sı da yüksek yağlı diyetin neden olduğu oksidatif strese karşı oldukça hassastır ve bu durum ise DNA fragmantasyonunun artmasına ve sonucunda da infertiliteye yol açmaktadır (Verderame ve diğ., 2018).

8-Hidroksi-2-deoksi-guanozin(8-OHdG), DNA'daki oksidatif hasarın bir yan ürünü olarak bilinmektedir. Deoksiguanozinin oksidasyonuyla üretilen DNA baz modifikasyonunun bir ürünü olan 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının en duyarlı ve kullanışlı belirteci olarak

karşımıza çıkmaktadır (Butkowski ve diğ., 2016). DNA hasarı ile 7,8-dihidro-8-oksoguanin(8-okso-Gua) oluşur. DNA'daki 8-okso-Gua mutajenik olduğu için baz ekzisyon onarım mekanizmasıyla elimine edilir ve bu süreçte 8-OHdG üretilir. Bu nedenle 8-OHdG, çeşitli hastalıklarda oksidatif hasarın biyobelirteci olarak sıklıkla kullanılır, idrar veya kanda kolaylıkla ölçülebilir (Butkowski ve diğ., 2016; Korkmaz ve diğ., 2018).

ROS'un oluşumu ve birikmesi DNA'da oksidatif hasara yol açabilmektedir. Bu durum ise DNA ve protein ile ilgili patolojileri beraberinde getirebilmektedir. Bu nedenle, 8-OHdG seviyelerindeki değişikliklerin biyolojik önemi, çok çeşitli hastalıklarda incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda inflamatuvar bağırsak hastalığı ve Tip 2 diyabet için inflamasyonda oksidatif hasarın uyarıcı bir rolü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, oksidatif hasar yaşlanmada aktif bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, 8-OHdG yapılan bazı çalışmalarda yaşa bağlı hasar birikiminin potansiyel bir belirteci olarak araştırılmıştır (Korkmaz ve diğ., 2018). Tüm bu veriler göz önüne alındığında biz de bu çalışmamızda, metabolik sendrom sonucu oluşan oksidatif stres ile birlikte ortaya çıkan DNA hasarını göstermek için 8-OHdG ekspresyonunu göstermeyi amaçladık.

Testisteki germ hücrelerinin dinamikleri ise, hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki dengeyle düzenlenmektedir. Yapılan çalışmalarda yaşa bağlı proliferasyon ve apoptoz dengesizliğinin erkek kısırlığına yol açtığı gösterilmiştir. Apoptoz, ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır ve bu artış ise testis fonksiyonlarının azalmasına neden olmaktadır. Vitamin D3 tedavisinin, yaşlı hayvanların testislerindeki apoptozu azaltırken, germ hücre proliferasyonunu arttığı yapılan bazı çalışmalarda görülmüştür. Yaşlanmayla birlikte D vitamini sentezinin azalması veya eksikliğinin erkeklerde semen kalitesinin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada D vitamini eksikliğinin testiküler germ hücre proliferasyonunu inhibe ederek testis gelişimini ve spermatogenezi bozduğu gösterilmiştir (Jeremy ve diğ., 2019).

Tüm bu verilerden yola çıkarak bizde yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyet ile metabolik sendrom modeli oluşturulan sıçanlarda, vitamin D uygulamasının testis dokusunun morfolojisi ve steroidogenez üzerine olan etkilerini inceleyeceğiz. Ayrıca bu sıçanlara vitamin D uygulamasının testis dokusunda hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine etkisine açıklık getirmeyi de amaçlamaktayız.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. TESTİS ANATOMİSİ

Erkek üreme sistemi testislerden, genital boşaltım kanallarından, veziküla seminalis, prostat ve bulboüretral bezlerin de dahil olduğu aksesuar cinsiyet bezlerinden ve penisten oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2010; Kalthur ve Kalthur, 2016). Erkek üreme sisteminin temel olarak iki ana işlevi bulunmaktadır. Bunlar spermatozoa olarak bilinen erkek gamet hücrelerinin üretimi ve erkek gamet hücrelerinin dişi üreme sistemine iletilmesidir (Kalthur ve Kalthur, 2016). Yetişkin bir erkeğin 4-5 cm uzunluğunda, 3 cm genişliğinde ve 2.5 cm kalınlığında, her biri yaklaşık 10-15 gr ağırlığında olan bir çift testisi bulunmaktadır (Johnson, 2012).

Testislerin esas olarak iki ana işlevi bulunmaktadır: Olgun spermatozoa (spermatogenez) ve testosteron (steroidogenez) gibi erkek cinsiyet hormonlarının üretimidir (Steger ve Weidner, 2011). Testisler, spermatozoa ve androjenik hormonlar ürettikleri için ekzokrin ve endokrin sistemlerinin bir parçası halindedir (Steger ve Weidner, 2011). Ayrıca her iki testis fonksiyonu da hipotalamik-hipofiz ekseninin kontrolü altındadır (Clement ve Giuliano, 2015).

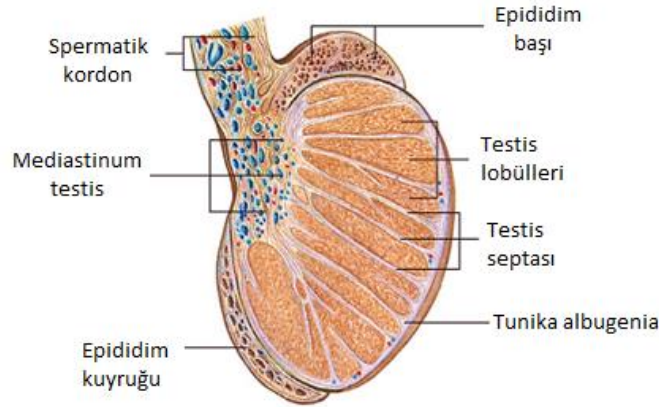
Her bir testis anterior abdominal duvarın tabakalarıyla devamlılık gösteren ve skrotumun içerisine uzanan uzun bir muskulofasiyal kesenin ucunda asılı halde bulunur (Ross ve Pawlina, 2010). Gelişimin ilk aşamasında testisler abdomenin posterior duvarında gelişirler ve daha sonra ise skrotum kesesinin içine yerleşirler (Ross ve Pawlina, 2010; Steger ve Weidner, 2011). Kadınlarda labia majora ile homolog olan skrotum, 36.7°C'nin üzerindeki sıcaklıklar sperm sayısına zarar verdiğinden, testisi yaklaşık 34.4°C'de tutar (Steger ve Weidner, 2011). Bu düşük sıcaklık spermatogenezin gerçekleşmesi için gereklidir. Eğer testisler daha yüksek sıcaklıkta tutulursa ya da skrotuma inemezlerse sperm üretimi gerçekleşmez (Ross ve Pawlina, 2010).

2.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Testis, üç tabakalı bir kapsül ile çevrelenmektedir. Sırasıyla en dışta mezotelyal hücrelerden oluşan tunika vaginalis, orta kısımda kollajen ve düz kas hücreleri içeren kalın ve sıkı bağ dokusu yapısında olan tunika albuginea ve iç kısım ise gevşek bir bağ dokusuna gömülü kan damarlarını içeren tunika vaskülozadan oluşmaktadır (Creasy ve Chapin ,2013). Tunika albugenia testisin posterior yüzeyi boyunca mediastinum testisi oluşturmak üzere kalınlaşır. Kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları testise giriş ve çıkışta mediastinumun içinden geçerler (Ross ve Pawlina, 2010; Kalthur ve Kalthur, 2016). Her bir testis kapsülünden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından 250-300 lobüle bölünmüştür. Her bir lobül, sayısı 1-4 arasında değişen yüksek derecede kıvrımlı seminifer tübülleri ve Leydig hücrelerini içermektedir. Genel olarak, insan testisi yaklaşık olarak 600 seminifer tübül içermektedir (Weinbauer ve diğ. ,2010). Seminifer tübüllerin çapı ise 180-200 mm arasında değişkenlik göstermektedir (Steger ve Weidner, 2011).

Seminifer tübüller, tunika propria tarafından çevrelenmiş bir seminifer epitelden meydana gelmektedirler. Seminifer epitel iki temel hücre popülasyonundan oluşan kompleks, çok katlı bir epitelidir. Destek hücreleri olarak bilinen Sertoli hücreleri ve olgun sperme farklılaşacak olan Spermatogenik hücreler epiteli oluşturan hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2010). Tübüller arasında ise spermatogenezi ve sperm üretimini uyaran erkek cinsiyet hormonu olan testosteronu üreten Leydig hücreleri bulunmaktadır (Steger ve Weidner, 2011).

Spermatogenez (spermatozoa üretimi) ve steroidogenez (testosteron üretimi) morfolojik ve fonksiyonel olarak birbirinden ayırt edilebilen iki bölmede gerçekleşir. Spermatogenez seminifer tübüllerde (tübülar kompartman), steroidogenez ise seminifer tübüller arasındaki interstisyel bölmede (interstisyel kompartman) gerçekleşmektedir (Weinbauer ve diğ., 2010).



Şekil 2.1: Testis enine kesiti (Clement ve Giuliano, 2015).

İnterstisyel Kompartman'ın en önemli hücreleri Leydig hücreleridir. Bu hücreler testiküler testosteronun ve insülin benzeri faktör 3'ün (INSL3) kaynağıdır. İnterstisyel bölme ayrıca bağışıklık hücreleri, kan ve lenf damarları, sinirler, fibroblastlar ve gevşek bağ dokusunu içerir. Deney hayvanlarında interstisyel bölme toplam testis hacminin yaklaşık olarak %2,6' sını oluştururken, insan testislerinde bu oran ise yaklaşık olarak %12-15 arasında değişkenlik göstermektedir (Weinbauer ve diğ., 2010).

Leydig Hücreleri ilk olarak 1850'de Franz Leydig (1821-1908) tarafından tanımlanmıştır (Ge ve Hardy, 2007). Leydig hücreleri büyük, poligonal, eozinofilik hücrelerdir ve tipik olarak lipid damlacıkları içerirler (Ross ve Pawlina, 2010). Leydig hücreleri androjen steroid üretiminin çoğundan sorumludur (Kaler ve Neaves, 1978). Bu hücreler erkek fetusun erken farklılaşmasında aktiftir ve bu dönemdeki testosteronun salgılanması embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için gereklidir. Leydig hücreleri fetal hayatın yaklaşık 5. ayından başlayarak inaktif oldukları bir periyoda girerler. Puberte döneminde ise gonadotropik stimülasyonla birlikte yeniden androjen salgılayan hücreler olurlar ve yaşam boyunca aktif kalırlar (Ross ve Pawlina, 2010). Bu hücrelerinin fonksiyonu ise, hipofiz hormonları, seminifer tübüllerdeki hücreler tarafından salgılanan parakrin faktörleri ve otheregülasyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir (Costabile, 2013).

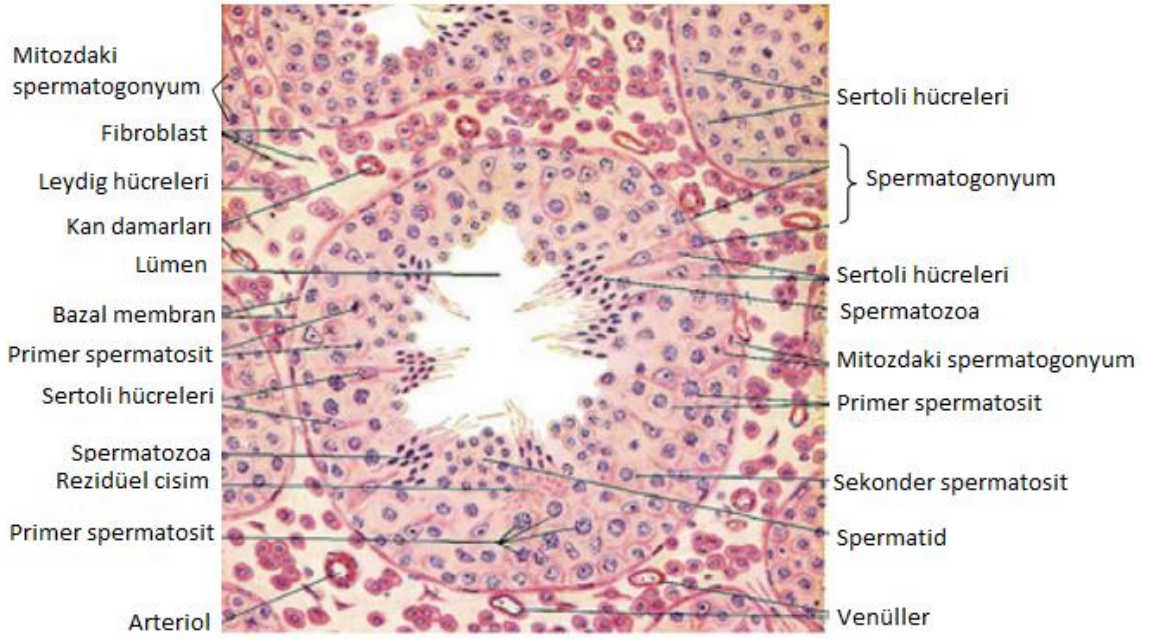
Leydig hücrelerinin yanı sıra, interstisyel bölme ayrıca makrofajlar ve lenfositler gibi bağışıklık sistemine ait hücreleri de içermektedir (Weinbauer ve diğ., 2010). Makrofajların Leydig hücrelerinin işlevini, özellikle proliferasyonlarını, farklılaşmalarını ve steroid üretimini, sitokinlerin salgılanması yoluyla etkilediği tahmin edilmektedir (Hales, 2007).

Tübüler Kompartman ise toplam testis hacminin yaklaşık olarak %60-80'ini oluşturmaktadır. Spermatogenez, tübüler bölümde (seminifer tübüllerde) gerçekleşmektedir. Bu kompartman germ hücrelerini (spermatogonyumlar, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatid), peritübüler hücreleri ve Sertoli hücrelerini içerir (Weinbauer ve diğ., 2010).

Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde bulunan destek hücreleridir (Griswold, 1998; Kalthur ve Kalthur, 2016). Adını, bu hücreleri 1865'te ilk kez tanımlayan İtalyan bilim adamı Enrico Sertoli'den (1842-1910) almıştır (Weinbauer ve diğ., 2010). Germinal epitel hacminin yaklaşık %35-40'ı Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır (Weinbauer ve diğ., 2010). Bu hücreler komşu spermatogenik hücreleri çevreleyen ve onların arasındaki boşlukları dolduran yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2010). Bu hücreler germinal epitel içinde yer alan somatik hücrelerdir ve yetişkinlikte bu hücreler mitotik olarak inaktif halde bulunur (Weinbauer ve diğ., 2010).

Sertoli hücrelerinin, germ hücrelerinin olgunlaşmasını kolaylaştıran pek çok farklı işlevi bulunmaktadır. İlk olarak, germ hücrelerinin üzerinde geliştiği ve tübül lümenine doğru göç ettiği fiziksel iskele görevi görürler (Costabile, 2013). Seminifer tübülü bazal ve adluminal bölmeye ayıran kan-testis bariyerini oluşturmak için bu hücreler sıkı bağlantılarla (*tight junction*) birbirine bağlanırlar (Griswold, 1998; Costabile, 2013) ve germ hücre olgunlaşması için gerekli olan mikro ortamı yaratırlar (Costabile, 2013). Ayrıca sertoli hücreleri, testosterona bağlanan ve testosteronu konsantre eden testis sıvısı ve androjen bağlayıcı protein de üretirler (Griswold 1998; Kalthur ve Kalthur, 2016). Bu ayırt edici işlevler aynı zamanda fagositoz, sıvı salgılanması ve çeşitli moleküllerin üretimini de kapsamaktadır (Costabile, 2013). Bu hücrelerinin bir diğer önemli işlevi de erişkinde son testis hacminden ve sperm üretiminden sorumlu olmalarıdır (Weinbauer ve diğ. 2010).

Seminifer tübüller, bir bazal membran, kollajen tabakası ve peritübüler hücrelerden oluşan bir lamina propria ile kaplıdır. Bu hücreler tübülün etrafında katmanlaşır ve kolajen katmanlarıyla ayrılan eşmerkezli katmanları oluşturur (Weinbauer ve diğ., 2010). Peritübüler hücreler, desmin, gelsolin, aktin ve miyozin gibi hücresel kasılma ile ilgili çeşitli faktörleri üretirler (Holstein ve diğ., 1996; Weinbauer ve diğ., 2010).



Şekil 2.2: Testis histolojik gösterimi (di Fiore,1981).

2.3. SPERMATOGENEZ

Spermatogenez, spermatogonyumdan sperm gelişim sürecidir. Puberteden kısa bir süre önce pitüiter gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisi ile başlar ve yaşam boyunca devam eder (Ross ve Pawlina,2010). Spermatogenez, seminifer epitel içinde meydana gelen, tamamen farklılaşmış haploid ve hareketli spermilerin gelişimi ile sonuçlanan hücre farklılaşması sürecidir (Clermont, 1972; Costabile, 2013, Steger ve Weidner, 2011).

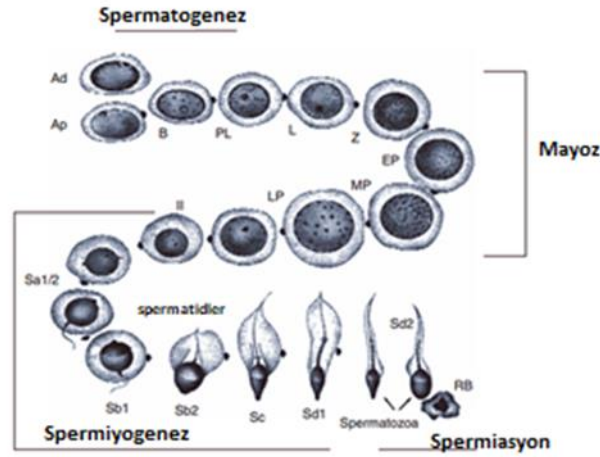
Spermatogenez 3 faza ayrılmaktadır: Spermatogonyal fazda spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek kendi yerlerine geçecek hücreleri oluştururken, primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyumları da oluştururlar (Ross ve Pawlina, 2010). Olgunlaşmamış germ hücreleri olan spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazal membranı boyunca konumlanmıştır (Clermont, 1972; Costabile, 2013; Kalthur ve Kalthur, 2016; Rooij ve Russell, 2000). Nükleer boyutlarına ve kromatin yapılarına göre koyu A tipi (Ad), soluk A tipi (Ap) ve B tipi hücreler olarak sınıflandırılırlar (Kalthur ve Kalthur, 2016; Rooij ve Russell 2000; Costabile, 2013). Androjenlerin kontrolü altındaki Ad hücrelerinin mitotik olarak bölünmesiyle spermatogonial hücre popülasyonu korunurken, Ap hücrelerinin bölünmesiyle ise spermatogenik döngüye giren B tipi hücrelerin öncülerini oluşturduğu bilinmektedir (Kalthur ve Kalthur, 2016; Rooij

ve Russell, 2000). Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi ise primer spermatositleri üretir (Ross ve Pawlina, 2010).

Spermatosit fazında (mayoz) primer spermatositler iki mayotik bölünmeye uğrayarak kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını azaltırlar ve spermatid adı verilen haploid hücreleri oluştururlar (Ross ve Pawlina, 2010). Birinci mayoz bölünme sırasında, bir primer spermatosit, iki sekonder spermatosit oluşmasına neden olurken, ikinci mayoz bölünmeyle birlikte iki sekonder spermatositin her biri iki yuvarlak spermatid meydana getirir (Steger ve Weidner, 2011).

Spermiyogenez fazında ise yuvarlak spermatidler artık bölünemez ve çok sayıda morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik modifikasyona uğrayan olgun spermatozoalara farklılaşır (Steger ve Weidner, 2011). Spermatidler bu süreçte bir dizi sitoplazmik ve nükleer değişikliğe uğrarlar (Kalthur ve Kalthur, 2016; Rooij ve Russell, 2000). Nükleer kromatin yoğunlaşması, akrozom gelişimi ve kamçı oluşumu haploid spermatidlerde aynı anda meydana gelir (Steger ve Weidner, 2011). Spermatogenez, kök hücrelerin bölünmesiyle başlar ve olgun sperm oluşumu ile sona ermektedir (Weinbauer ve diğ., 2010).

İkinci mayotik bölünmenin sonucunda oluşan her spermatid DNA içeriği olarak haploiddir. Haploid spermatidler, olgun spermi oluşturan bir farklılaşma sürecine uğrarlar. Oluşan olgun sperm de haploid durumdadır ancak oositi fertilize ettiği zaman diploid durum yeniden oluşur (Ross ve Pawlina, 2010). Son olarak, işlevsel olarak olgunlaşmış spermatozoa, spermiasyon adı verilen bir süreçle seminifer tübül duvarından lümene salınır (Kalthur ve Kalthur, 2016; Rooij ve Russell, 2000).



Şekil 2.3: İnsan seminifer epitelinde bulunan germ hücre tiplerinin şematik gösterimi (Weinbauer ve diğ., 2010).

(A-koyu spermatogonyum, Ap: A-soluk spermatogonyum, PI: preleptoten spermatositler, L: leptoten spermatositler, EP: erken pakiten spermatositleri, MP: orta pakiten spermatositleri, LP: geç pakiten spermatositleri, II: 2.mayotik bölünme, RB: residüel cisim, Sa1-Sd2: gelişimsel spermatid olgunlaşma aşamaları)

2.4. STEROİDOGENEZ

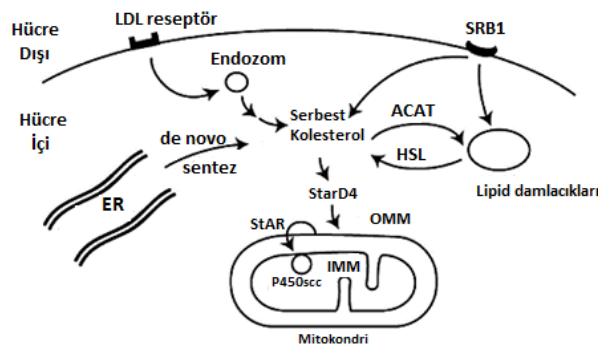
Steroidogenez, kolesterolü steroid hormon ürünlerine dönüştüren çok adımlı bir süreçtir. Steroidogenez, lipid damlacıklarından veya plazma membranından kolesterol alımı, kolesterolün mitokondriye taşınması, mitokondride pregnenolon oluşumu ve pregnenolonun düz yüzlü endoplazmik retikulum tarafından steroid ürünlerine dönüştürülmesi adımlarından oluşmaktadır (Aghazadeh ve diğ., 2015).

Tüm steroid hormonlar, dört konjuge halkadan oluşan siklopentanoperhidrofenantren yapısı içerirken, spesifik etkileri hidroksil, keto ve asil fonksiyonel gruplarının kombinasyonu ile belirlenmektedir. Steroid hormonlar, metabolizmanın sürdürülmesi, sıcaklık ve su/tuz homeostazı, inflamatuvar yanıt ve kas kasılması gibi birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde yer almaktadır. Steroidogenez tropik hormonlar tarafından tetiklenmektedir. İnsanlarda steroid türevli hormonlar olan mineralokortikoidler (deoksikortikosteron, aldosteron) ve glukokortikoidler (kortikosteron, kortizol) adrenal kortekste sentezlenirken, seks hormonları ise erkeklerde testislerdeki Leydig hücrelerinde, kadınlarda ise folikül hücrelerinde ve korpus luteumda sentezlenmektedir (Tugaeva ve Sluchanko, 2019).

Steroidogenik dokularda yeterli seviyelerde steroid hormon sentezi sağlamak için, substrat olarak kolesterol kaynağı gereklidir. Bu kolesterolün kaynakları, farklı türler arasında ve hatta aynı tür içindeki farklı steroidogenik dokular arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Steroidogenik hücreler, hücre içinde *de novo* kolesterol biyosentezinden, lipoprotein türevli kolesterol esterlerinden ve lipid damlacıklarında depolanan kolesterol esterlerinin hidrolizinden olmak üzere üç farklı kaynaktan kolesterole erişebilmektedir (Stocco ve diğ., 2006; Manna ve diğ., 2016).

Steroidogenik hücreler, kolesterolü asetattan *de novo* sentezleyebilirler, ancak kolesterol tedariklerinin çoğu diyetten türetilen düşük yoğunluklu lipoproteinlerden (LDL) reseptör aracılı endositoz yoluyla gelmektedir (Bremer ve Walter, 2014; Martin ve Touaibia, 2020; Miller ve Auchus, 2011). Steroidogenez için kolesterol kaynağının katkısı, hücre tipine, fizyolojik durumuna ve mevcudiyetine göre değişmektedir. Normal fizyolojik koşullar altında Leydig hücreleri esas olarak testosteron sentezi için endojen kolesterol kullanmaktadır (Eacker ve diğ., 2008; Martin ve Touaibia, 2020)

Steroidogenez boyunca mitokondriyal zarı kolesterol taşınmasında önemli rollere sahip iki protein tanımlanmıştır. Bu proteinler steroid üreten dokuların dış mitokondriyal membranlarında yüksek seviyelerde bulunan ve yüksek afiniteye sahip kolesterol bağlayıcı protein olan periferik tip benzodiazepin reseptörü (PBR) ile mitokondriyal sinyal dizisi taşıyan ve kolesterolün dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana transferinde görevli olan steroidogenik akut düzenleyici protein (StAR)'dır. PBR mitokondri dış zarında lokalizedir ve kolesterolün mitokondriye girişi için bir kapı görevi görürken (Klaunig ve diğ., 2003), StAR ise kolesterol taşınmasını başlatıcı moleküldür (Payne ve Hardy, 2007).



Şekil 2.4: Hücre içi kolesterol kullanımı (Walter ve Richard, 2011).

(LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein; SRB1: çöpçü reseptör sınıf B tip 1; ACAT: asil-koenzim A: kolesterol asiltransferaz; HSL: hormona duyarlı lipaz; OMM: dış mitokondriyal membran; IMM: iç mitokondriyal membran; StAR: steroidogenik akut düzenleyici protein; StarD4: StAR ile ilişkili lipid transfer domain 4; P450scc: sitokrom P450 Yan Zincir Kırıcı Enzim.)

Steroidogenezde birçok enzim doğrudan yer almaktadır ve bu görevli enzimler *sitokrom P450* hem içeren proteinler ve hidroksisteroid dehidrogenazlar (HSD'ler) olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. *Sitokrom P450 hem içeren proteinler*; sitokrom P450 Yan Zincir Kırıcı Enzim (P450_{sc}; CYP11A1), sitokrom P450 17 α -hidroksilaz C17-C20 liyaz (P450_{c17}; CYP17) ve sitokrom P450 aromataz (P450_{arom}; CYP19A1) enzimlerini içermektedir. Hidroksisteroid dehidrogenazlar ise 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β -HSD) ve 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz/ketosteroid redüktaz (17 β -HSD/KSR) enzimlerini içermektedir (Payne ve Hardy, 2007; Bremer ve Miller, 2014).

2.4.1. Sitokrom P450 (CYP) Enzimleri

Steroidogenik enzimlerin birçoğu, yaklaşık 500 amino asit ve tek bir hem grubu içeren bir grup oksidatif enzim için genel bir terim olan sitokrom P450 enzim grubunun üyeleridir. Bu enzimler, indirgenmiş hallerinde ışığı 450 nm'de soğurdukları için P450 olarak adlandırılmaktadırlar (Bremer ve Miller, 2014; Miller ve Auchus, 2011)

İnsan genomunda bu enzimleri kodlayan 57 adet Sitokrom P450 (CYP) geni bulunmaktadır. Bu genlerden 7 tanesi mitokondriyi hedef alan ve "Tip 1" olarak adlandırılan P450 enzimlerini kodlarken, diğer 50'si ise endoplazmik retikulumu hedefleyen ve "Tip 2" olarak adlandırılan P450 enzimlerini kodlar. Her bir P450 enzimi, geniş bir oksidasyon dizisini katalize ederek birden fazla substratı metabolize edebilmektedir (Chung ve diğ., 1986; Miller ve Auchus, 2011)

Bu iki tip P450 enzimi, hücre içi konumlarının yanı sıra NADPH'dan elektron alma mekanizmalarıyla da birbirinden biyokimyasal olarak ayırt edilebilmektedir. Tip 1 enzimler, elektronları NADPH'den ferredoksin redüktaz adı verilen bir flavoprotein ve ferredoksin adı verilen küçük bir demir-kükürt proteini yoluyla alırken, Tip 2 P450 enzimleri ise, P450 oksidoredüktaz (POR) olarak adlandırılan tek bir 2-flavin proteini aracılığıyla NADPH'den elektronları almaktadır (Chung, 1986; Miller ve Auchus, 2011).

Sitokrom P450 Yan Zincir Kırıcı Enzim (P450_{sc}; CYP11A1), sitokrom P450 17 α -hidroksilaz C17-C20 liyaz (P450_{c17}; CYP17) ve sitokrom P450 aromataz (P450_{arom}; CYP19A1) Sitokrom P450 hem içeren proteinler sınıfına ait olan enzimlerdir (Kotula ve diğ., 2012).

Bu iç steroidogenik CYP'nin her biri, çok adımlı reaksiyonları katalize etmektedir. CYP11A1, üç ardışık monooksijenasyon reaksiyonuyla, 22-hidroksilasyon, 20-hidroksilasyon

ve C22-C20 bağı kırılmasında kolesterolün pregnenolona dönüşümünü katalize ederken, (Pikuleva, 2006; Storbeck ve diğ., 2007). CYP17A1 ise iki farklı androjen dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedion üretiminde iki farklı reaksiyonu katalize eder (Miller, 2002; Nakajin ve diğ., 1981). Dehidroepiandrosteron (DHEA) üretimi sadece CYP17A1 gerektirirken, androstenedion üretimi ek olarak 3β -HSD enzim aktivitesini de gerektirmektedir. CYP11A1 tarafından üretilen pregnenolon, CYP17A1 için substrat görevi görür ve hidroksilasyon reaksiyonu ile 17OH-pregnenolona dönüştürülür ve ardından iki aşamalı işlem olan 17,20-liyaz reaksiyonu ile DHEA üretilir. Diğer androjen olan androstenedion ise, CYP17A1 tarafından katalize edilen 17α -hidroksilasyon ve 17,20-liyaz reaksiyonlarının ve 3β -HSD tarafından katalize edilen 3β -dehidrojenasyon reaksiyonunun bir kombinasyonu ile pregnenolondan veya progesterondan üretilir. Aromataz (CYP19A1) enzimi ise, omurgalılarda altı üyeli bir halkayı aromataz edebilen tek enzim olması bakımından diğerlerinden oldukça farklıdır. CYP19A1, androstenedion, testosteron ve 16α OH-testosteron androjen substratlarından sırasıyla üç farklı östrojen olan östron, 17α -östradiol ve $17\beta,16\alpha$ -östriol üretiminde yer alır (Goldstone ve ark. 2016).

2.4.2. Hidroksisteroid Dehidrogenaz (HSD) Enzimleri

Moleküler ağırlığı 35-45 kDa olan, hem grubu içermeyen ve kofaktör olarak Nikotin Adenin Dinükleotid veya Nikotin Adenin Dinükleotid Fosfat (NADH/NAD veya NADPH/NADP)'a ihtiyaç duyan enzimlerdir (Miller ve Auchus, 2011). Hidroksisteroid dehidrogenazlar (HSD'ler), steroid hormonlarının biyosentezinde ve inaktivasyonunda önemli rollere sahip enzimlerdir. Steroidogenik dokularda androjen, östrojen ve progesteron biyosentezindeki son adımları katalize etmektedirler (Penning, 1997).

Bu enzimler yapılarına göre kısa zincirli dehidrogenaz/redüktaz (SDR) ailesi ve aldo-keto redüktaz (AKR) ailesi olmak üzere iki gruba ayrılır (Miller ve Auchus, 2011; Auchus ve Miller, 2016). SDR ailesi, 3β -HSD/ketosteroid izomeraz (3β -HSD/KSI), 11β -HSD (11β -Hidroksisteroid dehidrogenaz) ve 17β -HSD (17β -hidroksisteroid dehidrogenaz) enzimlerini içerirken, 3α -HSD (3α -hidroksisteroid dehidrogenaz) ve 20α -HSD (20α -hidroksisteroid dehidrogenaz) ise AKR ailesine ait enzimlerdir. 3β -HSD enzimi sırasıyla pregnenolon, 17α -hidroksipregnenolon ve dehidroepiandrosteronun progesteron, 17α -hidroksiprogesteron ve androstenediona dönüşümünü katalizler. 20α -HSD'ler, progesteronun 20α -hidroksiprogesterona dönüşümünü ve 17β -HSD'ler ise 17β -hidroksil steroidler ile 17 -

ketoandrojenler ve östrojenler arasındaki karşılıklı dönüşümü katalize etmektedir (Ye ve diğ., 2014).

Steroidogenik Akut Düzenleyici Protein (StAR)

StAR, steroidogenik hücrelerde bulunan, cAMP'ye yanıt olarak 37kDa'lık mitokondriyal sinyal dizisi içeren bir öncü proteinden sentezlenen ve çok kısa yarı ömre sahip olan 30-kDa'lık bir fosfoproteindir (Payne ve Hardy, 2007)

Steroidogenezdeki ilk adım mitokondride gerçekleşmektedir. StAR ise adrenal bezlerde ve gonadlarda steroid sentezinin ilk aşaması için gerekli olan kolesterolün dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana transferinde görev almaktadır (Miller ve Auchus, 2011; Rajakumar ve Senthilkumaran, 2020).

Çeşitli klasik (adrenal ve gonadal) ve klasik olmayan olmayan (glial ve deri) steroidogenik dokularda StAR protein sentezi ve steroidlerin sentezi arasında sıkı bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Manna, 2009; Miller, 2011; Miller, 2013).

StAR, çoğu metazoan organizmada bulunan StAR-ilişkili lipid transfer (STAR-T) domainine sahip protein ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. İnsan genomu lipidleri bağlamada ve bunların hücre içi transferine aracılık etmede rol oynadığı görülen STAR-T domainine sahip proteinlerin 15 adetini kodlamaktadır (Miller ve Auchus, 2011).

Yapılan çalışmalarda, StAR ekspresyonunun transkripsiyonel veya translasyonel inhibisyonu gerçekleştiğinde steroid sentezinde belirgin bir azalmanın olduğu ancak tamamen ortadan kalkmadığı görülmüştür. Bu durum, StAR'a ek olarak diğer proteinlerin de kolesterolün mitokondriyal taşınmasında etkili olduğunu göstermektedir (Manna ve diğ., 2016).

Ancak StAR genindeki mutasyonlar sonucu, adrenal ve gonadal steroid sentezinin ciddi şekilde bozulmasıyla karakterize, otozomal resesif bir hastalık olan lipoid konjenital adrenal hiperplazi hastalığı gelişmektedir (Andric ve diğ., 2000; Payne ve Hardy, 2007). Bu hastalık doğuştan gelen steroid hormon biyosentezi hatası ile karakterizedir. Bu durum ise yenidoğan bebeğin steroidleri neredeyse tamamen sentezleyememesine, glukokortikoid ve mineralokortikoid eksikliklerinin bir sonucu olarak da doğumdan kısa bir süre sonra ölümüne sebep olmaktadır (Manna ve diğ., 2016).

Sitokrom P450 Aromataz (P450arom; CYP19)

Aromataz (CYP19A1), tüm omurgalı türlerinde androjenlerden (C19 steroidler), östrojenlerin (C18 steroidler) biyosentezinde önemli rol oynayan bir mikrozomal sitokrom P450 enzimidir (Miller ve Auchus, 2011). Bu enzim, 15q21.1 kromozomu üzerinde bulunan CYP19A1 geninin ürünüdür (Bremer ve Miller, 2014; Miller ve Auchus, 2011) ve flavoprotein NADPH-sitokrom P450 redüktaz ile birlikte aromataz enzim kompleksini oluşturur. (Stocco ve Michael, 2006).

Sitokrom P450 gen ailesinin bir üyesi olan aromataz yaklaşık olarak 58 kDa boyutundadır ve yüksek oranda korunmuş bir hem bağlama bölgesinin yanı sıra, bir substrat bağlama bölgesi de içermektedir (Stocco ve Michael, 2006). Diğer steroidogenik enzimlerin aksine, CYP19'u kodlayan sadece bir gen vardır (Terashima ve diğ., 1991) ve bu Aromataz geni 9 coding ekzondan ve insan söz konusu olduğunda ise dokuz ek noncoding ekzondan oluşmaktadır (Sebastian ve Bulun, 2001). Bu oldukça karmaşık gen yapısı dokuya özgü promotörler ve farklı dokulardaki alternatif splicing mekanizmaları tarafından düzenlenmektedir (Means ve diğ., 1989; Toda ve diğ., 1990).

Aromataz enzim ekspresyonu, ovaryum ve testis gibi steroidogenik dokularda ve yağ, kemik, beyin gibi steroid sentezi yapmayan çeşitli dokularda görülmektedir (Miller ve Auchus, 2011). Testis, testosteronun yanı sıra aynı zamanda östrojen kaynağıdır. Bu steroid, aromatazın etkisiyle testiste bulunan androjenlerden sentezlenebilmektedir (Stocco ve Michael, 2006). Aromatazın testisteki ekspresyonu Leydig, Sertoli ve germ hücreleri olmak üzere çeşitli hücrelerde meydana gelmektedir (Pierrepont ve diğ., 1966; Nitta ve diğ., 1993). Bu ekspresyonun ise çeşitli hayvan türlerine ve bu türlerin yaşına göre değiştiği, ancak birçok erişkin memeli türünde aromataz ekspresyonunun büyük kısmının Leydig hücrelerinde meydana geldiği bilinmektedir (Stocco ve Michael, 2006).

Aromatazın farklı gelişim aşamalarında önemli biyolojik etkileri vardır. Örneğin, fetal kökenli plasentadaki aromataz ekspresyonu, anneyi gebelik sırasında fetal adrenal androjenlerin virilize edici etkilerinden korurken, ergenlik döneminde ise östrojene bağlı meme gelişiminde, uterus büyümesinde, kemik mineralizasyonunda ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde etkileri bulunmaktadır (Lin ve diğ., 2007). Yapılan çalışmalarda aromataz eksikliği olan erkeklerde uzun boy, gecikmiş epifiz olgunlaşması ve östrojen replasmanı ile hızla tersine çevrilen osteopeni görülmüş, bu da epifiz olgunlaşmasından birincil olarak testosteronun değil östrojenin sorumlu olduğunu göstermektedir (Miller ve Auchus 2011; Bremer ve Miller, 2014).

2.4.3. Testosteron Biyosentezi

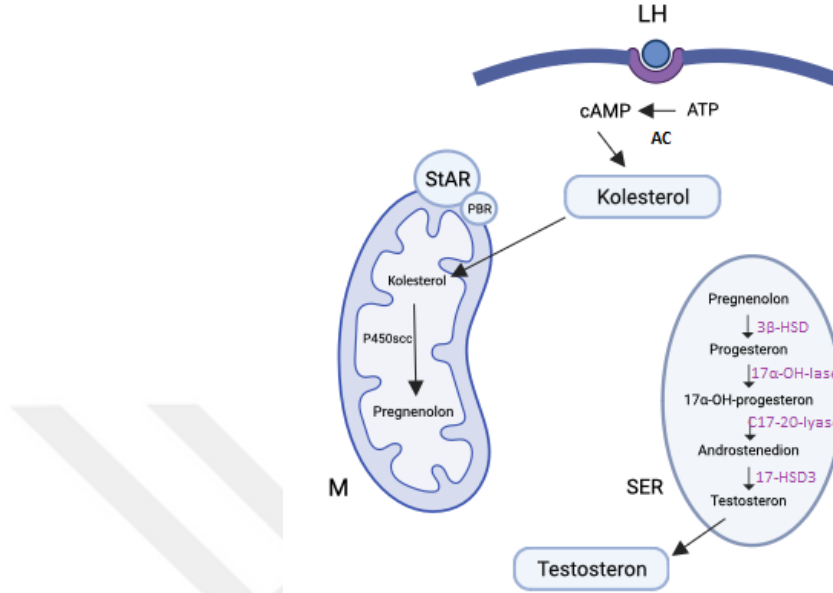
Androjenler, erkek cinsiyet organlarının ve ikincil cinsiyet özelliklerinin geliştirilmesinden ve sürdürülmesinden sorumludur. Embriyonik dönemdeki testosteron, epididimis, vas deferens ve seminal veziküllerin oluşumuna yol açan Wolff kanallarının gelişiminde yer alırken, ergenlikte ise erkek cinsel davranışın gelişmesinde, spermatogenezin başlatılması ve desteklenmesinde, kemik büyümesinde, dış genital organların olgunlaşmasında ve gonadotropinlerin salgılanmasının düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir (Wu, 1992; Martin ve Touaibia, 2020).

Testiküler steroid üretiminin neredeyse tamamı testisin interstisyel kompartımanında bulunan Leydig hücrelerinde meydana gelirken, seminifer tübüllerdeki Sertoli hücreleri de az miktarda da olsa pregnenolon sentezlemektedir (Ford ve diğ., 1999; Stocco ve diğ., 2006). Leydig hücrelerinde androstenedion ve dehidroepiandrosteron (DHEA) da üretilmektedir, ancak androjenisite seviyeleri testosteronunkinden çok daha düşüktür (Martin ve Touaibia, 2020).

Erişkin testisinde Leydig hücresinin testosteron üretimi, periferik dolaşıma Luteinizan hormonun hipofiz bezi tarafından pulsatil sekresyonuna bağlıdır (Stocco ve diğ., 2006, Wang ve ark. 2017). Ağırlıklı olarak bir siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı yolla hareket eden Luteinizan hormonun (LH), Leydig hücresi testosteron üretimi üzerinde hem hızlı (akut) hem de uzun vadeli (trofik) etkileri bulunmaktadır (Kavlo ve diğ., 2002; Catt ve diğ., 1980). Ön hipofiz gonadotroplarından salınan LH, kan dolaşımı yoluyla testise ulaşır ve Leydig hücrelerinin yüzeyindeki spesifik LH reseptörleri ile etkileşime girer (Stocco ve Michael, 2006). LH, Leydig hücrelerinde bir plazma zarı reseptörüne bağlandıktan sonra, adenilat siklazın aktivasyonu, artmış hücre içi cAMP üretimi ve proteinlerin, protein kinaz A aracılığıyla cAMP'ye bağlı fosforilasyonu meydana gelir. Ardından steroidogenik akut düzenleyici protein (StAR) ve periferik benzodiazepin reseptörü tarafından kolesterolün iç mitokondriyal membrana translokasyonunu içeren bir sinyal kaskadı başlatılır (Payne ve Hardy, 2007; Amaral ve diğ., 2013).

Mitokondriye girdikten sonra kolesterol, sitokrom P450 yan zincir kırıcı enzimin etkisiyle pregnenolona dönüştürülür (Amaral ve diğ., 2013). Pregnenolon, mitokondriden düz yüzü endoplazmik retikuluma hareket eder ve burada 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi etkisiyle progesterona dönüştürülür. Progesteron ise 17α -hidrosilaz ve C17-20 liyazı içeren iki aşamalı bir işlemle androstenediona dönüştürülür. Daha sonra androstenedionun 17β -

hidroksisteroid dehidrogenaz tip III (17HSD3) enzimi etkisiyle testosterona dönüşümü gerçekleşir (Amaral ve diğ., 2013; Payne ve Hardy, 2007).



Şekil 2.5: Leydig hücre steroidogenezi (Amaral ve diğ., 2013).

2.5. METABOLİK SENDROM (MS)

2.5.1. Tanımı

Metabolik sendrom (MS), fazla enerji alımı, artan obezite ve hareketsiz yaşam alışkanlıklarının neden olduğu dünya çapında giderek artan bir halk sağlığı sorunudur (Practice, 2019). MS, obezite, dislipidemi, insülin direnci ve hipertansiyonu içeren bir dizi anormalliği kapsar.

Metabolik sendromun keşfi, Kylin'in ilk kez hipertansiyon, hiperglisemi ve gut gibi metabolik bozuklukların bir kombinasyonunu tanımladığı yirminci yüzyılın başlarına kadar uzanmaktadır (Kylin, 1923). 1947 yılında Vague yapmış olduğu bir çalışmada üst vücut adipozitesi, hipertansiyon ve diyabet arasında bir ilişki olduğunu fark etmiştir (Vague, 1947). Vague'nin yapmış olduğu çalışma Haller ve Hanefeld 1975 yılında MS terimini ortaya atmasına ve onu diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi eşzamanlı risk faktörlerinin bir kombinasyonu olarak tanımlamasına izin vermiştir (Haller ve Hanefeld, 1975).

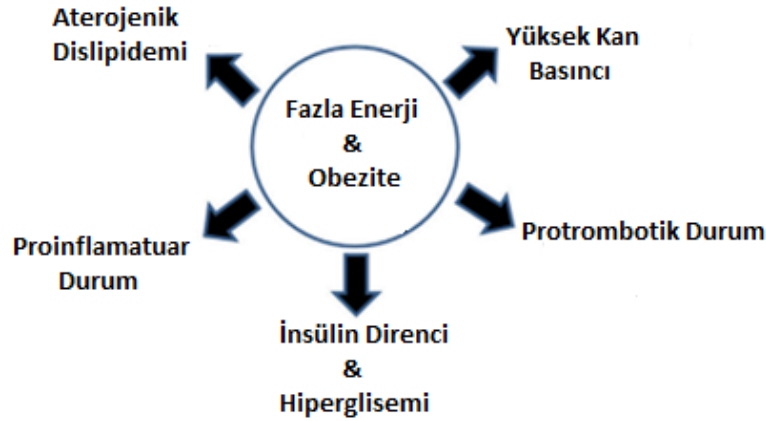
Metabolik sendrom, fiziksel hareketsizlik ve sınırsız miktarda yüksek yağlı gıda alımıyla karakterize edilen batılılaşmış yaşam tarzıyla bağlantılıdır (Bouchard, 1995; Han ve

diğ., 2014). Yapılan araştırmalara göre metabolik sendromun en sık aşırı besin alımı ve fiziksel hareketsizlik ile karakterize edilen popülasyonlarda ortaya çıktığı, ancak altta yatan metabolik ve genetik etkenlerin de önemli olduğu bilinmektedir (Alberti ve diğ., 2009; Grundy, 2016).

Dünya çapında MS prevalansının, bölgeye, kentsel veya kırsal çevreye, yaş, cinsiyet ve ırk gibi çalışılan popülasyonun bileşimine bağlı olarak %10-84 arasında değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (Desroches ve Lamarche, 2007; Kolovou ve diğ., 2007). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), dünyanın yetişkin nüfusunun dörtte birinin MS'ye sahip olduğunu tahmin etmektedir (Practice., 2019).

Cameron ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre genetik altyapı, diyet, fiziksel aktivite düzeyleri, sigara kullanımı, ailede diyabet öyküsü ve eğitim farklılıkları gibi faktörlerin MS ve bileşenlerinin prevalansını etkilediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca MS prevalansının cinsiyete göre de değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır. Dünyadaki MS prevalansı erkeklerde %8-43 arasında değişkenlik gösterirken bu oranın kadınlarda ise %7-56 arasında değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (Cameron ve diğ. 2004).

2004 yılında ülkemizde yapılan Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması verilerine göre 20 yaş ve üzeri erişkinlerdeki metabolik sendrom (MS) sıklığı %35 olarak bildirilmiş ve bu sıklığın kadınlarda erkeklere oranla çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu oran kadınlarda % 41.1 olarak görülürken, erkeklerde ise % 28.8 olduğu saptanmıştır. 2010 yılında yapılan 4057 bireyin dahil olduğu Metabolik Sendrom Derneği Türkiye Sağlık Çalışması (PURE TÜRKİYE; Prospective Urban Epidemiological Study) verilerine göre ise metabolik sendrom sıklığının kadınlarda %43.5, erkeklerde ise %41.4 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yaş artışının, metabolik sendrom sıklığının artışına sebep olduğunu da bildirmişlerdir (Balkan, 2013). Kadınlarda MS sıklığının daha yüksek olmasının sebebi ise abdominal obezitenin erkeklere kıyasla çok daha yüksek olmasından kaynaklıdır. Türkiye'de yakın zamanda yapılan bir araştırmaya göre, Türk kadınlarının %29'unun obez ve %27'sinin ise fazla kilolu olduğu bilinmektedir (Kozan ve diğ., 2007.) Ayrıca metabolik sendrom prevalansının ülkeler ve etnik gruplar arasında da önemli ölçüde değiştiği bilinmektedir. Türk nüfusu, Güney Asyalılarla kıyaslandığında bu prevalansın çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Obezite ve fiziksel aktivite düzeyi, MS sıklığına önemli ölçüde katkıda bulursa da genetik yatkınlık gibi diğer faktörler de oldukça önemlidir (Kozan ve diğ., 2007).



Şekil 2.6: Fazla enerji alımı/obezite ile metabolik sendromun risk faktörleri arasındaki ilişki (Grundy, 2016).

2.5.2. Metabolik Sendrom Patogenezi

MS, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimin bir sonucu olarak ortaya çıkan kronik düşük dereceli bir inflamasyon durumudur. İnsülin direnci, visceral yağlanma, aterojenik dislipidemi, endotel disfonksiyonu, genetik yatkınlık, hipertansiyon ve kronik stres metabolik sendromu oluşturan çeşitli faktörlerdir (Practice., 2019). MS gelişiminde tetikleyici faktörler abdominal obezite ve insülin direncidir (Reaven, 1988). MS, insülin direncinin sendromda oynadığı rol nedeniyle “insülin direnci sendromu” olarak da bilinmektedir (Kubena ve diğ., 2018).

Aşırı beslenme ve fiziksel hareketsizliğin neden olduğu visceral yağ birikimi, serbest yağ asitlerinin salınmasına sebep olur. Bu durum ise lipotoksisite ve insülin direncine nihayetinde ise hiperinsülinemi ve hiperглиsemi gelişmesine yol açar (Pollex ve diğ., 2006). İnsülin, hiperглиsemiye yanıt olarak pankreas tarafından üretilir ve çeşitli dokularda farklı glikoz kullanımını uyarır. İskelet kası ve yağ dokusunda insülin, GLUT4 glikoz taşıyıcısının hücre yüzeyine yer değiştirmesiyle glikoz alımını uyarır (Huang, 2009). İnsülin direnci, normal bir insülin konsantrasyonunun yağ, kas ve karaciğer gibi periferik hedef dokularda yeterince insülin yanıtı üretmediği patofizyolojik bir durum olarak tanımlanır (Kubena ve diğ., 2018). Oluşan direnç ile birlikte, insülin aracılı glikoz alımı, glikoliz ve glikojen sentezi bozulmuştur (Huang, 2009). Bu durumda ise pankreasın beta hücresi, insüline dirençli bireylerde hiperглиseminin üstesinden gelmek için çok daha fazla insülin salgılar. Bu durum ise hiperinsülinemiye sebep olur (Gill ve diğ., 2005). İnsülin direnci plazma glikozunu

baskılayamayan yüksek plazma insülin konsantrasyonu ile karakterizedir (Han ve diğ., 2014). Pankreas beta hücrelerinin zamanla kötüleşen insülin direncini düzeltmek için yeterli insülin üretememesi hiperglisemiye ve Tip 2 Diabetes Mellitus gelişimine yol açar (Petersen ve Shulman, 2006).

İnsüline dirençli bireylerin klinik olarak obez olmaları gerekme de genellikle baskın bir üst vücut yağı ile karakterize edilen anormal bir yağ dağılımına sahip oldukları bilinmektedir (Jensen ve diğ., 1989). İnsülin direnci çeşitli yollarla aterojenik dislipidemiye yol açar. İlk olarak, insülin normal şartlarda adipositlerdeki lipolizi baskılar, fakat bozulmuş bir insülin sinyali lipolizi artırır ve karaciğerde trigliseritler için substrat görevi gören serbest yağ asiti düzeylerinin artmasına neden olur (Ginsberg ve diğ. 2005).

Yapılan çalışmalarda üst vücut obezitesi baskın olan bireylerin metabolik sendroma yatkınlıklarının daha fazla olduğu ve fazla visceral yağlanmanın, metabolik sendromla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu görülmüştür (Tchernof ve Després, 2013; Després, 2006). Obezitenin, özellikle kas ve karaciğer olmak üzere çeşitli organ veya dokulara aşırı yağ artışı desteklediği bilinmektedir (Shulman,2014; Grundy, 2016). Son çalışmalar, yağ dokusunun metabolik risk faktörlerini etkileyebilecek adipokinlere katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. (Lehr ve diğ. 2012; Grundy, 2016). Bunlar arasında adiponektin, interlekin-6, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) resistin, leptin, anjiyotensinojen ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 bulunmaktadır (Berg ve Scherer, 2005; Grundy, 2016).

Normalde, yağ hücreleri genişledikçe, yeme davranışının sona erdiğini belirtmek için beyine daha fazla leptin salgılanır. Ancak obez bireylerde insülin direncine benzer şekilde leptin direnci gelişebilir. Bu bireylerde yüksek leptin seviyeleri bile tokluk yaratmaya yetmez (Kubena ve diğ., 2018). Metabolik sendromlu hastalarda kilo kaybı aynı anda birden fazla özellikle iyileşmeye yol açabilir, bu nedenle anormal patofizyolojiyi ortaya çıkarmak için belirli bir derecede yağlanma gerekli gibi görünmektedir. Fakat obez olup metabolik sendromun diğer bileşenlerinden herhangi birini göstermeyen hastalar da vardır, bu nedenle metabolik sendrom fenotipinin gözlenmesi için hem insülin direncine metabolik yatkınlık hem de obezite gerekli gibi görünmektedir (Huang, 2009).

2.5.3. Metabolik Sendromun Deneysel Hayvan Modelleri

Metabolik sendrom küresel bir sağlık sorunudur. Dünya çapında, MS prevalansı %20-30 arasında değişkenlik göstermekte ve yaşla birlikte cinsiyete özgü şekilde de artmaya devam etmektedir (Pucci ve diğ., 2017; Gunawan ve diğ., 2021). Metabolik sendromun deneysel modelleri, patogenezi, önlenmesi ve tedavisinin araştırılmasında oldukça önemlidir (Gancheva ve diğ., 2015).

Metabolik sendromun hücrel ve biyokimyasal mekanizmaları oldukça geniş ve karmaşıktır ayrıca mevcut tedaviler ise tam olarak etkili değildir. Bu nedenle, metabolik sendromun metabolik ve biyokimyasal komplikasyonlarını taklit eden, tekrarlanabilir ve erişilebilir hayvan modelleri tasarlanmıştır (Rodríguez ve diğ., 2020). Hayvan modellerinin avantajı, diyet ve motor aktivitenin hassas kontrol imkanındır. Diğer bir önemli avantajı ise insanlarda yapılması zor olan MS'nin histolojik incelemelerinin yapılabilmesine olanak sağlamasıdır (Angelova ve diğ., 2013). Çok faktörlü doğası nedeniyle, insanlarda MS'nin patofizyolojisini en iyi temsil eden uygun bir deneysel model seçmek oldukça zordur (Panchal ve Brown, 2011; Wong ve diğ., 2016). Metabolik sendromu indüklemek için çeşitli modeller geliştirilmiştir. Diyetle oluşturulan metabolik sendrom modelleri basitlikleri ve düşük maliyetleri nedeniyle metabolik sendromu incelemek için en yaygın kullanılanlardır, ancak farmakolojik indüksiyon, spontan mutasyon, genetik manipülasyon veya cerrahi prosedürlerden oluşan modeller de mevcuttur (Angelova ve diğ., 2013; Rodríguez ve diğ., 2020).

2.5.3.1. *Diyet Manipülasyonu ile Oluşturulan MS Hayvan Modelleri*

Diyetle indüklenen metabolik sendrom modellerinde, işlenmiş gıdalar ve hazır yiyeceklerin (fast-food) daha kolay bulunabilirliği nedeniyle artan yağ ve karbonhidrat tüketimi ile birlikte yükselişte olan sağlıksız beslenme alışkanlıkları ve hareketsiz yaşam tarzını taklit etmeyi amaçlanmaktadır (Chandrasekera ve diğ., 2014; Yudkin, 1967).

Hayvanlarda Metabolik sendromu indüklemek için kullanılan diyetler genellikle yüksek yağlı diyet veya esas olarak fruktoz ve sakkarozu içeren karbonhidratlardan oluşur (Wong ve diğ., 2016; Wong ve diğ., 2018). Panchal ve Brown yapmış oldukları çalışmada yüksek karbonhidratlı ve yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanların, insan MS patogenezi en iyi şekilde taklit ettiğini öne sürmüştür (Panchal SK ve diğ., 2011).

Yüksek Karbonhidratlı Diyet ile Oluşturulan Modeller

Hareketsiz bir yaşam tarzının benimsenmesi, bireyi yüksek enerji alımı ancak düşük fiziksel aktivite koşullarına sokar. Bu yaşam tarzıyla birlikte bireyin enerji depolama eğilimi ve aşırı kilo alımı artar ardından obezite gelişimine neden olur (Wong ve diğ., 2016). Obezite ve MS prevalansının artması son yıllarda artan karbonhidrat tüketimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yüksek fruktozlu mısır şurubu ve sakkaroz gibi rafine karbonhidratların tüketimi vücut kütlelerinin artması, dolaşımdaki trigliserit seviyesinin yükselmesi ve insülin direncinin gelişmesi ile ilişkilidir (Angelova ve diğ., 2013; Basciano ve diğ., 2005; Daly ve diğ., 1997). Enerji gereksinimini aşan karbonhidrat alımı, kan glukoz konsantrasyonlarını artırır ve pankreastan insülin salgılanmasını tetikleyerek hücrelerin glukoz alımını teşvik eder (Bender ve diğ., 2018). Uzun süreli aşırı karbonhidrat tüketimi, insülin direncini etkileyen obeziteye neden olmaktadır (Gunawan ve diğ., 2021).

Deneysel koşullarda uygulanan temel diyet modelleri, içerdiği karbonhidrat türüne bağlı olarak sakkaroz, fruktoz ve glikoz içerir. Örneğin artan fruktoz alımı, obezite ve metabolik sendromun gelişiminde ana faktörlerden biri olarak kabul edilir (Angelova ve diğ., 2013). Karaciğere büyük miktarda fruktoz girişi, insülin duyarlılığını azaltan ve insülin direncine, glukoz intoleransına yol açan lipogenezin uyarıcı etkileri nedeniyle trigliserit ve kolesterol birikimine neden olur (Bender ve Mayes, 2018). Yapılan çalışmalar, yüksek fruktozlu bir diyetin MS semptomlarını indükleyebileceğini ve yağlı karaciğer gelişiminde de önemli bir faktör olduğunu göstermiştir (Gunawan ve diğ., 2021).

Yüksek Yağ İçeren Diyet ile İndüklenen Modeller

Yağlar üç ana makro besinden biridir ve kalorik olarak en yoğun makro besin olarak bilinmektedir (Brown ve diğ., 2010). Yüksek yağlı diyetler, deney hayvanlarında metabolik sendromu ve daha spesifik olarak obeziteyi indüklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Halade ve diğ., 2010; Xu ve diğ., 2013). MS modellerini geliştirmek için domuz yağı, sığır donyağı gibi hayvansal kaynaklı yağlar veya mısır yağı, soya fasulyesi yağı ve hindistancevizi yağı gibi bitkisel yağlardan oluşan diyetler kullanılır (Gunawan ve diğ., 2021; Wong ve diğ., 2016). Yapılan araştırmalara göre %30-70 oranında yağ içeren diyet modellerinin vücut ağırlığını artırdığı, hiperglisemi, insülin direnci ve dislipidemiye neden olduğu bilinmektedir (Gunawan ve diğ., 2021).

Yüksek Yağ ve Yüksek Karbonhidrat İçeren Diyet Modellerinin Kombinasyonu

Yüksek yağlı ve yüksek karbonhidratlı diyetler, değişen yeme alışkanlıklarına yönelik mevcut eğilime en çok benzeyen bir diyet modelidir. Bu kombinasyon diyeti çeşitli avantajlar sağlar. Trigliseritlerdeki artış esas olarak yüksek fruktozlu diyetlerden kaynaklanırken, obezite ise yüksek yağlı diyetlerden kaynaklanmaktadır. Yiyecek veya içecek tatlandırıcıları olarak yaygın kullanılan fruktoz ve sakkaroz, diğer şeker türlerine göre daha az tokluk sağlayarak aşırı alımı teşvik etmektedir (Fernandez ve diğ., 2018; Gunawan ve diğ., 2021).

Fruktoz

Fruktoz, glukoz ile aynı kimyasal formüle ($C_6H_{12}O_6$) sahip olan meyvelerde ve balda bulunan basit bir şekerdir (Khitan ve Kim, 2013; Rizkalla, 2010). Fruktozun karbon zincirinin 2. Pozisyonunda bir keton grubuna, glukozun ise karbon zincirinin 1. Pozisyonunda bir aldehit grubuna sahip olması açısından birbirinden farklıdır (Rizkalla, 2010). Dünyadaki ana fruktoz kaynağı, şeker kamışı ve şeker pancarından elde edilen sükroz veya sofr şekeridir. Sükroz, fruktoz ve glikozdan oluşan bir disakkarittir ve ilk olarak Yeni Gine ve Hindistan Yarımadası'nda geliştirildikten sonra Orta Çağ'da Venedik, İtalya ve diğer ticaret limanları aracılığıyla Avrupa'ya getirilmiştir (Khitan ve Kim, 2013). Fruktoz, sükrozdan daha tatlı olarak değerlendirilen meyvemsi bir tada sahiptir. Sükroz ve fruktoz, gıdalarda tatlılık ve lezzet sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu şekerler ayrıca ürünün görünümüne, korunmasına ve enerji içeriğine katkıda bulunmaktadır. Doğal diyet fruktoz kaynakları meyveler, meyve suları ve bazı sebzelerken, batı diyetlerindeki birincil fruktoz kaynağı ise unlu mamullere, şekerlemelere, alkolsüz içeceklerle ve yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) ile tatlandırılmış diğer içeceklerle eklenen şekerlerdir (Keim ve Havel, 2012). 1967 yılında gıda endüstrisi, dekstrozun fruktoza enzimatik izomerleştirilmesiyle, %42 fruktoz, %50 glikoz ve %8 diğer şekerlerden (Keim ve Havel, 2012) oluşan yüksek fruktozlu mısır şurubu üretmeye başlamıştır. Günümüzde modern gıda işlemede yaygın olarak kullanılmaktadır ve büyük ölçüde alkolsüz içecekler, kahvaltılık tahıllar, unlu mamuller, çeşniler ve tatlılar gibi gıda maddelerine eklenmesiyle artan fruktoz tüketimine yol açmıştır (Lê ve Tappy, 2006). Diyetle eklenen şekerleri doğru bir şekilde ölçmek zordur, ancak gıda alım anketi verilerine göre, toplam fruktoz tüketimi yetişkin enerji alımının yaklaşık %8-12'sini oluşturduğu bilinmektedir (Keim ve Havel, 2012). Yapılan insan ve hayvan çalışmalarına göre fruktoz tüketiminin, aşırı kilo alımı

ve metabolik bozuklukların başlangıcına arasında neden olduğu bilinmektedir (Lê ve Tappy, 2006).

Fruktoz Metabolizması

Fruktoz diyetle birlikte, basit bir monosakkarit olarak ya da sükroz disakkaritinin bir parçası olarak alınabilmektedir (Keim ve Havel, 2012). Diyetle alınan sükroz, bağırsakta sükraz enzimi tarafından hidroliz edilerek bir molekül glukoz ve fruktoza parçalanır (Keim ve Havel, 2012; Khitan ve Kim, 2013).

Oluşan glukoz, sodyum-bağlı bir yardımcı taşıyıcı aracılığıyla hızla emilir ve portal dolaşım yoluyla karaciğere ulaşır. Fruktoz emilimi ise fruktoza özgü bir heksoz taşıyıcısı olan ve ATP hidrolizi gerektirmeyen bir işlemle jejunumda bulunan GLUT-5 tarafından sağlanan kolaylaştırılmış difüzyonla gerçekleşir (Keim ve Havel, 2012). Fruktoz, enterosit içerisine girdikten sonra, enterositin bazolateral kutbunda GLUT2'nin aracılık ettiği bir taşıma yoluyla kan damarlarına difüze olurken, fruktozun bir kısmı ise burada laktata dönüştürülür (Lê ve Tappy, 2006).

Absorbe edilen fruktoz daha sonra portal ven aracılığıyla karaciğere taşınır (Rizkalla, 2010). Fruktoz metabolizmasının baskın bölgesi karaciğerdir ve diyetle alınan fruktozun büyük bir kısmı, fruktoz için yüksek afinite ve özgüllüğe sahip enzim olan fruktokinaz aracılığıyla fruktoz 1-fosfata fosforile edilir. Oluşan fruktoz 1-fosfat ise hepatik aldolaz (aldolaz B) enzimi etkisiyle trioz fosfat olarak bilinen dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ve gliseraldehite metabolize edilir (Keim ve Havel, 2012; Rizkalla, 2010). Fruktozun hızlı fosforilasyonu, serbest fosfatın geçici olarak tükenmesine ve büyük miktarlarda fruktoz verilmesinden sonra karaciğer hücrelerinde ATP/ADP oranında azalmaya yol açar. Fruktozdan üretilen trioz fosfatlar ise pirüvata ileri metabolize edilebilir ve trikarboksilik asit döngüsünde CO₂ ve H₂O'ya oksitlenebilir (Keim ve Havel, 2012; Rizkalla, 2010; Lê ve Tappy, 2006). Ayrıca üretilen trioz-fosfatların büyük bir kısmı glukoneogenez yoluyla glikoz ve glikojene dönüştürülürken, fruktozun karbon atomlarının bir kısmı ise *de novo* lipogenez süreci yoluyla hepatositlerde yağ asitlerine dönüştürülebilmektedir (Rizkalla, 2010).

Fruktozun Dislipidemi ve İnsülin Direnci Üzerine Etkisi

Son yirmi yılda obezite prevalansındaki artışın esas sebebinin fruktoz alımındaki artıştan özellikle şekerle tatlandırılmış içeceklerin tüketiminden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda fazla miktarda meşrubat ve şekerli içecek tüketiminin daha fazla kilo alımına dolayısıyla artmış vücut kitle indeksine sebep olduğu görülmüştür (Keim ve Havel, 2012). İnsanlardaki fruktoz alımı, referans diyet olarak nişasta veya glikoz ile karşılaştırıldığında, lipid homeostazı üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu görülmüştür (Lê ve Tappy, 2006). Fruktoz tüketiminden kaynaklı en erken görülen metabolik bozulma ise visseral yağ birikimini artıran hipertrigliseridemidir (Khitan ve Kim, 2013; Lê, Tappy, 2006). Visseral adipozite, serbest yağ asitlerinin karaciğere portal dağılımını artırarak hepatik trigliserit birikimine, protein kinaz C aktivasyonuna ve hepatik insülin direncine sebep olmaktadır (Khitan ve Kim, 2013). Yapılan çalışmalarda yüksek miktarda glukoz tüketiminin hücrel insülin bağlanmasını veya insülin duyarlılığını bozmadığını, ancak glukozun aksi olarak yüksek miktarlardaki fruktoz tüketiminin ise hem insülin bağlanmasını hem de insülin duyarlılığını önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir (Faeh ve diğ., 2005; Lê ve Tappy, 2006). Glukozdan farklı olarak hepatik fruktoz metabolizması, anahtar enzimi olan fruktokinazı aşağı regüle (down regüle) edemez. Bu nedenle, yüksek miktarlarda fruktoz tüketildiğinde, fruktoz metabolitleri karaciğerde birikir ve lipide dönüştürülebilen fazla trioz fosfat birikimine neden olur. Bu tür lipid açısından zengin bir ortam hepatik metabolizmanın bozulmasına neden olarak insülin direncinin gelişimine neden olabilir (Lê ve Tappy, 2006).

Diyete fruktoz veya sükrozla tatlandırılmış içecekler eklenerek yapılan deneysel çalışmalarda hayvanlar diğer besinlerden gelen enerji alımını azaltsa bile bu içeceklerin sağladığı ek enerjiyi kompanse edemezler ve sonuç olarak artmış bir enerji alımı gerçekleşir. Fruktozla tatlandırılmış içecekleri tüketen bu hayvanlarda intra-abdominal yağda önemli artışlar görülmüş ve fruktoz alımından sonra kan şekeri ve insülin konsantrasyonlarında düşük miktarlarda artışlar görülmüştür. Ayrıca dolaşımdaki leptin konsantrasyonları daha düşüktür ve öğün tüketiminin ghrelin konsantrasyonları üzerindeki normal baskılayıcı etkisi fruktozlu içecekler ile zayıflatılmış durumdadır (Keim ve Havel, 2012). Glukoz, insülin, leptin ve ghrelin, merkezi sinir sistemi aracılığıyla gıda alımının uzun vadeli kontrolünde ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde yer almaktadır. Ancak bu moleküllerin etkisi fruktoz tüketimiyle azaldığından fruktoz açısından yüksek bir diyetin kronik tüketimi, diyetteki yağ ve hareketsizlik ile artan

enerji alımına, kilo alımına ve obeziteye katkıda bulunmaktadır (Keim ve Havel, 2012; Khitan ve Kim, 2013).

2.5.3.2. Genetik Modifikasyon ile Oluşturulan MS Hayvan Modelleri

Genetik olarak obez ve diyabetik deneysel modeller için leptin veya leptin reseptörü eksikliği olan deney hayvanları kullanılır. Genetik modellerin kullanımı zamandan tasarruf sağlamaktadır çünkü MS'nin gelişme süresi diyet ile oluşturulan modellerden çok daha kısadır (Wong ve diğ., 2016). Ayrıca genetik modellerin kullanımı daha kolaydır. Fakat bu modellerde yaşam tarzı ile ilgili faktörler ortadan kalkar ayrıca bu hayvanları elde etmenin yüksek maliyeti nedeniyle çokta tercih edilmemesine sebep olur (Angelova ve diğ., 2013).

Genetik modeller arasında Obez Zucker sıçanları (ZDF) geniş çapta araştırılmaktadır ve MS çalışması için kullanılan en uygun modellerdendir. Bu hayvanlar leptin reseptör eksikliğine sahiptir ve henüz 3-5 haftalıkken obez olurlar. 14. haftada vücutlarının yaklaşık olarak %40'ı yağdan oluşur. Erkek hayvanlarda diyabet gelişirken, dişilerde ise diyabet geliştirmeden sadece obezite görülür (Zucker ve Antoniades, 1972; Angelova ve diğ., 2013).

Başka bir genetik model ise arteriyel hipertansiyon çalışmaları ve ilgili ilaç tedavileri için kullanılan obez spontan hipertansif sıçanlardır (SHR). Erişkin sıçanlar da obezite, hipertrigliseridemi ve hipertansiyon gelişir (Angelova ve diğ., 2013). Düşük aerobik kapasiteye sahip LCR (Low-capacity runners) olarak bilinen genetik fare modeli de ise hipertansiyon, endotel disfonksiyonu, insülin direnci, hiperinsülinemi, visceral obezite ve hipertrigliseridemi semptomları ortaya çıkar (Wisloff ve diğ., 2005).

2.5.3.3. Farmakolojik Manipülasyon ile Oluşturulan MS Hayvan Modelleri

MS modelleri, glukokortikoidler, antipsikotikler ve streptozotosin (STZ) gibi ilaçlar veya kimyasal maddeler kullanılarak geliştirilebilir. Bu yöntem ilaca bağlı MS çalışmaları için uygundur, ancak MS modellerinin kriterlerini karşılamak için daha uzun bir indüksiyon süresine ihtiyaç duyulmaktadır (Gunawan ve diğ., 2021). İlaç modellerinin avantajı kolay ulaşılabilir ve güvenli olmasıdır ancak en büyük dezavantajı ise metabolik sendromun farklı aşamalarındaki değişiklikleri gözlemlemeye izin vermiyor olmalarıdır (Angelova ve diğ., 2013).

Hayvan modellerinde MS geliştirmek için endojen ve eksojen glukokortikoidler kullanılmaktadır (Wong ve diğ., 2016). Glukokortikoidler karaciğer, iskelet kası, yağ dokusu ve pankreasta glukoz metabolizmasına katkı sağlar (Gunawan ve diğ., 2021). Endojen glukokortikoidler, strese yanıt olarak adrenal bezden salgılanan esansiyel steroid hormonlardır,

inflatuar bozuklukları ve otoimmün hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Gunawan ve diğ., 2021; Wong ve diğ., 2016). Eksojen glukokortikoidler ise, otoimmün hastalık ve kanser gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için ilaç olarak kullanılırlar. Ayrıca organ naklinde reddi önlemek için de kullanılmaktadırlar (Wong ve diğ., 2016).

Glukokortikoidler, çeşitli mekanizmalarla farklı doku ve organlara doğrudan etki ederek MS gelişmesine neden olurlar (Wong ve diğ., 2016). Glukokortikoid tedavisi vücut ağırlığında artış, glukoz intoleransı, bozulmuş kalsiyum homeostazı, osteoporoz, katarakt ve merkezi sinir sistemi etkileri gibi istenmeyen yan etkileri de beraberinde getirmektedir (Ferris ve Kahn, 2012).

Diyabet modelinde beta hücre hasarı oluşturmak için en sık kullanılan ajan ise Streptozotocin (STZ)'dir (Angelova ve diğ., 2013). STZ, *Streptomyces achromogenes*'ten türetilen bir fungal antitümör antibiyotiktir (Gunawan ve diğ., 2021). STZ'nin diyabet modelinde tek bir uygulamada bile doza bağlı olarak İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus durumu elde edildiği yapılan çalışmada gösterilmiştir (Angelova ve diğ., 2013). STZ'nin diyabeti oluşumundaki en önemli mekanizması DNA alkilasyonudur. Ayrıca STZ'nin, beta hücre membranına zarar verdiği ve DNA zincirlerini kırarak hücre ölümüne de yol açtığı bilinmektedir (Gunawan ve diğ., 2021).

Yapılan araştırmalara göre antipsikotik ilaçların da metabolik sendrom modeli oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir. Antipsikotik ilaçlar, şizofreni, depresyon ve bipolar bozukluk gibi nöropsikiyatrik bozuklukları tedavi etmek için kullanılan ilaçlardır (Wofford ve diğ., 2006; Wong ve diğ., 2016; Gunawan ve diğ., 2021). Bu ilaçların faydalarına rağmen bazı çalışmalar, özellikle ikinci nesil antipsikotiklerin kilo alımı, lipid anormallikleri, artan visceral yağ, bozulmuş glukoz toleransı ve insülin direnci ile ilişkili olduğunu ve böylece MS gelişimine de katkı sağladığını göstermiştir (Gunawan ve diğ., 2021; Wong ve diğ., 2016).

Yapılan bu tez çalışmasında ise diyet manipülasyonu ile MS modeli oluşturulmuştur. Metabolik hastalıkların gelişimine sebep olan özellikle doymuş yağları ve yüksek fruktozlu mısır şurubunu içeren enerji bakımından yüksek gıdaların tüketimi günümüzde çok fazla artış gösterdiğinden bu hayvan modelimizde de insanlardakine benzer şekilde yüksek fruktoz ve yüksek yağ içeren bir diyet modeli uygulanmıştır. (Zhou X ve diğ., 2014).

2.5.4. Metabolik Sendrom ve Erkek İnfertilitesi

Testosteron, seminifer tübülleri arasındaki testis interstisyumunda bulunan Leydig hücreleri tarafından salgılanan ve dört halkalı C18 steroid yapısı ile karakterize edilen ana androjenlerden biridir (Goel ve diğ., 2018). Testosteron, erkek cinsiyet organları ve ikincil cinsel özelliklerin gelişimi dahil olmak üzere erkek üreme sisteminin gelişimini uyarır (Freeman ve diğ., 2001). Testosteron salınımı ise hipotalamik hipofiz-testis eksenini tarafından düzenlenmektedir. Sağlıklı bir erkek tarafından günlük ortalama testosteron üretiminin, sabahları en yüksek ve akşamları en düşük olmak üzere yaklaşık 5-7 mg olduğu bilinmektedir. Dolaşımdaki toplam testosteronun sadece %1-2'si serbest dolaşımdayken, geri kalanı seks hormonu bağlayan globuline (SHBG) (%60-80) ve albümine (%20-40) bağlı halde bulunur (Feldman ve diğ., 2002; Goel ve diğ., 2018). Üretilen testosteron seviyeleri, yaşlanma ile birlikte her yıl %1 oranında giderek azalmaktadır. Azalan oran, obezite, stres, ilaçlar ve bazı kronik hastalıklara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Brand ve diğ., 2010; Goel, ve diğ., 2018).

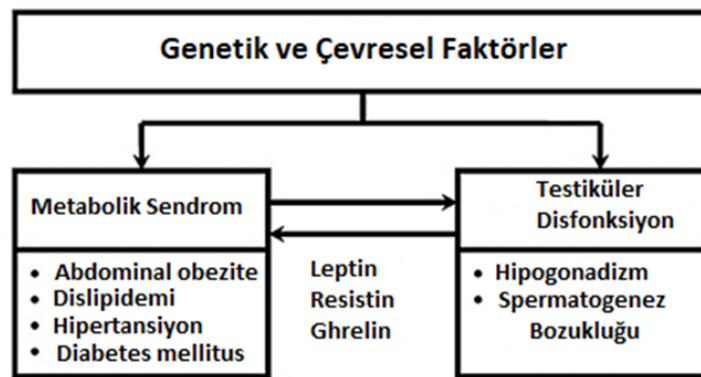
Testis disfonksiyonu, testislerin anormal fonksiyonunu belirtmek için kullanılan genel bir terimdir. Özellikle testislerin ekzokrin yetersizliği, *spermatogenez bozukluğu* anlamına gelirken, endokrin yetmezlik ise *hipogonadizm* olarak adlandırılmaktadır (Goulis ve Tarlatzis, 2008). *Hipoandrojenizm* ise ciddi sonuçları olan androjen eksikliği olarak tanımlanır. Klinik prezentasyonu yaşa bağlı olarak libido kaybı, erektil disfonksiyon, depresyon, kas kaybı, vücut yağ kütlesinde artış, kilo artışı ve azalmış kemik yoğunluğunu içermektedir. Diğer ilişkili komorbiditeler arasında obezite, hipertansiyon, dislipidemi ve hatta diyabet bulunmaktadır. Testosteron eksikliği, Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) ve diğer metabolik bozukluklar dahil olmak üzere birçok kronik sağlık durumuyla ilişkilidir (Feldman ve diğ., 2002; Goel ve diğ., 2018).

Metabolik sendrom (MS) ve infertilite, genel popülasyonda yüksek prevalansa sahip iki rahatsızlıktır. MS, dünya çapında artan küresel bir sağlık sorunudur ve infertilite ise erkeklerin yaklaşık olarak %12'sini etkilemektedir. MS'nin erkek fertilitesi üzerindeki olası etkisi yaklaşık son on yıldır araştırılmaktadır (Lotti ve diğ., 2021). Erkek infertilitesi 2011'de %7 iken son yıllarda prevalansı, %12'ye çıkmıştır (Lotti ve Maggi, 2018), MS'nin hem batıda hem de gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklar, ergenler ve üreme çağındaki genç yetişkinler de dahil olmak üzere genç nüfusta yaygınlığı artmaktadır (Lotti ve diğ., 2021).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre infertilite (kısırlık), çiftlerin yaklaşık %8-15 'ini etkiler ve olası nedenlerin %20-45'i erkek faktörleriyle ilgili olduğu bilinmektedir (Leisegang ve diğ., 2019). Erkek fertilitasını etkileyen temel faktörler arasında oksidatif stres, yaşam tarzı, biyolojik maddelere yüksek düzeyde maruz kalma, tütün, genetik anormallikler, sistemik hastalıklar ve enfeksiyonlar bulunur (Le ve diğ., 2021). Erkek partnerin değerlendirilmesinde standart yaklaşım ise semen analizidir (Leisegang ve diğ., 2019).

Aşırı beslenme ve egzersiz azlığına bağlı olarak aşırı yağ birikiminin sonuçlarından biri de erkek infertilitesidir (Rahali ve diğ., 2020). Metabolik sendrom bileşenlerinin yetişkin androjen eksikliği ve geç başlangıçlı hipogonadizm (LOH) ile güçlü bir bağlantısı olduğu bilinmektedir (Winter ve diğ., 2014). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, vücut kitle indeksi ile semen kalitesi arasında yakın bir ilişki olduğunu öne sürmektedir (Rahali ve ark., 2020). Özellikle yüksek enerjili gıda tüketiminin testis lipid dinamiklerini etkileyerek sperm kalitesinin düşük olmasına sebep olduğu bilinmektedir (Crisóstomo ve diğ., 2020). Biriken kanıtlar ise obezitenin, spermatogeneze, erektil disfonksiyona veya semen kalitesine etki ederek erkek fertilitasını bozduğunu göstermektedir (Rahali ve diğ., 2020).

Aşırı ve kalitesiz besin alımı, hareketsiz yaşam tarzları, çevresel toksinler, endokrin bozucular ve farmakolojik ajanlar obezite, MS ve ilgili komplikasyonların artışına sebep olmaktadır (Leisegang ve diğ., 2019). Yapılan araştırmalara göre erkek infertilitesinin obezite ve MS ile birlikte artmaya devam ettiği bilinmektedir. Artan prevalans ise obezite ve metabolik sendromun erkek fertilitası üzerindeki etkisinin daha fazla araştırılmasını gerektirmektedir (Leisegang K. ve diğ., 2019).



Şekil 2.7: Metabolik sendrom ve testis disfonksiyonu arasındaki etkileşim modeli (Goulis ve Tarlatzis, 2008).

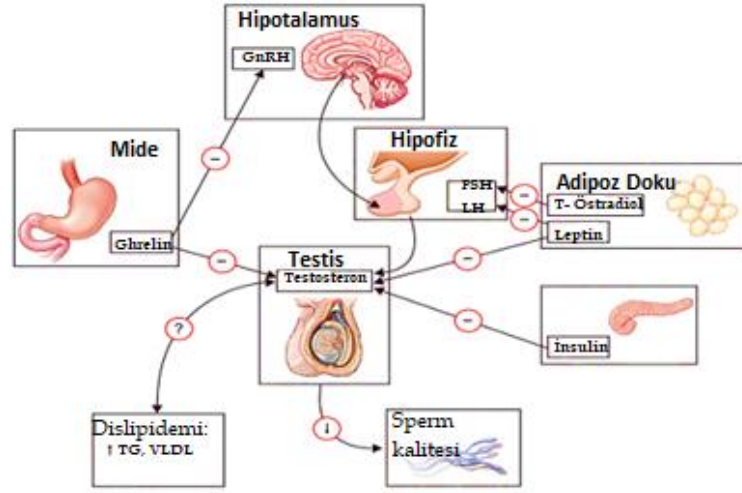
Obezite, aşırı yağ dokusu birikiminden ve sonuç olarak enerji alımı-harcaması arasındaki dengesizlik nedeniyle kilo alımından kaynaklanmaktadır. Obezitenin kaynağı çok faktörlüdür, çevre, genetik altyapı ve hormonlar arasındaki etkileşimi içerir. Obezite patolojisinde birçok hormon yer almaktadır, özellikle yağ dokusu artık bir endokrin organ olarak kabul edilmektedir ve fazlalığı komorbiditelere neden olmaktadır (Martins ve diğ., 2019). Enerji bakımından yoğun, yüksek yağlı diyet tüketimi ve düşük fiziksel aktivitenin, obezite salgınının iki ana itici gücü olduğu kabul edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde, enerjisi yoğun gıdaların tüketimi çok daha genç yaşlarda gerçekleşmektedir. Aşırı yağlanma ve T2DM'nin sperm kalitesi ve fertilite sonuçlarına olan etkisine ilişkin endişeler ise gündemdedir (Crisóstomo ve diğ., 2020).

Obezitenin erkek infertilitesi üzerindeki etkisinin birçok mekanizma ile gerçekleştiği varsayılmaktadır. Memelilerde beyaz yağ dokusu ve kahverengi yağ dokusu olmak üzere iki tip yağ dokusu bulunmaktadır. Beyaz yağ dokusu erkeklerde vücut ağırlığının %20'sini oluşturur ayrıca enflamasyon ve metabolizmanın da önemli bir aracısıdır. Beyaz yağ dokusu, bir dizi adipoz türevi hormon salgılandığından bir endokrin organ görevi görür (Kumar ve diğ., 2015). Beyaz yağ dokusu tarafından sentezlenen ana hormon, enerji alımını, harcamasını ve vücut ağırlığını kontrol etmede önemli olan leptindir (El-Shehawi ve diğ., 2020).

Obezite, yağ dokusu kütlesindeki artışla orantılı olarak serumdaki leptin düzeylerinin yükselmesi ve bunun yanı sıra sekresyonunun sirkadiyen ritminin olmaması ile karakterizedir. Obezitede insülin direnci durumu gözlemlenir ayrıca obez erkeklerde görülen yüksek leptin seviyeleri, testosteronun leydig hücreleri tarafından üretimini inhibe eder (Goulis ve Tarlatzis, 2008). Obez bireylerde yükselmiş leptin düzeylerini azaltarak, aşırı leptinin hipotalamik-hipofiz gonadal eksenini üzerindeki bazı potansiyel baskılayıcı etkilerini tersine çevirmek ve normal spermatogenez ve sperm fonksiyonunu eski haline getirmek mümkün olabilmektedir. Leptin dışında anjiyotensinojen, resistin, adipsin ve adiponektin gibi hormonların da sentezi yapılmaktadır. Aşırı yağ birikimi ise bu proteinlerin düzensizliğine neden olur (Kumar ve diğ., 2015).

Obezitenin erkek infertilitesi ve sperm fonksiyonları üzerindeki etkileri, çeşitli mekanizmaların bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir. Bu mekanizmalar ise; adipositlerdeki aşırı aromatisasyon nedeniyle testosteron ve estradiol oranları arasında bir dengesizlik oluşabilir. Obez erkeklerin yağ dokusundaki yüksek adipokin ve toksin düzeylerinden kaynaklanan aşırı inflamasyon ve oksidatif stres oluşumu, spermatogenezi bozan skrotal

bölgede yağ dokusu birikmesi nedeniyle gonadal sıcaklığın artması ve leptin gibi hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) eksenini değiştirebilen çeşitli hormonların düzensizliğinden kaynaklı olabilmektedir (Martins ve diğ., 2019; Ali ve diğ., 2014).



Şekil 2.8: Metabolik sendromda hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin hormonal olarak düzenlenmesi (Martins ve diğ., 2019).

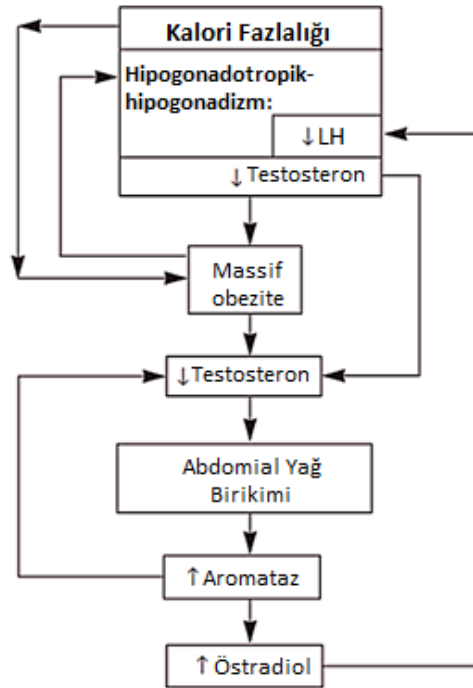
(FSH: Folikül uyarıcı hormon, LH: Luteinizan hormon, TG: Trigliseritler, VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein)

Cohen 1999 yılında obezitenin erkek infertilitesine olan etkisini açıklamak amacıyla hipogonadal obezite döngüsü hipotezini sunmuştur. Testosteron, trigliseritleri serbest yağ asitlerine parçalayan enzim olan adiposit lipoprotein lipaz aktivitesini inhibe etmektedir. Düşük testosteron seviyeleri ise merkezi obezite ve intra-abdominal yağ birikimine yol açmaktadır (Cohen, 1999). Bu hipotez göre yüksek aromataz aktivitesinden kaynaklanan düşük testosteron seviyelerinin, adipositleri ve yağ birikimini artırdığını ve testosteron seviyelerini de kademeli olarak daha da düşürdüğünü öne sürmektedir (Jones, 2007; Goel ve diğ., 2018). Obez erkeklerde, adipositlerdeki aromataz enziminin aktivitesindeki artış sonucu testosteronun estradiole periferik dönüşümü gerçekleşir ve düşük testosteron seviyelerine yol açar (Martins ve diğ., 2019). Aromataz ise bir sitokrom P450 enzimidir ve testisteki Leydig hücrelerinde ve adipoz dokusu dahil olmak üzere birçok dokuda yüksek oranda eksprese edilerek testosteronun östrojene dönüşümünü katalize eder (El-Shehawi ve diğ., 2020).

Estradiol, adipositokinler ve diğer faktörler hipotalamik-hipofiz-testis eksenini inhibe ederek hipogonadotropik hipogonadizm durumuna yol açar (Jones, 2007). Gonadotropinlerin azalması, testosteron üretiminin uyarılmasının da azalmasına sebep olur. Artan serbest yağ asidi

birikimi ise insülin direncine yol açmaktadır. Hiperinsülinik durum, Leydig hücreleri üzerindeki insülin reseptörlerinin mevcudiyetinin aracılık ettiği Leydig hücreleri tarafından testosteron salgılanmasında daha fazla azalmaya yol açar. Bu nedenle obezite sırasında adiposit ve hipofiz hormonları düzeyinde meydana gelen tüm değişiklikler metabolik sendromun patogeneze ve testosteron salgısının azalmasına katkıda bulunur (Goel ve diğ., 2018). Ayrıca yağ dokusunun skrotal damarlar çevresinde birikmesi, obez erkeklerde kanın soğumasını azalmasına ve testis sıcaklığını artırarak spermatogenezin azalmasına sebep olabilir (Martins ve diğ., 2019; Shafik ve Olfat, 1981; Shafik ve Olfat, 1981).

Yapılan çalışmalara göre erkek obezitesi, özellikle testiküler germ hücrelerinin ve olgun spermilerin fiziksel ve moleküler yapısını değiştirerekmesine, sperm motilitesini ve testosteron seviyelerinin azalması sonucunda sperm kalitesinde azalmaya sebep olur (El-Shehawi ve diğ., 2020). Benzer şekilde, obezitenin spermatid ve spermatozoa sayılarında ve ortalama günlük sperm üretiminde de azalmalara sebep olduğu bildirilmiştir (El-Shehawi ve diğ., 2020; Fernandez ve diğ., 2011; Fernandes ve diğ., 2012).



Şekil 2.9: Hipogonadal-obezite döngüsü (Cohen,1999).

2.6. APOPTOZ

Çok hücreli organizmaların hücre sayısı, yalnızca hücre bölünme hızını kontrol ederek değil, aynı zamanda hücre ölüm oranını da kontrol ederek sıkı bir şekilde düzenlenir. Hücrelere artık ihtiyaç yoksa, hücre içi bir ölüm programını etkinleştirerek intihar ederler. Bu nedenle bu sürece *programlanmış hücre ölümü* denir (Vitale ve diğ., 2023). *Programlanmış hücre ölümü* terimi başlangıçta gelişim sırasında hücre ölümüne yol açan koordineli olaylar dizisini tanımlamak için kullanılmıştır (Lockshin ve Williams, 1964). Kerr ve arkadaşları 1972 yılında, morfolojik olarak farklı bir hücre ölüm tipi olan *apoptosis* terimini kullanmış ve çok hücreli organizmaların normal gelişimi ve homeostazı sırasında önemli rollere sahip bir hücre ölüm tipi olarak tanımlamıştır. Apoptoz gelişimsel olarak düzenlenmektedir, ayrıca hücre hasarına veya strese yanıt olarak da uyarılabilmektedir (Elmore, 2007; Hikim ve Swerdloff, 1999). Örneğin radyasyon veya kanser kemoterapisinde kullanılan bazı ilaçlar, hücrelerde DNA hasarına neden olarak hücrede p53'e bağlı bir apoptotik ölüme yol açabilmektedir (Elmore, 2007).

Programlanmış hücre ölümü gelişim ve yaşlanma sırasında hücresel homeostazın sürdürülmesinde (Robertson ve diğ., 2009; Elmore, 2007) ve embriyonik gelişim sırasında ise konakçının viral enfeksiyonlara karşı savunmasında, organların ve dokuların şekillendirilmesinde, hücre sayısının fizyolojik olarak düzenlenmesi gibi önemli hücresel süreçlerin düzgün işleyişinin merkezinde yer almaktadır (Robertson ve diğ., 2009, Aitken ve diğ., 2011; Hikim ve Swerdloff, 1999). Ayrıca kanser, nörodejeneratif bozukluklar, ateroskleroz ve kardiyomiyopati gibi birçok çeşitli hastalığının patogeneğinde yer almaktadır (Hikim ve Swerdloff, 1999).

Apoptotik hücre ölümü apoptotik yolağın tetiklenmesi, proapoptotik proteinlerin aktivasyonu, kaspaz aktivasyonu ile hedef proteinlerin parçalanması, hücre içi organellerin bozulması ve yeniden düzenlenmesi, hücrelerin apoptotik cisimlere parçalanması, makrofajlar veya komşu hücreler tarafından ölen hücrelerin fagositoz ile ortadan kaldırılması adımlarından oluşmaktadır (Savitskaya ve Onishchenko, 2015).

Apoptoz sürecinde hücre hacminde azalma, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin oluşumunu içeren morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu süreçte gerçekleşen en belirgin biyokimyasal olay ise endonükleaz aktivitesiyle birlikte hücresel DNA'nın düzenli aralıklarla yerleştirilmiş nükleozomal birimlere (yaklaşık 200 baz çifti) parçalanmasıdır. Bu tür oligonükleozomal DNA parçaları, agaroz jel elektroforezde ayırt

edici merdiven deseni DNA görüntüsü oluştururlar. Bu karakteristik DNA merdiveni ise apoptozun ayırt edici özelliği olarak kabul edilmektedir. Ayrıca apoptotik hücrelerin plazma membranındaki fosfatidilserin asimetrisinde değişiklikler meydana gelmektedir (Kroemer ve diğ., 1995). Normal hücrelerde, fosfatidilserin, plazma membranının sitoplazmik tarafında bulunurken, apoptotik hücrelerde ise plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru yer değiştirerek fagositlerce bu hücrelerin tanınmasına imkân sağlamaktadır (Hikim ve Swerdloff, 1999). Apoptozun bir başka önemli özelliği ise ölü hücrelerin makrofajlar gibi fagositler tarafından etrafa saçılmadan hızlı bir şekilde temizlenmesidir (Kroemer ve diğ., 1995).

Apoptozun ana efektör bileşenleri, proteinlerdeki aspartat kalıntılarından sonra peptid bağına kıran bir sistein proteaz ailesi olan kaspazlardır (Savitskaya ve Onishchenko, 2015). Kaspazlar, hücrelerde aktif proteazlar üretmek için proteolitik olarak işlenen inaktif zimojenler olarak sentezlenmektedir (Robertson ve diğ., 2009; Elmore, 2007). Apoptozun uyarılması ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu, kaspaz aktivasyonuna neden olmaktadır. Kaspazlar aktive edildiğinde diğer pro-kaspazları da aktive ederek proteaz kaskadını başlatırlar. Bir kaspazın diğer kaspazları aktive ettiği bu proteolitik basamak, apoptotik sinyal yolunu güçlendirir ve hızlı hücre ölümüne yol açar. Kaspazlar apoptozun ana efektörleri olmalarına rağmen kaspazların tümü apoptoza katılmayarak megakaryositlerden trombosit oluşumu, gözün lens hücrelerinin oluşumu gibi normal hücre farklılaşması ve olgunlaşması gibi diğer hücrel olaylarda da görev alırlar (Robertson ve diğ., 2009).

Kaspazlar amino asit dizisine ve hücrel işlemlere katılımlarına göre temel olarak inflamatuvar ve apoptotik kaspazlar olarak iki gruba ayrılmıştır. Apoptotik kaspazlar başlatıcı ve efektör olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Her kaspaz tipinin değişken uzunlukta olan proteolizde görevli N-terminal prodomainleri bulunmaktadır. Efektör kaspazlar ~25 amino asitlik kısa bir prodomaine sahipken, başlatıcı kaspazlar ise 100-200 amino asitlik prodomain içerir. Başlatıcı kaspazların prodomaini bir CARD (*Caspase Recruitment Domain*) veya DED (*Death Effector Domain*) dizisi içermektedir (Savitskaya ve Onishchenko, 2015).

I-İnflamatuvar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5)

II-Apoptotik kaspazlar

a) Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2,8,9,10)

b) Efektör kaspazlar (Kaspaz-3,6,7)

Apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi ise Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Cory ve Adams, 2002). Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal membran geçirgenliğini düzenler. Pro-apoptotik veya anti-apoptotik etkilerle apoptozu düzenlemektedir. Bcl-2 protein ailesi, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinleri içermektedir. Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG; anti-apoptotik proteinlerken, Puma, Noxa, Bax, Bak, Bid ise pro-apoptotik proteinlerin bazılarıdır. Bu proteinler, hücrenin apoptoz etkinliğini belirleyebildiklerinden dolayı oldukça önemlidir. Bcl-2 protein ailesinin ana etki mekanizmasının, mitokondriyal membran geçirgenliği değişikliği yoluyla mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir. Tümör baskılayıcı protein olan p53'ün Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahip olduğu bilinmektedir (Schuler ve Green, 2001).

2.6.1. Apoptoz Mekanizmaları

Ekstrinsik (ölüm reseptörü yolu) ve intrinsik (mitokondriyal yol) olmak üzere iki ana apoptotik yol vardır (Robertson ve diğ., 2009; Elmore, 2007). Bu iki yol birbiriyle bağlantılıdır ve bir yoldaki moleküller diğerini etkileyebilmektedir (Elmore, 2007). Ekstrinsik yolda, proapoptotik sinyal molekülleri yüzey reseptörleri ile etkileşime girerek sitozolik kaspaz kaskadının aktivasyonuna neden olurken, intrinsik yol da ise mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi gibi çeşitli organellerden salınan proapoptotik proteinlerin etkisiyle kaspaz kaskadı aktive olabilir veya Bax, Noxa, Puma gibi proapoptotik proteinleri kodlayan genlerin uyarılmış ekspresyonu ile apoptotik programın aktivasyonuna neden olur (Savitsky ve Onishchenko, 2015; Robertson ve diğ., 2007).

2.6.1.1. Ekstrinsik Yol

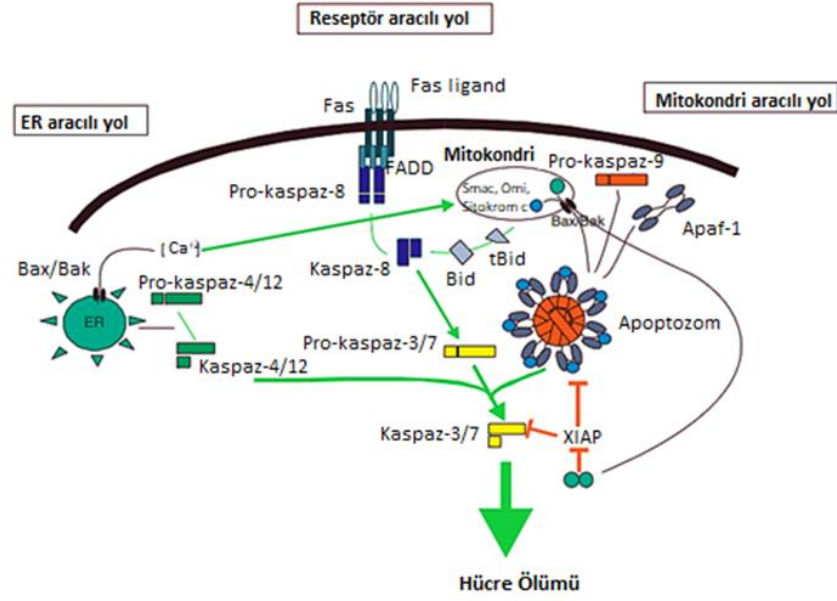
Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içermektedir. Bunlar, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) geni üst ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içermektedir (Locksley ve diğerleri, 2001). TNF reseptör ailesinin üyeleri benzer sistein açısından zengin olan ekstrasellüler domainlere ve "ölüm alanı" olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik domaine sahiptirler (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde etkilidir. FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 bugüne kadar en iyi karakterize edilen ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleridir (Chicheportiche ve diğerleri, 1997; Ashkenazi ve Dixit, 1998). Ölüm reseptörleri ligand ile bağlandıktan sonra oluşan kompleks sitoplazmada bulunan adaptör proteinlerle birleşir. Fas ligandı, Fas reseptörüne

bağlandıktan sonra adaptör protein olan FADD ile kompleks oluştururlar. Daha sonrasında FADD prokaspaz-8 ile birleşir ve prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonu ile sonuçlanan ölüme neden olan bir sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu olay kaspaz-8'in aktivasyonuna ve ardından hücre ölümüyle sonuçlanan aktif kaspaz-3'ün oluşumuna yol açar (Elmore, 2007).

2.6.1.2. İntinsik Yol

Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolları, doğrudan hücre içindeki hedeflere etki eden ve reseptör aracılı olmayan çeşitli uyarımları içermektedir. İntinsik sinyal uyarımlarının etkisiyle birlikte mitokondriyal permeabilite geçiş (MPT) porları açılır, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı gerçekleşir. Proapoptotik bir protein olan sitokrom C mitokondri membranları arası boşluktan sitozole salınarak iç mitokondriyal membranda değişikliklere neden olur. Sitoplazmaya salınan bu proapoptotik protein ise kaspaz bağımlı mitokondriyal yolun aktive olmasına sebep olur. Sitokrom c sitoplazmaya salındıktan sonra Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak "apoptozom" adlı yapıyı oluşturur (Chinnaiyan, 1999; Hill ve diğ., 2004). Apoptozom, kaspaz-9'u aktive etmek üzere keser ve ardından kaspaz-3'ün aktivasyonunu da içeren kaspaz kaskadını başlatır ve hücreyi ölüme götürür. Sitokrom c'ye ek olarak, apoptoz indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G ve Smac /DIABLO gibi diğer faktörler de proapoptotik etkilerini göstermek için membranlar arası boşluktan sitozole salınabilirler (Elmore, 2007).

Son zamanlarda Endoplazmik retikulum (ER), hücresel strese yanıt olarak intrinsik apoptotik kaskadı başlatabilen başka bir organel olarak tanımlanmıştır. ER, protein katlanmasında oldukça önemli işlevlere sahiptir ve bu katlanma işlevi bozulduğunda stres oluşumu meydana gelir. Bu nedenle ER, farklı uyarımlar tarafından tetiklenen hücresel homeostazdaki bozulmalara karşı son derece hassastır ve bu durum ise katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak bilinen bir stres tepkisinin uyarılmasıyla sonuçlanmaktadır. ER stresine yanıt olarak kaspaz-12 aktive edilir ve diğer kaspazları (kaspaz-3, kaspaz-9) da proteolitik bir zincir halinde aktiveleştirerek mitokondri kaynaklı yola benzer bir ölüm meydana getirir (Robertson ve diğ., 2007).



Şekil 2.10: Apoptotik sinyaller, kaskad oluşturan kaspazlar üzerinde birleşir.

Apoptotik tetikleyiciler intrinsik veya ekstrinsik olabilir ve farklı hücrel tepkiler uyandırır. Endoplazmik retikulum (ER) stresi ise ER'ye özgü bir yolun yanı sıra mitokondriye bağımlı yolun aktivasyonuna neden olmaktadır (Robertson ve diğ., 2007).

2.6.2. Testis ve Apoptoz

Son zamanlarda insan spermatozoasının yüksek seviyelerde DNA fragmentasyonu içermesiyle birlikte olgun spermatozoanın apoptoz geçirmesine olan ilgi son derece artmıştır. Bu DNA hasarı, spermatozoanın işlevselliğini tanımlamada önemli bir faktördür ve bozulmuş fertilizasyon, preimplantasyon ve artan düşük insidansı dahil olmak üzere çeşitli olumsuz klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (Aitken ve diğ., 2011).

Spermatogenez, sperm üretiminin ergenliğin başlangıcında başladığı ve ölüme kadar devam ettiği koordineli bir gelişim programıdır. Spermatogonyumların gelişimi ve spermatositlere farklılaşmasını, ardından spermatidlerin oluşumunu ve farklılaşarak olgun spermatozoa üretimini içeren bir süreçtir (Ruwanpura ve diğ., 2010; Sofikitis ve diğ., 2008). Normal koşullarda apoptoz spermatogenezin ayrılmaz bir parçasıdır (Ghosh ve Mukherjee, 2018). Germ hücreleri arasındaki dejenerasyon ve ölüm spermatogenezin herhangi bir aşamasında meydana gelebilmektedir (Aitken ve diğ., 2011). Yaşamın ilerleyen dönemlerinde apoptoz, çevresel toksik maddelere, kemoterapötik maddelere veya ısıya maruz kalmanın bir

sonucu olarak hasar gören germ hücrelerinin uzaklaştırılmasında yer almaktadır (Wang ve diğ., 2007).

Memelilerde meydana gelen testiküler germ hücre ölümü spermatogenez sırasında belirgindir ve germ hücre gelişiminin çeşitli aşamalarında gerçekleşmektedir (Hikim ve Swerdloff, 1999). Spermatogenezin ilk aşamalarında her bir sertoli hücresi, sperme dönüşecek yalnızca sınırlı sayıda eşey hücresini destekleyebileceği (Aitken ve diğ., 2011; Print ve Loveland, 2000) için germ hücreleri ve sertoli hücreleri arasındaki dengeyi sağlamak için doğumdan sonraki 2 ile 4 hafta arasında testislerde büyük bir apoptoz dalgası meydana gelmektedir (Ghosh ve Mukherjee, 2018; Wang ve diğerleri, 2017). Bu süreçteki apoptozun bozulması, germ hücresi ve sertoli hücre sayılarındaki dengesizliğe bağlı olarak bir erkek infertilitesinin gelişimine sebep olmaktadır (Aitken ve diğ., 2011; Bagi ve diğ. 2020).

Yapılan çalışmalarda, birçok türün normal spermatogenez sürecinde germ hücrelerinin spontan ölümünün gerçekleştiği görülmüştür (Weinbauer ve diğ., 2001; Shaha ve Mishra, 2010). Meydana gelen bu ölümlerin potansiyel spermatozoa oluşumunda ve semen kalitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Schaller ve ark., 2008; Mahfouz ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada sıçanlarda ve hamsterlarda, özellikle A tipi spermatogonium ve spermatositlerin mayotik bölünmeleri sırasında spontan apoptoz gözlenirken, farklı olarak insan testislerinde spermatogonium, spermatositler ve spermatidler dahil olmak üzere üç farklı germ hücre sınıfında da spontan germ hücre apoptozunun meydana geldiği görülmüştür (Hikim ve Swerdloff, 1999).

Obez erkeklerde gelişen infertiliteyle ilgili mekanizmaların artan skrotal sıcaklık, oksidasyon, inflamasyon ve apoptoz ile ilgili olduğu bilinmektedir (Ghosh ve Mukherjee, 2018; Hikim ve Swerdloff, 1999). Hücrel homeostaz ve erkek germ hücresi gelişimi için apoptoz gerekli olmasına rağmen, kısır erkeklerin spermatozoa hücrelerinde meydana gelen apoptozda bir artış görülmektedir. Yüksek yağlı diyet (HFD) tüketimiyle birlikte germ hücre apoptozuyla ilişkili olarak germ hücre kaybında artış, epitel yüksekliğinde ve seminifer tübül çapında azalma gibi testiküler morfometride önemli değişiklikler meydana geldiği bilinmektedir (Bagi ve diğ., 2020).

Apoptotik hücre ölümü, spermatogenez sırasında germ hücre popülasyonunun genişlemesini sınırlamak için oldukça önemli olmasına rağmen yapılan bir çalışmada obez sıçanlardan oluşan grupta patolojik düzeyde apoptoz gözlemlenmiş ve testiküler germ hücre

popülasyonunda önemli derecede azalmalar meydana gelmiştir (Choubey ve diğ., 2020). Ayrıca yüksek yağ ile beslenen bu sıçanların testislerinde intrinsik apoptotik yolun aktivasyonunu gösteren p53, Bax/Bcl2 oranı, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün mRNA transkript seviyelerinde önemli artışlar meydana gelmiştir (Bagi ve diğ., 2020). HFD uygulanarak yapılan bir başka çalışmada ise yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde germinal epitelde bozulmalar, sperm sayısında azalma ve yüksek apoptotik indeks görülmüştür. HFD ile uzun süre beslenmenin apoptotik germ hücrelerinin gözlemlenmesiyle birlikte bu beslenme tarzının testis histomorfolojisini bozduğu ve sperm defektlerine neden olduğu görülmüştür (Ghosh ve Mukherjee, 2017). T2DM (*Tip 2 Diabetes Mellitus*) farelerle yapılan bir başka çalışmada ise, T2DM'a sahip farelerin testislerinde anormal histomorfolojinin eşlik ettiği apoptotik hücre sayısında önemli artışlar gözlemlenmiştir. Ayrıca bu hayvanların testis doku kesitlerinde yüksek TUNEL-pozitif hücreler de gözlemlenmiştir (Zheng ve diğ., 2018).

Genel olarak germ hücrelerinde meydana gelen apoptozun üreme sürecini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Ayrıca zigot oluşumunda önemli bir adım olan zona pellusidanın sperm tarafından aşılması için gerekli olan akrozin ve hyaluronidaz enzimleri apoptoz kaynaklı olarak gelişen sperm başındaki hasarlardan ve düşük semen yoğunluğundan dolayı bu fonksiyonu etkili bir şekilde gerçekleştiremeyerek füzyonda başarısızlık yaratarak infertilite gelişimine sebep olurlar (Zheng ve diğ., 2018).

2.7. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, yaygın olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak bilinen oksijen ve oksijen türevli oksidanların neden olduğu artan hücresel hasar oranıyla ilişkili bir durumdur. ROS üretimi ile biyolojik sistemin reaktif ara ürünleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizlik sonucu oksidatif stres oluşmaktadır (Bansal ve Bilaspuri, 2011). Reaktif oksijen türleri biyolojik sistemler tarafından metabolik yan ürünler olarak esas olarak mitokondri tarafından üretilmektedir (Bansal ve Bilaspuri, 2011; Pizzino ve diğ., 2017). Yüksek oranda reaktif olmalarından kaynaklı olarak reaktif oksijen türleri diğer moleküllerle kolayca birleşebilir, doğrudan oksidasyona neden olabilir ve yapısal, fonksiyonel değişikliklere yol açarak hücresel hasara neden olurlar (Bansal ve Bilaspuri, 2011).

Süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijen yaygın olarak bilinen reaktif oksijen türleridir (Pizzino ve diğ., 2017). ROS üretimi temel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla gerçekleşmektedir. Solunum zinciri, prostaglandin sentezi, fagositoz ve sitokrom P450 sisteminde yer alan enzimatik reaksiyonlar

ROS üretebilir (Halliwell ve Gutteridge, 2007; Young ve Woodside, 2001). Örneğin süperoksit radikali, NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve peroksidazların etkinliği ile üretilmektedir. Üretildikten sonra, sırasıyla hidrojen peroksit, hidroksil radikali, peroksinitrit, hipokloröz asit üreten çeşitli reaksiyonlarda yer almaktadır (Pizzino ve diğ., 2017). Oksijen organik bileşiklerle reaksiyona girdiğinde veya hücreler iyonlaştırıcı radyasyona maruz kaldığında da yani enzimatik olmayan reaksiyonlarla da serbest radikal üretimi gerçekleşmektedir. Enzimatik olmayan ROS üretimi mitokondriyal solunum sırasında da meydana gelebilmektedir (Valko ve diğ., 2007; Droge, 2002).

Reaktif oksijen türleri hem endojen hem de eksojen kaynaklardan üretilmektedir. İmmün hücre aktivasyonu, inflamasyon, iskemi, enfeksiyon, kanser ve yaşlanma endojen üretiminden sorumluyken, çevresel kirleticiler, ağır metaller (Cd, Hg, Pb, Fe ve As), bazı ilaçlar (siklosporin, takrolimus, gentamisin), kimyasal çözücüler, sigara dumanı, alkol ve radyasyon maruziyetinin bir sonucu olarak da eksojen üretimi gerçekleşmektedir (Valko ve diğ., 2007). Bu eksojen bileşikler vücuda girdiğinde metabolize edilerek yan ürünler olarak ROS üretirler (Pizzino ve diğ., 2017).

Düşük ve kontrollü ROS üretiminin protein fosforilasyonu, transkripsiyon faktör aktivasyonu, apoptoz, immün sistem (patojenlerle savaşma) ve farklılaşma gibi süreçlerde etkili olduğu bilinmektedir. ROS üretiminde bir artış söz konusu olduğunda ise proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi önemli hücre yapısı üzerinde zararlı etkiler oluşturmaktadır (Wu ve diğ., 2013). Çok sayıda kanıt, oksidatif stresin kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıkların başlamasından ve ilerlemesinden sorumlu olabileceğini göstermektedir (Taniyama ve Griendling, 2003; Pizzino ve diğ., 2017).

2.7.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Testis

Oksidatif stres, infertiliteye neden olan önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Oksidatif stres, vücuttaki reaktif oksijen türleri ile antioksidanlar arasındaki dengesizliğin bir sonucudur ve sperm hasarına neden olarak erkek infertilitesinin gelişimine yol açmaktadır (Bansal ve Bilaspuri, 2011). ROS'un düşük ve kontrollü konsantrasyonlarının sperm-oosit etkileşimleri, implantasyon ve erken embriyo gelişimi (Lamirande ve diğ., 1997; Sakkas ve diğ., 1998) gibi üreme süreçlerini etkilediği, spermin kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon yeteneğinin sürdürülmesi gibi fizyolojik süreçlerde de rol oynadığı bilinmektedir (Barretto ve diğ., 2010; Desai ve diğ., 2009). Seminal plazmanın antioksidan kapasitesini aşan kontrolsüz ROS üretimi ise spermatozoa için zararlı olan oksidatif strese yol

açar (Desai ve diğ., 2010) ve yetersiz aksonemal fosforilasyona, lipid peroksidasyonuna, motilite ve canlılık kaybına yol açan sperm patolojisine neden olmaktadır (Bansal ve Bilaspuri, 2011).

ROS, sperm plazma membranı, DNA ve fizyolojik süreçler üzerinde olumsuz etkilere neden olarak sperm kalitesini etkilemektedir (Bansal ve Bilaspuri, 2011). Oksidatif stres özellikle lipid peroksidasyonuna ve oksidatif DNA hasarının indüklenmesine neden olarak memeli spermatozoasının işlevini sınırlamaktadır. Mitokondriyal ROS oluşumunun sonucu olarak intrinsik apoptotik kaskad başlar ve bunun sonucunda ise spermatozoa hareketliliğini, canlılığını ve DNA bütünlüğünü kaybeder (Aitken ve diğ., 2012).

Memeli spermatozoa membranları, çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengindir ve lipid peroksidasyonunun aracılık ettiği oksijen kaynaklı hasara karşı oldukça hassastır (Rao ve diğ., 1989; Peltola ve diğ., 1992). Bu çoklu doymamış yağ asitleri spermin dölleme ile ilişkili membran füzyon olaylarına girmesine yardımcı olarak sperm membranına akışkanlık ve esneklik sağlamaktadır (Bansal ve Bilaspuri, 2011). Ancak bu moleküllerdeki çift bağların varlığı, onları serbest radikallerin ve lipid peroksitlerin saldırısına karşı savunmasız hale getirmektedir. Lipid peroksitler, sperm plazma membranında kendiliğinden üretilir ve fosfolipaz A2'nin etkisiyle salınırlar. Bu peroksitler sperm membran bütünlüğüne zarar vererek sperm motilitesinde, hücre fonksiyonlarında bozulmalara ve apoptozu uyarılmasına neden olarak infertiliteye neden olurlar (Bucak ve diğ., 2010).

Azot oksit, peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türleri ise serbest nitrojen radikalleridir ve ROS'un bir alt sınıfı olarak kabul edilir (Sikka ve diğ., 2001; Wiseman ve diğ., 1995). Nitrik oksidin normal sperm fonksiyonları üzerinde hem hareketliliği hem de zona pelucidiya bağlanması için sperm yetkinliğini engelleyen zararlı etkileri olduğu bilinmektedir (Agarwal ve diğ., 2008).

Obezite, vücutta biriken yağlarda üretilen büyük miktarlardaki serbest radikaller nedeniyle oksidatif stres ile ilişkili olan erkek üreme bozukluklarının gelişimindeki ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Manna ve Jain, 2015; Rani ve diğ., 2016). Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin, obeziteyi çeşitli hastalıklara bağlayan nedensel faktörlerden biri olduğunu göstermiştir (Yang ve ark., 2006). Bunun nedeni, plazma serbest yağ asitlerinde (FFA) ve ektopik bölgelerde depolanan yağ miktarında meydana gelen yükselişlerdir. Bu durum ise adenin nükleotitlerinin translokasyonunu engelleyerek mitokondriyal elektron taşıma zincirinde süperoksit radikali (O_2^-) oluşumuna yol açar (Morais ve diğ., 2017). FFA, vücut

hücrelerinde NADPH oksidazın Protein kinaz C (PKC) 'ye bağlı aktivasyonu yoluyla reaktif ara ürünlerin üretimini uyarır. Sonuç olarak oksidasyona, oksijen radikali oluşumuna ve oksidatif yan ürünlerin birikmesine yol açar (Manna ve Jain, 2015).

Membran peroksidasyon ürünü olan MDA (malondialdehit) ise hücre için zararlı olan artmış oksijen radikalleri tarafından üretilmektedir (Valavanidis, 2019). MDA, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar oluşturarak membran taşıyıcı proteinlerini immobilize ederek (Halliwell ve Chirico, 1993) membran permeabilitesini arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmada HFD (yüksek yağ içeren diyet) ile beslenen farelerde testis MDA miktarında önemli bir artış ve süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde de azalmalar gözlemlenmiştir (Nematollahi ve diğ., 2019). Yapılan başka bir çalışmada ise yüksek miktarlarda reaktif oksijen türlerine uzun süre maruz kalma sonucu azalan sperm kemotaktik yanıtının, antioksidan tedavi ile önemli ölçüde düzeltilebileceği yüksek yağlı diyet (HFD) ile beslenen farelerde gözlemlenmiştir (Sánchez ve diğ., 2010).

2.8. VİTAMİN D

Vitamin D (VitD), steroid hormonlara benzer biyokimyasal yapıya sahip yağda çözünen bir prohormondur (Angelis ve diğ., 2017; Rodríguez ve diğ., 2021). VitD'nin endokrin, parakrin ve otokrin fonksiyonları bulunmaktadır. Endokrin fonksiyonları esas olarak kalsiyum ve fosfat homeostazını etkileyerek mineral iyon metabolizmasının düzenlenmesinde yer alır (Razzaque, 2017; Prasad ve Kochhar, 2016). Parakrin ve otokrin etkileri ise hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını etkileyerek hücresel homeostazı düzenlemektedir. Bu vitaminin eksikliği, kanser ve yaşlanma gibi patolojilerin oluşumuna sebep olabilmektedir (Sofi ve diğ., 2017; Heaney, 2008).

VitD'nin ana kaynağı yaklaşık %80 ile kolesterolün öncüsü olduğu 7-dehidrokolesterolden ciltte güneş ışığı/UVB etkisi ile sentezlenen kolekalsiferol veya D3 vitaminidir. VitD'nin yaklaşık olarak %20'si ise diyetle hayvansal (kolekalsiferol) ve bitkisel (ergokalsiferol) gıdalardan alınmaktadır (Rodríguez ve diğ., 2021; D'Amelio, 2021). Somon ve uskumru gibi yağlı balıkların dahil olduğu çok az gıda doğal olarak VitD içerdiğinden (Holick ve Chen, 2008) besin kaynaklı olarak eksikliğini gidermek amacı ile VitD takviyeleri (Razzaque, 2017) de alınabilmektedir. VitD diyetle alındığı için bir besin maddesi olarak kabul edilebileceği gibi deri tarafından da sentezlenebildiği, böbrek ve karaciğerde uğradığı iki

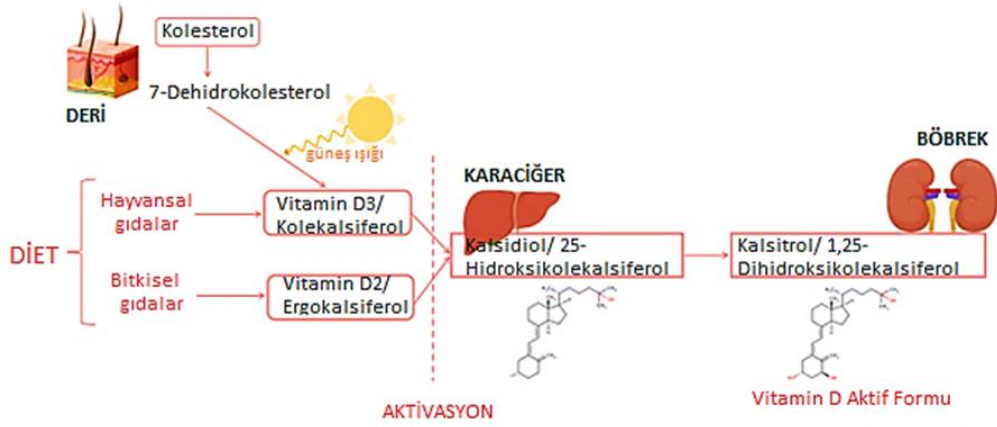
hidroksilasyon reaksiyonundan sonra kalsiyum ve fosfat metabolizmasını düzenleme yeteneği kazandığı için bir hormon olarak kabul edilmektedir (D'Amelio, 2021).

VitD'nin hedef organları bağırsak, iskelet sistemi, böbrek ve paratiroid bezleri olmasına rağmen son yıllarda yağ dokusu, tiroid, üreme organları, pankreas, kardiyovasküler sistem ve merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere bu spektrum büyük ölçüde genişlemiştir (Angelis ve diğ., 2017). Vücudun aktif olarak VitD sentezleme yeteneğine rağmen, 'hipovitaminoz D' yani VitD eksikliği genel popülasyonda büyük ölçüde yaygındır ve yaşa göre arttığı da bilinmektedir (D'Amelio, 2021). VitD eksikliği hiperparatiroidizm, raşitizm ve osteomalazi ile ilişkilidir, ancak obezite, tiroid disfonksiyonu, otoimmün hastalıklar, Diabetes Mellitus, kardiyovasküler hastalıklar, demans gibi birçok hastalıkta da risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Angelis ve diğ., 2017).

2.8.1. Vitamin D Sentez ve Metabolizması

VitD'nin ana kaynağı, kolesterolün öncüsü olduğu 7-dehidrokolesterolden ciltte güneş ışığı ile sentezlenen kolekalsiferol veya vitamin D3'tür (Rodríguez ve ark. 2021; Angelis ve ark., 2017) VitD organizmada biyolojik olarak aktif hale gelmek için birincisi karaciğerde ve ikincisi böbrekte olmak üzere iki hidroksilasyona ihtiyaç duyar (Zanuy ve diğ., 2007).

Biyolojik olarak aktif formuna dönüştürülebilmek için Vitamin D bağlayıcı proteine (DBP) bağlanan kolekalsiferol (D3 vitamini) karaciğere taşınır ve 25. karbonunda bir mikrozomal enzim olan 25-hidroksilazın katalizlediği hidroksilasyon reaksiyonu meydana gelir (Angelis ve diğ., 2017). Gerçekleşen birinci hidroksilasyon reaksiyonu sonunda vitamin D3'ün dolaşımdaki ana formu olup nispeten daha düşük biyolojik aktiviteye sahip olan 25-hidroksikolekalsiferol üretilir. Karaciğerden salınan 25-hidroksikolekalsiferol DBP'ye bağlı halde böbreğe taşınır ve 1 α -hidroksilaz enzimi tarafından 1. karbonun hidroksilasyonu gerçekleşerek biyolojik olarak VitD'nin en aktif formu olan 1,25-dihidroksikolekalsiferol oluşumuna yol açar (Prasad ve Kochhar, 2016). 24-hidroksilaz enzimi ise böbrekte ve diğer hedef organlarda eksprese edilerek vitamin D3'ün dolaşımdaki formlarının inaktivasyonunda görev alır (Henry, 2011; Veldurthy ve diğ., 2016).



Şekil 2.11: Vitamin D sentez yolları (Rodríguez ve diğ., 2021).

VitD, fizyolojik etkilerini Vitamin D reseptörünün (VDR) bağlanması ve aktivasyonu yoluyla göstermektedir (Prasad ve Kochhar, 2016; Duprez ve diğ., 1994). Klasik nükleer VDR ve klasik olmayan membran VDR olmak üzere iki tip VDR bulunmaktadır. Nükleer VDR, VitD'nin genomik etkilerine aracılık ederken, membranda bulunan VDR ise genomik olmayan etkilerine aracılık etmektedir. Genomik etki, hedef gen ekspresyonunun doğrudan bir modifikasyonu ile sonuçlanırken, genomik olmayan etki ise birkaç hücre fonksiyonunu modüle eden hücre içi sinyal iletim yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Klasik VDR, nükleer reseptörlerin süper ailesine aittir ve DNA'ya bağlanan bir transkripsiyon faktörüdür (Haussler ve diğ., 2011; Angelis ve diğ., 2017). Hedef hücrelerde, VDR sitoplazmada lokalizedir ve ligandla bağlandıktan sonra retinoid X reseptörü (RXR) ile bir heterodimer oluşturur ve bu kompleks vitamin D'ye duyarlı elementler (vitamin-D responsible elements) olarak adlandırılan spesifik DNA bölgeleri ile etkileşime girdiği nukleusa yer değiştirirerek gen transkripsiyonunu düzenler (Prasad ve Kochhar, 2016; Angelis ve diğ., 2017.). VDR-RXR kompleksi insan genomunun yaklaşık olarak yüzde %3'ünü düzenlemektedir (Bouillon ve diğ., 2008). VitD'nin genomik olmayan etkileri, ilk olarak bağırsak hücrelerinin hücre zarında keşfedilen, membranda bulunan VDR'nin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Haussler ve diğ., 2011, Zanatta ve diğ., 2011; Norman ve diğ., 2002). Membran VDR, doğrudan gen ifadesinin düzenlenmesinde rol almasa da kinazlar, fosfatazlar ve ikinci habercileri içeren hücre içi sinyal yollarında görev almaktadır (Zanatta ve diğ., 2011).

2.8.2. Vitamin D'nin Erkek Üreme Sistemine Olan Etkisi

VitD'nin erkek üremesiyle ilgili rolü, hayvanların ve insanların erkek üreme sisteminde VDR ve VitD metabolize edici enzimlerin (25-hidroksilaz, 1 α -hidroksilaz ve 24-hidroksilaz) ekspresyonu ile desteklenmiştir (Angelis ve diğ., 2017; Ponce ve diğ., 2016; Hofer ve diğ., 2014). VDR insan gonositlerinde, leydig hücrelerinde ve olgunlaşmamış sertoli hücrelerinde gestasyonun 16. haftasından itibaren eksprese edilmektedir. Bu durum ise VitD'nin gelişmekte olan gonadda muhtemel bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Blomberg ve diğ., 2012).

VDR'nin ekspresyonu, hayvan erkek üreme sisteminde geniş çapta araştırılmıştır, en çok çalışılan hayvan modeli ise kemirgenlerdir (Angelis ve diğ., 2017). VDR protein ekspresyonu, prostat, seminal veziküller, epididimis ve spermatogonum, spermatositleri içeren bir grup germ hücresinde ve Sertoli hücreleri olmak üzere testiste bulunmaktadır (Zanatta ve diğ., 2011, Zamoner ve diğ., 2011; Zanatta ve diğ., 2011). VitD metabolize edici enzimler ise başlıca testis olmak üzere neredeyse tüm üreme organlarında bulunmaktadır. Testislerde özellikle somatik veya germ hücrelerinde bulunması VitD'nin lokal olarak sentezlenebileceğini ve metabolizmasının sistemik VitD'den bağımsız olarak lokal olarak düzenlenebileceğini göstermektedir. Ayrıca, testisteki VDR ekspresyonu ise lokal olarak üretilen VitD'nin otokrin ve parakrin etki göstererek testis işlevinin düzenlenmesinde rol oynayacağını dolayısıyla erkek fertilitasını de etkileyebileceğini düşündürmektedir (Angelis ve diğ., 2017).

Steroidogenez sonunda salgılanan testosteron, yetişkin memeli testislerinde (Carreau ve diğ., 1999) leydig hücrelerinde eksprese edildiği bilinen aromataz enzimi (CYP19A1) ile östrojenlere veya 5 α -redüktaz aktivitesi ile daha aktif androjen olan dehidrotestosterona dönüştürülebilir. Östrojenler, spermatogenezin potansiyel düzenleyicileri oldukları için normal erkek üremesi için oldukça önemlidir (Carreau ve diğ., 2010). VDR knockout edilen farelerle yapılan bir çalışmada gonadal yetmezlik, azalmış sperm sayısı ve hareketliliği ile birlikte testiste histolojik anormallikler gözlemlenmiştir. Ayrıca testis ve epididimiste azalmış gonadal aromataz aktivitesi de görülmüştür. Bu azalmış aromataz aktivitesi, steroidogenez dahil olmak üzere testis fonksiyonu için östrojenlerin önemini göstermektedir (Ponce ve diğ., 2016). Ayrıca 1,25-dihidroksikolekalsiferol'ün aromataz gen ekspresyonunu doku spesifik olarak değiştirdiği bilinmektedir (Krishnan ve diğ., 2010). Meme kanseri hücre hatlarında, Vitamin D tedavisi aromataz gen ekspresyonunda azalmaya neden olurken, aynı tedavi osteosarkom hücre hatlarında aromataz gen ekspresyonunda artışa neden olmuştur. 1,25-dihidroksikolekalsiferol'ün bu nedenle doku seçici bir aromataz modülatörü olduğu öne sürülmektedir (Lundqvist, 2014).

Hipotalamus ve hipofiz bezinde de VDR bulunmaktadır (Angelova ve diğ., 2014). Bu durum Vitamin D'nin hipofiz hücrelerinin gen ekspresyonunda ve hormon salgılanmasında düzenleyici işlevlere sahip olabileceğini göstermektedir (Hofer ve diğ., 2014). Dolayısıyla testosteron salgılanmasına da etki ederek gonadal fonksiyon üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir (Angelova ve diğ., 2014). Blomberg Jensen ve meslektaşları (2011) yapmış oldukları bir çalışmada ejaküle edilmiş olgun spermde, aktive edilmiş Vitamin D'nin, hücre içi IP3 (*Inositol Trisfosfat*) reseptörü aracılığı ile kalsiyum salınımı uyarıp hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığını insan spermatozoasının boyun kısmında *in vitro* olarak göstermişlerdir. Bu kalsiyum deposu ise sperm motilitesini artırmakta ve akrozom reaksiyonunu da uyarmaktadır (Jensen ve diğ., 2011). Bu nedenle optimal sperm fonksiyonu VitD'nin doğrudan etkisine bağlı olabilir veya kalsiyum homeostazından dolaylı olarak etkilenebilmektedir (Ponce ve ark., 2016).

2.8.3. Metabolik Sendrom ve Vitamin D İlişkisi

Vitamin D, kalsiyum-fosfat metabolizmasının düzenleyicisi olarak bilinen rolünün yanı sıra, kas kuvvetinin düzenlenmesi, bağışıklık sistemi modülasyonunda (Sassi ve diğ., 2016) ve metabolizma gibi çeşitli yolların düzenlenmesinde yer almaktadır (D'Amelio, 2021). VitD'nin başlıca kaynağı olan güneşe maruziyetin farklı coğrafi bölgelerde değişkenlik göstermesi, VitD'nin serum konsantrasyonlarını etkilemektedir. Ekvatordan daha uzakta yaşayan popülasyonlarda güneşe maruziyet azaldığından kaynaklı olarak hipovitaminoz sıklığı ve dolayısıyla potansiyel diyabet veya MS gelişme riski daha yüksektir. Bunun yanı sıra giyim alışkanlıkları, ten rengi ve güneş kremi kullanımındaki farklılıklar da önemli faktörlerdir (Rodríguez ve diğ., 2021).

MS' nin özellikleri dikkate alındığında, düşük Vitamin D seviyeleri obezite, bozulmuş glikoz metabolizması ve yüksek kan basıncı ile ilişkilendirilmiştir (D'Amelio, 2021). Kardiyovasküler risk faktörü olarak obezite, yetersiz VitD ile yakından ilişkilidir ve yapılan çalışmalar obezitenin daha düşük VitD seviyelerine yol açtığını göstermiştir (Earthman ve diğ., 2012; Vimalaswaran ve diğ., 2013). Obez bireylerin cildinin güneş ışığına daha az maruz kalması sonucu VitD sentezinin azalması (Florez ve diğ., 2007; Kull ve ark., 2009), daha az VitD alımı (Kamycheva ve diğ., 2009; Wortsman ve diğ., 2000) ve bariatrik cerrahi geçirenlerde VitD'nin bağırsak emiliminin azalmasından kaynaklı olarak (Aarts ve diğ., 2011; Shapses ve diğ., 2012) obezite sırasında düşük VitD durumu gelişmektedir (Prasad ve Kochhar, 2016). Bu hastalar, kardiyovasküler hastalıklar için daha yüksek risk altındadır ve visseral

yağlanmada artış, daha yüksek insülin duyarlılığı ve inflamasyon derecesi ancak daha düşük kardiyorespiratuar kapasite ile karakterizedir (Blüher, 2020).

Yapılan bir çalışmada VitD takviyesinin, lipid profili, insülin direnci, hiperglisemi, obezite ve hipertansiyon gibi MS ile ilişkili hastalıkların tedavisinde yararlı bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Ferreira ve diğ., 2020). Lemieux ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada 6 ay boyunca günlük 5000 IU Vitamin D takviyesinin insülin duyarlılığını ve pankreatik β hücre aktivitesini artırdığını göstermiştir (Lemieux ve diğ., 2019). Vitamin D takviyesinin vücut kitle indeksinin ve bel çevresinin azalmasına katkıda bulunabileceği (Perna, 2019) ve 3 ay boyunca 2 haftada bir 50.000 IU VitD takviyesi uygulamasından sonra trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL) seviyelerinde de önemli bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Ghaderi ve diğ., 2017).

VitD'nin MS üzerinde gerçekleştirdiği olası etkilerinden kaynaklı olarak biz de yapılmış olan bu tez çalışmasında metabolik sendromlu erkek sıçanlara uygulanan VitD takviyesinin özellikle infertilite açısından testis dokusuna nasıl etki ettiğini görmeyi amaçlamaktayız.



3. YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan serum örnekleri ve testis dokuları, İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Mehmet Akif Ersoy Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Deneysel Araştırma, Geliştirme ve Eğitim Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ndan izin alınarak yapılan “Diyete Bağlı Endotel Hasarı Oluşturulan Ratlarda RANKL/OPG Sinyal Yolağı Aktiviteleri” başlıklı projeye ait arşiv materyalleridir. Bu tez çalışması için İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı’ndan (İÜC-HADYEK) 22.03.2022-342013 sayılı kararı ile Etik Kurul Onayına gerek olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Hayvan deneyinde (Tablo 3.1) ve immünohistokimya yönteminde kullanılan kimyasallar (Tablo 3.2) ilgili tablolarda belirtilmiştir.

Tablo 3.1 Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar

Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar	Markası
Vitamin D	Devit-3 300.000 IU/ml I.M/ORAL Ampul, Deva İlaç
D-(-)-Fruktoz	Merck
Ksilazin	Basilazin %2, Bavet İlaç
Ketamin	Ketax
Formaldehit	EMBOY
%10 formol salin	Manuel hazırlandı
İzotonik NaCl çözeltisi	Polifarma

Tablo 3.2 İmmünohistokimyada kullanılan kimyasallar.

İmmünohistokimyada Kullanılan Kimyasallar	Markası
Fosfat Tamponu (PBS Tablet)	MP Biomedicals
Antibody Diluent, 125ml	Thermo Scientific
Large Volume AEC Substrate System, 125ml	Thermo Scientific
Sitrat Tamponu (pH:6), 1L	Sigma,
Hematoksilen (Mayer's modified)	Abcam
Toluen Gr For Analysis, 2,5 lt	Merck
Ethanol Absolute Gr For Analysis, 2,5 lt	Merck
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Merck

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Bu tez çalışması sırasında kullanılan cihazlar (Tablo 3.3) ve sarf malzemeleri (Tablo 3.4) ile ilgili tablolarda aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	Markası
Etüv	Elektro-Mag M420B
Sterilizatör	Elektro-Mag M420
Distile su cihazı	Millipore Elix3
Işık Mikroskobu	Leica (DM 2500)
Işık mikroskobu kamerası	Leica (DFC 280)
Mikropipetler	MediSis, Ependorf
Mikrotom	Reichert 390965
Su banyosu	Köttermann
Buzdolabı	İndesit
Derin dondurucu (-20)	Bosch
Mikrodalga fırın	Kenwood
Hassas terazi	Ohaus Galaxy 4000
Vorteks	Elektro-Mag M16

Tablo 3.4: Kullanılan sarf malzemeler

Kullanılan Sarf Malzemeler
Pozitif Yüklü Lam (72'li Kutu)
Lamel (24x60 mm, 24x32 mm)
Santrifüj tüpleri (1ml, 1.5ml, 2ml)
Pipet uçları
Posteur pipet
Cam mezür, şale, beher
Hidrofobik kalem
Mikrotom Bıçağı
İmmünohistokimya boyama kabı (Chamber)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deneysel Hayvan Modelinin Oluşturulması

Metabolik Sendromun (MS) testis dokusu üzerine etkilerini inceleyebilmek için %17 yağ ve %17 fruktoz içeren yem ve %20'lik fruktozlu su içeren diyet ile metabolik sendrom modeli oluşturuldu (Gancheva S ve ark. 2015). Çalışmaya 24 adet erkek *Sprague Dawley* sıçan dahil edildi ve sıcaklığı 21°C olan 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık zaman periyodu ayarlanmış ortamda deneyler gerçekleştirildi. Deney hayvanları rastgele olarak Metabolik sendrom ve sağlıklı kontrol grupları olmak üzere iki gruba ayrıldı. Ardından Vitamin D uygulanan ve Vitamin D uygulanmayan olmak üzere 4 farklı deney grubu oluşturularak 15 hafta boyunca hayvanların takibi yapıldı. Deney 15. haftanın sonunda sonlandırıldı.

Çalışmaya katılan deney hayvanlarından 4 grup oluşturuldu:

Grup I: Sağlıklı Kontrol (SK) Grubu (n=5): Deney süresince çeşme suyu ve standart yem verildi.

Grup II: Metabolik Sendrom (MS) Grubu (n=7): 15 hafta boyunca her gün %20'lik fruktozlu su ve %17 yağ ve %17 fruktoz içeren yem ile beslendi.

Grup III: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup (MSD) (n=7): Deney süresince %20'lik fruktozlu su ve %17 yağ ve %17 fruktoz içeren yem ile beslenerek MS modeli oluşturulan sıçanlara deneyin 3. haftanın sonundan itibaren 12 hafta boyunca haftada 1 kez oral olarak vitamin D uygulaması (170 IU/hafta, oral) yapıldı (Elseweidy ve ark. 2017, Anapalı ve ark. 2022).

Grup IV: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup (SKD) (n=5): Deney süresince verilen çeşme suyu ve standart yem dışında deneyin 3. haftasının sonundan itibaren haftada 1 kez olmak koşuluyla 12 hafta oral vitamin D uygulaması (170 IU/hafta, oral) yapıldı.

Tüm gruptaki deney hayvanlarının deneyin başlangıcında, Vitamin D uygulaması yapılmadan önce deneyin 3. haftasında ve deneyin sonlandırıldığı 15. haftada açlık kan glukoz ölçümleri glukometer cihazı (IME-DC) ile yapıldı. Ayrıca düzenli olarak her hafta ağırlık, ölçümleri yapıldı. Deney sonunda hayvanlara intraperitonel olarak ketamin-HCl (50 mg/kg) ve ksilazin-HCl (10 mg/kg) uygulanarak sedasyonu sağlandıktan sonra kalplerinden alınan kan örneklerinin 1800xg'de 15 dakika santrifüjle serumları ayrılarak -80°C'de biyokimyasal testler yapılmak üzere saklandı.

3.2.2. Dokuların Morfolojik İncelenmesi

3.2.2.1. Doku Takibi

Deney sonunda alınan testis doku örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formalin ile +4°C'de bir gece fikse edildi. Ardından dokular yükselen alkol serisinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek parafine gömüldü. Hazırlanan parafin doku bloklarından mikrotom (Reichert 390965, ABD) yardımıyla 5 µm'luk parafin doku kesitleri pozitif şarjlı lamalar üzerine alındı.

Testis doku kesitlerinin morfolojik incelemesi için Hematoksilen-Eozin, ve PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyaması yapıldı. Hematoksilen-eozin boyaması yapılmış olan doku kesitlerinin Leica DM 2500 model ışık mikroskobu ve kamera sistemi kullanılarak x100 büyütmede rastgele olarak seçilmiş 10 farklı seminifer tübülün görüntülenmesi yapıldıktan sonra Leica LAS programı yardımıyla seçilen seminifer tübüllerin çapları ve epitel kalınlığı, PAS boyaması yapılmış doku kesitlerde ise x200 büyütmede rastgele olarak 20 farklı tübül seçilerek bazal membran kalınlıkları ölçüldü. Ayrıca doku kesitlerinde rastgele olarak seçilmiş 10 farklı seminifer tübülün Johnsen skorlaması da yapıldı (Tablo 3.5) (Johnsen, 1970).

Tablo 3.5: Johnsen skorlaması (Johnsen, 1970)

Skor 1	Seminifer tübüllerde hücre yok.
Skor 2	Germ hücreleri yok sadece sertoli hücreleri var.
Skor 3	Spermatogonyumlar mevcut olan tek eşey hücreleridir.
Skor 4	Spermatid yok, sadece birkaç spermatosit mevcut.
Skor 5	Spermatid yok, birkaç veya çok sayıda spermatosit var.
Skor 6	Sperm yok, birkaç spermatid mevcut.
Skor 7	Sperm yok, çok sayıda spermatid mevcut.
Skor 8	Seminifer tübül lümeninde 10'dan az sperm mevcut.
Skor 9	Çok sayıda sperm var, ancak germinal epitel lümenin belirgin şekilde dökülmesi veya obliterasyonu ile düzgün olmayan görünüme sahip.
Skor 10	Germinal epitel lümeni açık, bol spermatozoa ve tam spermatogenez mevcut.

3.2.2.2. Hemotoksilen-Eozin (HE) Boyama Protokolü

1. Boyanacak doku kesitleri etüvde (56°C) 1 saat tutulduktan sonra toluolden geçirilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi.
2. Dokulara yeniden su verilmesi için kesitler 3'er dakika sırasıyla azalan alkol serisinden (%100-%96-%70) geçirildikten sonra distile suya indirildi.
3. Hücrelerin nukleusları Hematoksilen ile 30 dakika boyandı.
4. Doku kesitleri üzerindeki fazla boyanın giderilmesi için kesitler çeşme suyuyla yıkandıktan sonra kesitler diferansiyasyon için %1'lik asit alkolde bekletildi.
5. Kesitler morartma işlemi için 15 dakika akan su altında bekletildi.
6. Hücrelerin sitoplazmasının boyanması için kesitlere 15 saniye Eozin boyaması yapıldı.
7. Doku kesitleri üzerindeki fazla boyanın giderilmesi için kesitler distile suda çalkalandıktan sonra dehidratasyon işlemi için 3'er dakika yükselen konsatrasyondaki alkol serisinden (%70, %96 ve %100 etil alkol) geçirildi.
8. Kesitler toluole alındı ve ardından entellan ile kesitlerin kapatılma işlemi yapıldı.

3.2.2.3. PAS (Periyodik asit–Schiff) Boyama Protokolü

1. Doku kesitleri toluolde 45 dakika deparafinize edildikten sonra 3'er dakika sırasıyla azalan konsantrasyondaki alkol serisinden (%100-%96-%70) geçirildi.
2. Kesitler distile sudan geçirildikten sonra 5 dakika Periyodik Asit Solüsyonu ile muamele edildi.
3. Doku kesitleri 4 kez distile su (dH₂O) ile yıkandı.
4. Yıkama işleminden sonra dokuların üzerine Schiff Solüsyonu eklenerek 20 dakika boyunca bekletildi.
5. Doku kesitleri 10 dakika boyunca akan çeşme suyu altında bekletildi.
6. Kesitler üzerine Mayer's Hematoksilen konularak 5 dakika bekletildi.
7. Doku kesitleri üzerindeki fazla boyanın giderilmesi için lamlar akan çeşme suyu altında 2-3 dakika bekletildi.
8. Kesitler hızlı bir şekilde asit alkolden geçirildikten sonra akan çeşme suyu altında 10 dakika bekletildi.
9. Dokular 1'er dakika yükselen konsantrasyondaki etil alkol serisinden (%70, %96 ve %100 etil alkol) geçirilerek dehidratasyon işlemi yapıldı.
10. Kesitler toluolden geçirilerek Entellan ile kapatıldı.

3.2.2.4. İmmünohistokimya Yöntemi (İHK)

İmmünohistokimyasal boyama için “*UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP Kiti*” (TP-125-HL, Thermo Scientific) kullanıldı. Alınan testis doku kesitlerinde poliklonal (pAb) tavşan **Aromataz** (1:200, A12684, Abclonal), pAb tavşan **StAR** (1:100, A16432, Abclonal), monoklonal (mAb) fare **8-OHdG** (1:50, sc-66036, Santa Cruz), pAb tavşan **Vitamin D reseptörü** (1:100, DF6917, Affinity), mAb **PCNA** (1:100, MA1083, Boster Biological Technology) ve mAb tavşan **Aktif kaspaz-3** (1:500, Cell Signaling, 9664S) (Tablo 3.6) proteinlerine karşı oluşturulmuş primer antikolar kullanılarak kit içinde tavsiye edilen boyama işlem sırası boyanan antikora modifiye edilerek uygulandı.

- 1) Deparafinizasyon işlemi için boyanacak doku kesitleri toluolde 45 dakika bekletildikten sonra sonra, 3'er dakika sırasıyla azalan konsantrasyondaki alkol serisinden (%100-%96-%70) geçirildi.
- 2) Doku kesitleri distile sudan indirildikten sonra antijen iyileştirme işlemi için kesitler mikrodalga fırında sitrat tampon (pH:6) içerisinde 2 kez 3 dakika kaynatıldı.

- 3) Endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) doku kesitlerinin üzerine damlatılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 4) Kesitler fosfat tuz solusyonu (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) ile 3 kez 3'er dakika yıkandı.
- 5) Zemin boyanmasının ve istenmeyen bağlanmaların engellenmesi için kesitlere Ultra V Block solüsyonu uygulanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 6) Aromataz, StAR, 8-OHdG, Vitamin D reseptörü, PCNA ve Aktif kaspaz-3 primer antikoları antibody diluent (TA-125-UD, Thermo Scientific) ile sulandırıldıktan sonra $+4^{\circ}C$ 'de 1 gece inkübe edildi.
- 7) Oda ısısına alınan doku kesitleri 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.
- 8) Dokular sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent) ile 15 dakika inkübe edildi.
- 9) 3 kez 3'er dakika olacak şekilde doku kesitlerinin PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
- 10) Doku kesitlerinin üzerini kapatacak kadar Streptavidin-peroksidaz kompleksi damlatılarak 15 dakika inkübe edildi.
- 11) Doku kesitleri tekrardan 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.
- 12) Doku kesitlerine AEC Substrat-kromojen solüsyonu (TA-125-HA, Thermo Scientific) damlatılarak mikroskop altında renk reaksiyonu elde edildikten sonra reaksiyon distile su ile durduruldu.
- 13) Zıt boyama işlemi için Hemotoksilen (ab220365, Abcam) ile 30 saniye nükleus boyaması yapıldı.
- 14) Doku kesitleri, çeşme suyu içerisinde yıkandıktan sonra PBS ile 10 dakika morartılma işlemi yapıldı. Ardından kesitler distile suya alındı.
- 15) Kesitlerin gliserin jel kapama ile kapatıldı.
- 16) Kapanan kesitler, Leica DM 2500 model ışık mikroskobu ve kamera sistemi kullanılarak görüntülendi ve Leica LAS programı ile değerlendirilmesi yapıldı.

Boyama özüllüğünün kontrolü için negatif kontrol kullanıldı. İHK yöntemi diğer kesitlere uygulandığı gibi negatif kontrol doku kesitine de bire bir uygulandı. Ancak bu kesitte diğer kesitlerden farklı olarak doku kesiti üzerine primer antikor yerine PBS konuldu.

İmmünohistokimya sonuçlarının değerlendirilmesi:

Aromataz, StAR ve 8-OHdG antikorlarının immün boyamalarının değerlendirilmesi için HScore analizi yapıldı. Deney hayvanlarına ait doku kesitlerinde rastgele olarak 10 farklı alan seçilerek immün pozitif hücre sayısı ve boyanma yoğunluğu dikkate alınarak semi-kantitatif değerlendirme yapıldı. Antikorların immün boyanma yoğunluğuna göre; “0 (boyanma yok), 1+ (zayıf ancak tespit edilebilir boyanma), 2+ (orta yoğunlukta boyanma), 3+ (yoğun boyanma)” olmak üzere 4 farklı kategori oluşturuldu. Her bir kesit için HScore değeri aşağıdaki formülle hesaplandı.

HScore değeri = [1x (1+ hücrenin yüzdesi)] + [2x (2+ hücrenin yüzdesi)] + [3x (3+ hücrenin yüzdesi)]

PCNA, Aktif kaspaz-3 ve Vitamin D reseptör antikorlarıyla boyanmış olan testis doku kesitlerindeki immün pozitif hücreler ışık mikroskobu altında rastgele 10 farklı seminer tübülde x100 büyütmede sayıldı. ‘İmmün pozitif hücre yüzdesi = (immün pozitif hücre sayısı/ toplam hücre sayısı) x100’ formülüyle immün pozitif hücre sayısı hesaplandı (Anapalı ve diğ. 2022).

Tablo 3.6: Kullanılan antikorlar ve dilüsyonları

Antikor	Marka / Katalog Numarası	Dilüsyon
Aromataz	Abclonal, A12684, USA	1:200
StAR (Steroidogenik Akut Düzenleyici Protein)	Abclonal, A16432, USA	1:100
8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)	Santa Cruz Biotechnology, sc-66036, England	1:50
PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)	Boster Biological Technology, MA1083, USA	1:100
Vitamin D reseptörü	Affinity, DF6917, USA	1:100
Aktif kaspaz-3	Cell Signaling, 9664S, The Netherlands	1:500

3.2.2.5. TUNEL Yöntemi

TUNEL boyama yöntemi için “*ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*” (MERCK, S7100, Germany) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

1. Deparafinizasyon için doku kesitleri 3 kez 5'er dakika olacak şekilde toluolden geçirildikten sonra sırasıyla azalan konsantrasyondaki alkol serisinden (2 kez 5 dakika %100 etanol, 3 dakika %95 etanol ve 3 dakika %70 etanol) geçirildi.
2. Dokular PBS ile 5 dakika yıkandı.
3. Doku kesitleri PBS içerisinde hazırlanmış Proteinaz K (20 µl/ml) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda doku kesitleri distile su (dH₂O) ile 2 kez 2 dakika yıkandı.
5. Oluşabilecek endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için PBS ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit ile doku kesitleri 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Doku kesitleri PBS ile 2 kez 5'er dakika yıkandı.
7. Kesitler iyice kurutulduktan sonra 20 dakika oda sıcaklığında *Equilibration Buffer* (75 µl) ile inkübe edildi.
8. Dokuların üzerine 55 µl *Working Strenght TdT* enzimi eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonunda dokulara *Stop/Wash Buffer* eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
10. Dokular PBS ile 3 kez 1 dakika yıkandı.
11. Yıkama sonrasında lamalar peçete/kurutma kağıdı yardımıyla kurutularak dokular 30 dakika 65 µl *Anti-Digoxigenin konjugatı* ile oda sıcaklığında inkübe edildi.
12. Dokular tekrardan PBS ile 4 kez 2 dakika yıkandı.
13. *Diaminobenzidine* (DAB) substratı doku kesiti yüzeyini kaplayacak biçimde damlatılarak 3-6 dakika arası bekletilerek renk reaksiyonunun ışık mikroskobu altında görüntülenmesi gerçekleşti.
14. Oluşan reaksiyonu durdurmak için doku kesitlerinin distile su ile 3 kez 1'er dakika olacak şekilde bir şalede yıkama işlemi gerçekleşti.
15. Dokuların Metil Yeşili boyası ile zıt boyama işlemi yapıldıktan sonra dokular 2 kez %100 alkolden geçirildi.
16. Dokular toluolden geçirildikten sonra entellan ile kapatılma işlemi yapıldı.

TUNEL görüntülerinin değerlendirilmesi:

TUNEL yöntemiyle boyanmış kesitler için işaretli apoptotik hücreler ışık mikroskopunda x100 büyütmede rastgele 10 farklı seminifer tübülde sayıldı. Apoptotik hücre yüzdesi aşağıdaki formüle (Meydanlı ve diğ., 2017) göre hesaplandı:

$$[Apoptotik\ İndeks = (TUNEL\ -pozitif\ hücre\ sayısı / toplam\ hücre\ sayısı) \times 100]$$

3.2.3. ELISA Yöntemi

Çalışma sonucunda alınan kan örneklerinin 1800xg'de 15 dakika santrifüjü yapılarak serumları ayrıldı ve serumlar -80°C kaldırılarak saklandı. Serum örneklerindeki testosteron seviyeleri “*Rat Testosterone (T) ELISA kiti*” (SL1061Ra, SUNLONG, Çin) içerisinde önerilen işlem sırası takip edilerek ölçüldü. Çalışma öncesi serum örnekleri oda sıcaklığına getirilerek tekrardan 1800xg'de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı.

Kit içinde tavsiye edilen işlem sırası takip edildi.

1. Protokolde belirtildiği gibi standart solüsyonunun seyreltme işlemi yapılarak 5 farklı standart hazırlandı. İlk kuyucuk kör (blank) kontrolü olacak şekilde boş bırakıldı. Farklı dilüsyonlara sahip olan standartların her birinden mikroplak kuyusuna 50ul hacim pipetlendi. Her standart çift çalışıldı.
2. Ardından her bir kuyucuğa dilüsyon faktörü 5 olacak şekilde 40µl örnek dilüsyon tamponu ve 10µl örnek eklendi.
3. Serum örnekleri her bir kuyucuğa konulduktan sonra kapama membranı ile mikroplak kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübasyonu yapıldı.
4. Konsantre haldeki yıkama solüsyonu distile su ile 1:30 oranında dilue edildi.
5. İnkübasyon işlemi bittikten sonra kuyucuklar içindeki örnekler aspire edildi ve her bir kuyucuk yıkama solüsyonuyla dolduruldu. Yıkama solüsyonu 30 saniye bekledikten sonra kuyucuklar aspire edilerek her yıkama sonunda mikroplak kurutuldu. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
6. Kör (blank) kontrol kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 µl HRP-Konjugat reaktifi eklenerek kapama membranı ile mikroplak kapatıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon işlemi bittikten sonra kuyucuklar içindeki HRP-Konjugat reaktifi aspire edildi ve her bir kuyucuk yıkama solüsyonuyla dolduruldu. Yıkama solüsyonu 30 saniye bekledikten sonra kuyucuklar aspire edilerek her yıkama sonunda mikroplaka kurutuldu. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.

8. Renklenme aşaması için her kuyucuğa 50 µl Kromojen A Solüsyonu ve 50 µl Kromojen B Solüsyonu eklendikten sonra 37°C'de 15 dakika inkübasyon yapıldı. Bu boyama işlemi karanlık bir ortamda yapıldı.
9. İnkübasyon sonunda reaksiyonu sonlandırmak için her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve eklendikten sonra kuyucuklardaki rengin maviden sarıya değişimi gerçekleşti.
10. Stop solüsyonu eklendikten 15 dakika içinde mikropalak okuyucu (Multiskan EX, Thermo Scientific) kullanarak 450nm'de absorbans okutulur. Okumadan önce standartlar sisteme eklendi ve blank (kör) kuyucuğunun optik yoğunluk (OD) değeri de sıfır olarak ayarlandı.

3.2.4. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Biyoistatistiksel analizler için SPSS Statistics, v.26.0 programı kullanıldı. Normal dağılıma sahip ikiden fazla grup ortalamasının karşılaştırılmasında “Tek yönlü Varyans analizi” (One-Way ANOVA), ANOVA ile anlamlı fark bulunan değişkenlerde ise alt gruplar arasındaki farkların yorumlanması için alt grupların ikili kıyaslamalarında da post-hoc “Tukey HSD” testi kullanılmıştır. Bağımlı örneklemelerde ise iki kesitli deney düzeni için eşli t testi ile üç ve daha çok kesit içeren deney kurgularında “Tekrarlı ölçümlerde (repeated measures) ANOVA” yöntemi kullanılarak gözlenen farkların anlamlılığı denetlendi. Anlamlı fark bulunduğu durumlarda kesitler arasındaki farkların yorumlanması için ikili kıyaslamalarda post-hoc “Bonferroni” testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki bağıntıları saptamak ve saptanan bağıntıları matematiksel ilişkiler halinde ortaya koymak için korelasyon (Pearson) çözümlmeleri yapıldı. Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlemesinde, ele alınan ölçütler Ortalama, Standart Sapma, frekans ve yüzde değerleri ile tanımlanmıştır. Ayrıca yorumlamalarda anlamlılık sınırı $p=0.05$ olarak alınmıştır.

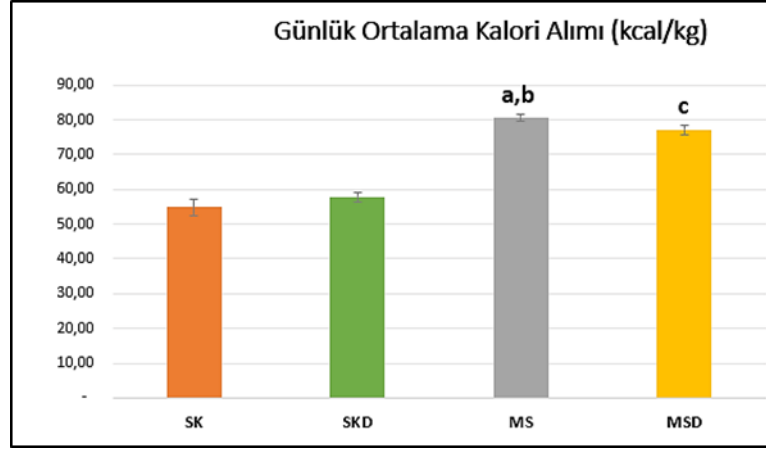
4. BULGULAR

4.1. Kalori Alımı ve Vücut Ağırlığı

Deney gruplarındaki her bir hayvanın günlük tükettiği yem ve fruktozlu su miktarı dikkate alınarak her hayvanın günlük kalori alımı hesaplandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Bu sonuca göre MS (Metabolik Sendrom Grubu) grubundaki hayvanların günlük kalori alımının diğer gruplara göre yüksek olduğu görüldü. MS grubunun SK (Sağlıklı kontrol grubu) ve SKD (Sağlıklı Kontrol+Vitamin D Uygulanan Grup) gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak çok ileri derece anlamlı fark ($p<0,001$) olduğu görülürken, MSD (Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup) grubuyla ileri derecede anlamlı farka ($p<0,01$) sahip olduğu saptandı (Şekil 4.1).

Deneye dahil edilen tüm hayvanların deney başlangıcında ve deney sonlandırılmadan önce ağırlık ölçümleri yapıldı. Deney başlangıcında MS (Metabolik Sendrom Grubu) grubuna dahil olan hayvanların ağırlık ortalamalarının SK (Sağlıklı kontrol grubu) ve MSD (Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup) gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) görülürken, SKD (Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup) grubuyla kıyaslandığında ise anlamlı bir fark ($p<0,05$) olduğu tespit edildi.

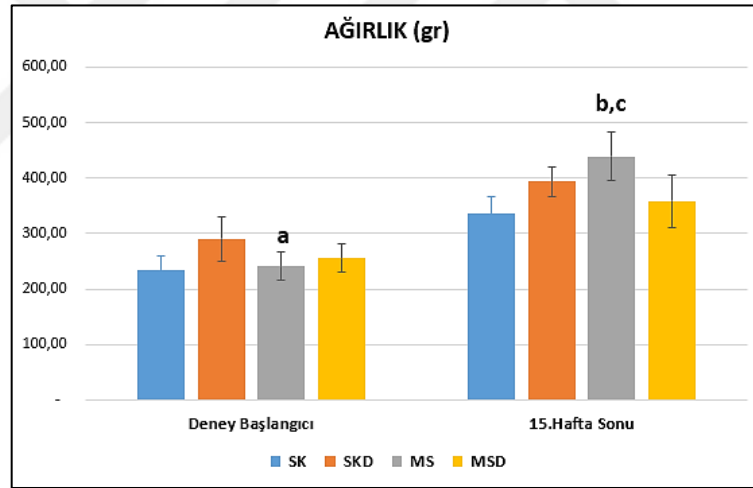
Deney sonunda yapılan ölçümde ise MS (Metabolik Sendrom Grubu) grubuna dahil olan hayvanların ağırlık ortalamasının diğer gruplara göre arttığı görüldü. İstatistiksel açıdan MS grubunun SK ve MSD gruplarıyla ileri derecede anlamlı fark olduğu ancak SKD grubuyla anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) saptandı (Şekil 4.2). MS grubu, deney sonunda başlangıç ağırlığından %83.55 daha fazla iken SK grubunda %44.69, SKD grubunda %36.46 ve MSD grubunda %41.58 olarak saptandı.



Şekil 4.1: Deney gruplarının günlük ortalama kalori alımı (kcal/kg).

^ap <0,001 SK ve SKD gruplarına kıyasla; ^bp<0,01 MSD grubuna kıyasla; ^cp<0,001 SK ve SKD gruplarına kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



Şekil 4.2: Deney gruplarına ait vücut ağırlıkları takibi (gr).

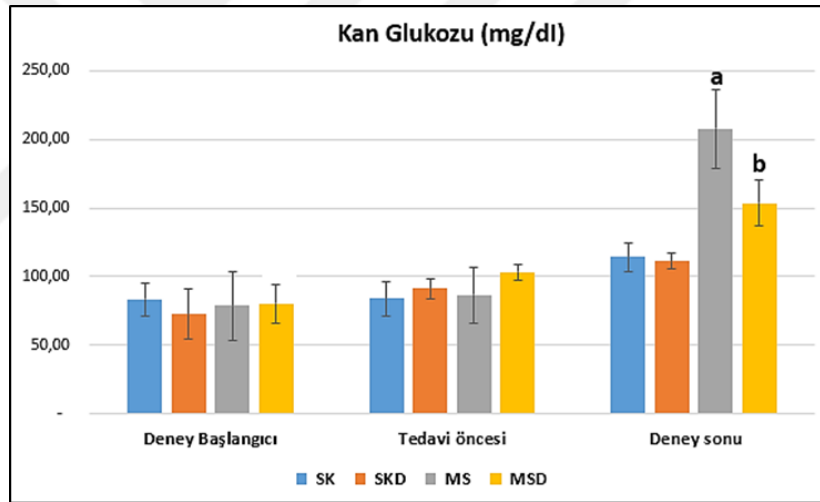
Deney başlangıcı: ^ap <0,05 SKD grubuna kıyasla.

Deney sonu: ^bp <0,001 SK grubuna kıyasla, ^cp <0,01 MSD grubuna kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

4.2. Açlık Kan Glukoz Seviyesi

Deney başlangıcında, deneyin 3. haftasında Vitamin D uygulamasına başlanmadan hemen önce ve deney sonunda hayvanların açlık kan glukoz ölçümleri yapıldı. Deney başlangıcı ve 3. haftasında yapılan ölçümlerin sonuçları istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$) saptandı. Deney sonunda yapılan kan şekeri ölçümünde ise MS grubuna ait hayvanların açlık kan glukozu ortalamasının diğer gruplarla kıyaslandığında yüksek olduğu ve istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark olduğu ($p < 0,001$) bulundu. Deneyin 3. haftasından itibaren Vitamin D uygulanan MSD grubunda ise kan şekerinin 15.hafta sonunda MS grubuna kıyasla çok yükselmemekle birlikte SK ve SKD gruplarına göre kan glukoz değerinin istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı yüksek olduğu ($p < 0,001$) saptandı (Şekil 4.3).



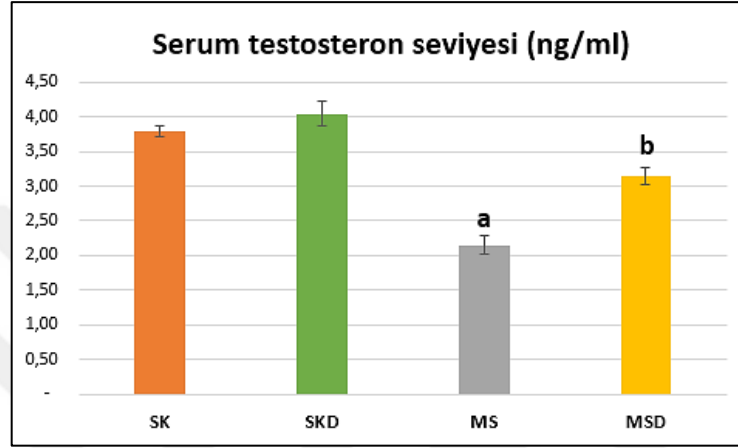
Şekil 4.3: Açlık kan glukoz değerleri (mg/ dl).

Deney sonu ^a $p < 0,001$, SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla, ^b $p < 0,01$ SK ve SKD gruplarına kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

4.3. Testosteron Seviyelerinin Ölçümü

Deney gruplarına ait serum örneklerindeki testosteron seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Testosteron seviyesinin MS grubunda diğer gruplara kıyasla çok ileri derecede anlamlı olarak düşük olduğu ($p < 0,001$) saptandı (Şekil 4.4). Ayrıca vitamin D uygulanan metabolik sendrom grubunun (MSD) serum testosteron seviyelerinin daha yüksek olmakla birlikte SK ve SKD gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu ($p < 0,001$) bulundu.



Şekil 4.4: Deney gruplarının serum testosteron seviyesi (ng/ml).

^a $p < 0,001$ SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla, ^b $p < 0,001$ SK ve SKD gruplarına kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

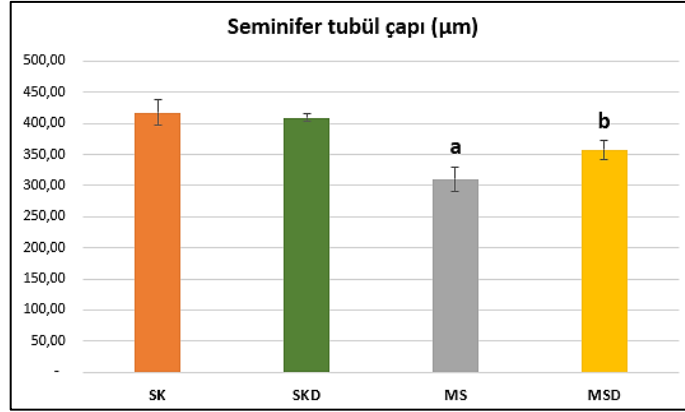
4.4. Morfolojik Bulgular

Alınan testis doku kesitlerinin morfolojik incelemesi için Hematoksilen-Eozin (Şekil 4.8) ve PAS (Periyodik asit–Schiff) boyama (Şekil 4.9) yöntemleri uygulanmıştır. Işık mikroskopunda boyanan doku kesitlerinin genel morfolojisi, seminifer tübülleri ve bu kompartmanda konumlanan hücreler (spermatogonyumlar, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve sertoli hücreleri) ile bazal membranın yapısı incelendi.

SK (Sağlıklı kontrol grubu) ve SKD (Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup) gruplarına ait doku kesitlerinde yapılan incelemede seminifer tübüllerin düzgün görünümüne sahip olduğu, seminifer tübül epitelinin ise çok katlı olup spermatogenik hücre popülasyonundan ve sertoli hücrelerinden oluştuğu görüldü. Ayrıca interstisyel alandaki Leydig hücrelerinin düzenli olarak konumlandığı da görüldü.

%20'lik fruktozlu su, %17 yağ ve %17 fruktoz içeren diyetle oluşturulan Metabolik sendrom (MS) grubunda yapılan incelemede seminifer tübüllerin düzensiz olduğu ve tübül çaplarının SK (Sağlıklı kontrol Grubu), SKD (Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup) ve MSD (Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup) gruplarına kıyasla azaldığı ve bu gruplarla arasında istatistiksel olarak çok ileri derece anlamlı fark ($p<0,001$) olduğu saptandı. Ayrıca MS grubunda bazal membrandan tübül lümenine doğru spermatogenik hücre popülasyonunda azalmalar ve vakuolizasyonlar görüldü. Seminifer tübül epitelinin özellikle germ hücre kaybından kaynaklı olarak incelendiği, SK ve SKD grupları ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak çok ileri derece anlamlı fark ($p<0,001$) bulunduğu görüldü. MS grubu ile MSD grubu arasında ise ileri derecede anlamlı fark ($p<0,01$) olduğu saptandı (Şekil 4.6). MS grubunda seminifer tübüllerin etrafını saran bazal membranın kalınlaştığı ve ondülasyonlar meydana geldiği görüldü. Bu bazal membran kalınlaşmasının diğer gruplarla kıyaslandığında çok ileri derece anlamlı fark ($p<0,001$) taşıdığı saptandı (Şekil 4.7).

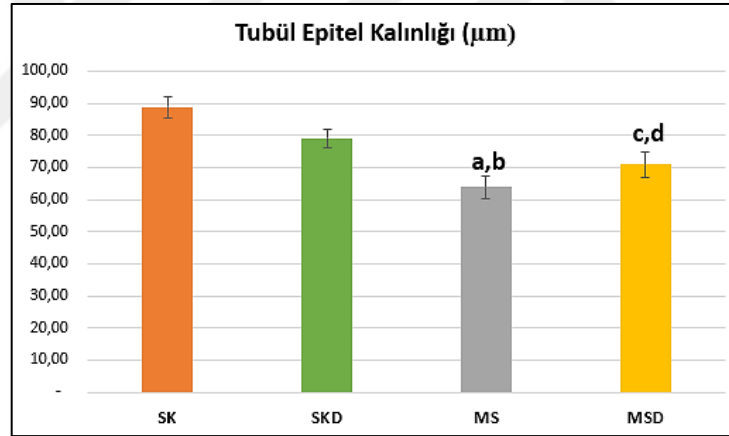
MSD (Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup) grubunda yapılan incelemede ise seminifer tübüllerin düzensiz olduğu görüldü. MS grubunda görüldüğü gibi bu grupta da spermatogenik hücre popülasyonunda yer yer azalmalar ve hücreler arasında vakuolizasyonlar görüldü. Tübül çapları ortalamasının ise MS grubuna kıyasla daha büyük ancak SK ve SKD grubuna kıyasla daha küçük olduğu görüldü. MSD grubunun tübül çapı bakımından diğer gruplarla çok ileri derece anlamlı fark ($p<0,001$) taşıdığı gözlemlendi (Şekil 4.5). Epitel kalınlığının MS grubuna nazaran daha kalın olduğu ancak SK ve SKD gruplarına kıyasla azaldığı tespit edildi. İstatistiksel açıdan MSD grubunun epitel kalınlığı SK grubuyla kıyaslandığında çok ileri derecede anlamlı fark ($p<0,001$) görülürken, MS ve SKD gruplarıyla kıyaslandığında ise ileri derecede anlamlı fark ($p<0,01$) görüldü. Bu grupta da bazal membran kalınlığının SK grubuna kıyasla arttığı ($p<0,001$) ve MS grubuna kıyasla azaldığı ($p<0,001$) görülmüştür. MS grubunda olduğu gibi bu grupta da bazal membranda yer yer ondülasyonlar olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.5: Seminifer tubül çapları (µm).

^ap <0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla, ^bp<0,001 SK ve SKD gruplarına kıyasla.

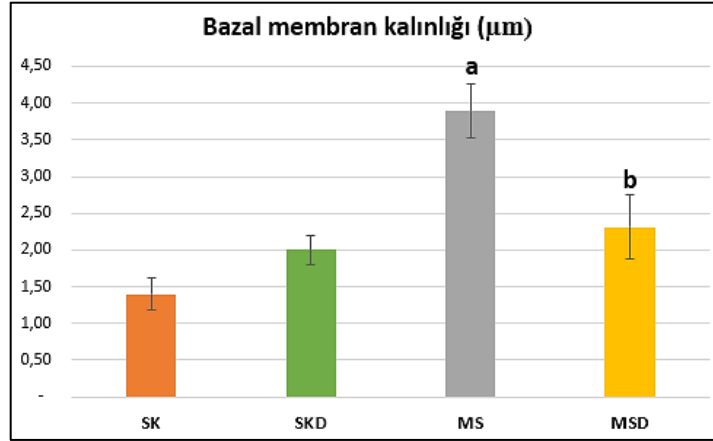
(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



Şekil 4.6: Tübül epitel kalınlığı (µm)

^ap <0,001 SK ve SKD gruplarına kıyasla; ^bp<0,01 MSD grubuna kıyasla, ^cp <0,001 SK grubuna kıyasla, ^dp <0,01 SKD grubuna kıyasla.

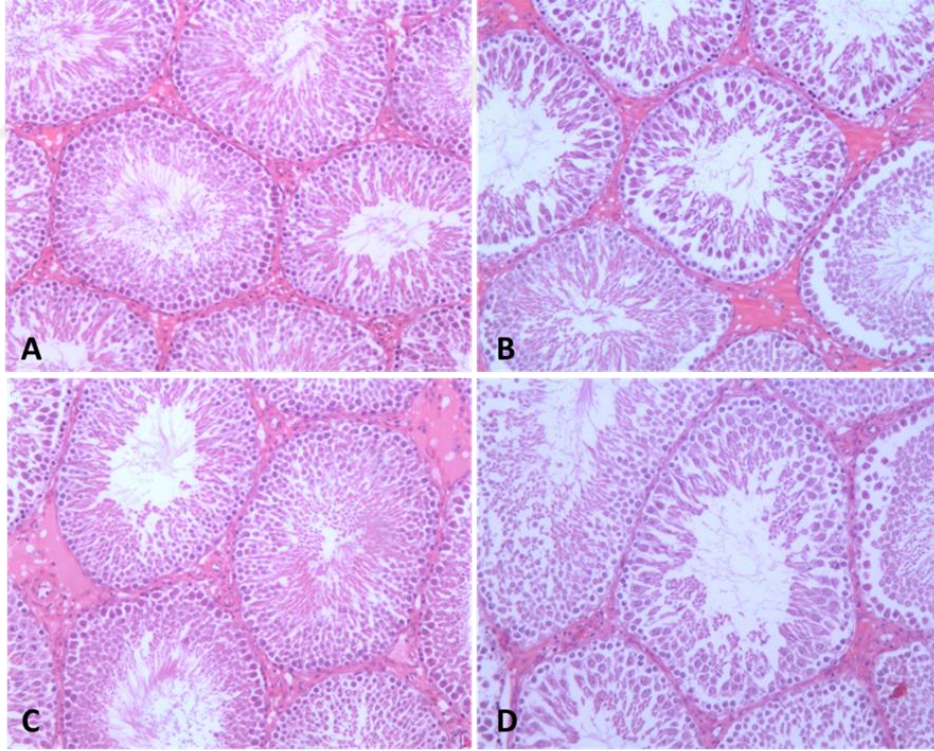
(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



Şekil 4.7: Bazal membran kalınlığı (μm).

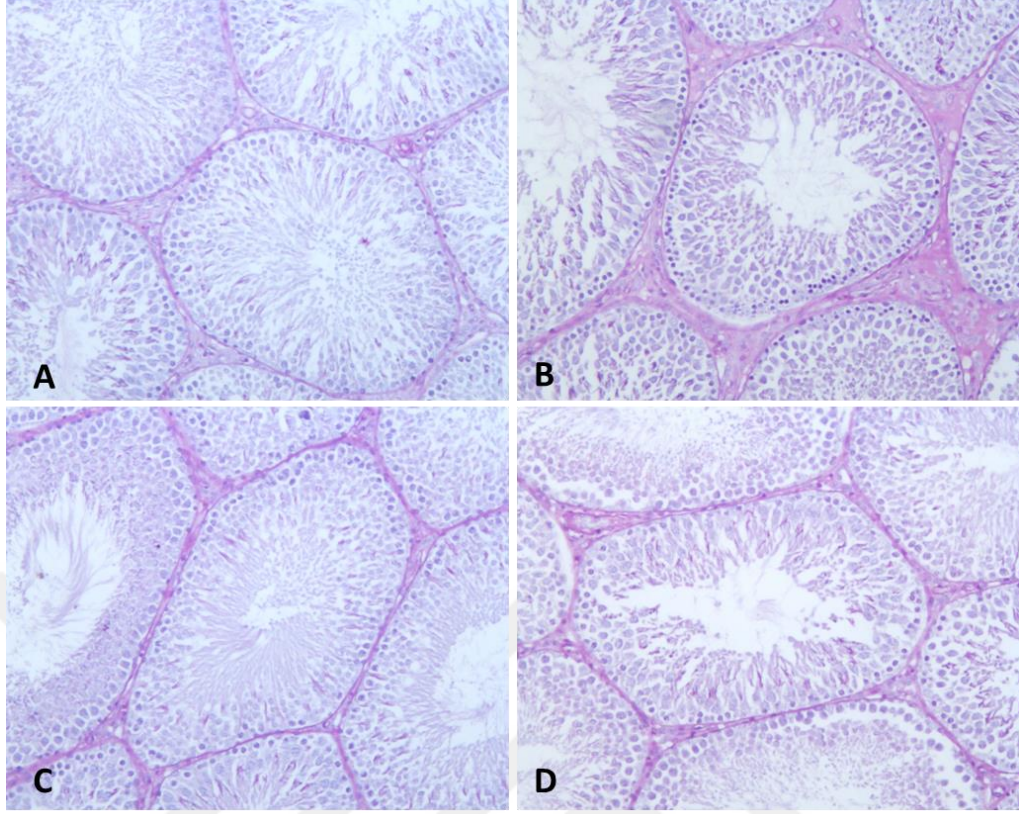
^ap < 0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla, ^bp < 0,001 SK grubuna kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



Şekil 4.8: Testis dokusunun Hematoksilen-Eozin (HE) boyanması. A: SK grubu, B: MS grubu, C: SKD grubu, D: MSD grubu. Büyütme: X100

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

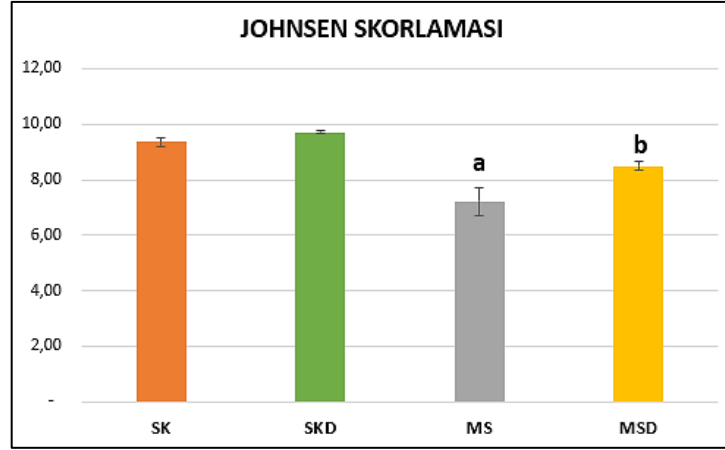


Şekil 4.9: Testis dokusunun Periyodik asit-Schiff (PAS) boyanması. A: SK grubu, B: MS grubu, C: SKD grubu, D: MSD grubu. Büyütme: X100

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

Johnsen Skoruması

Morfolojik inceleme için Hematoksilen- Eozin boyama yöntemi uygulanan testis doku kesitlerine Johnsen skoruması yapıldıktan sonra istatistiksel olarak analizi yapılmıştır. Bu skorumaya sonucuna göre Metabolik Sendromlu (MS) hayvanların seminifer tübülleri içindeki spermatid hücre sayısında ve lümende bulunan sperm sayısında diğer gruplara kıyasla belirgin azalmalar görüldü. Metabolik Sendrom (MS) grubunun Johnsen skoruması ortalamasının SK (Sağlıklı kontrol grubu), SKD (Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup) ve MSD (Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup) gruplarına kıyasla düşük olduğu ve bu gruplarla arasında istatistiksel olarak çok ileri derece anlamlı fark ($p < 0,001$) olduğu saptandı. Ayrıca MSD grubunun da diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak çok ileri derece anlamlı farka ($p < 0,001$) sahip olduğu da saptanmıştır (Şekil 4.10).



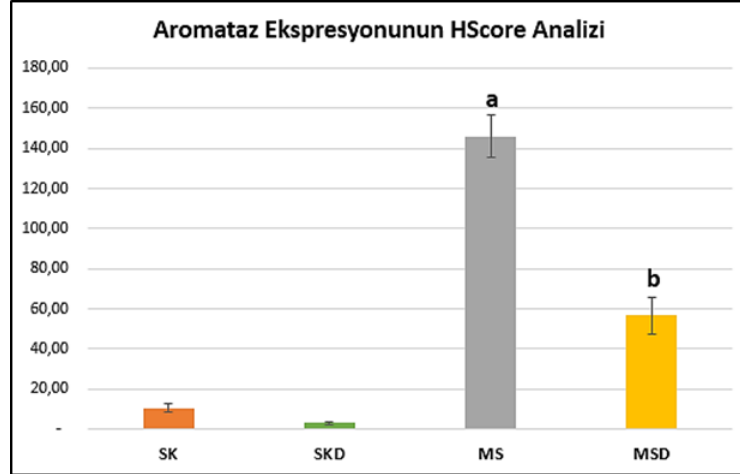
Şekil 4.10: Grupların Johnsen Skorlama Sonuçları

^ap < 0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla; ^bp < 0,001 SK ve SKD gruplarına kıyasla.
(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

4.5. İmmünohistokimya Bulguları

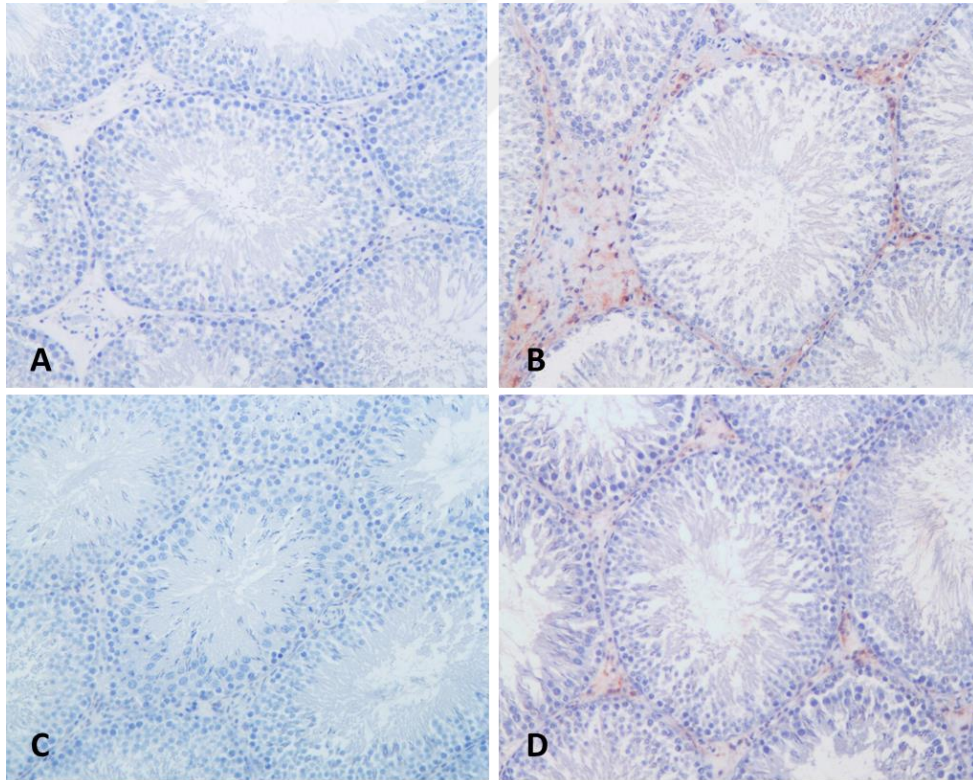
4.5.1. Aromataz

Aromataz antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapılan testis doku kesitlerinde sitoplazmaları boyanan interstisyel Leydig hücreleri immün pozitif hücreler olarak kabul edildi. Aromataz immün pozitif hücrelerin dağılımı ve boyanma şiddeti dikkate alınarak HScore analizi yapıldı. HScore ortalama değerleri Sağlıklı kontrol grubunda (SK) (10,5±2,12); Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grupta (SKD) (2,98±0,6); Metabolik Sendrom (MS) Grubunda (146,1±10,6) ve Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grupta (MSD) ise (56,8±9,1) olarak bulundu. Aromataz pozitif hücrelerin özellikle interstisyel alandaki Leydig hücreleri olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). MS grubunda immün pozitif hücre sayısının diğer gruplara kıyasla fazla olduğu ve bu gruplarla arasında istatistiksel olarak çok ileri derece anlamlı fark (p< 0,001) bulunduğu saptandı (Şekil 4.11). MSD grubunda ise immün pozitif hücre sayısının MS grubuna kıyasla azaldığı ancak yine de SK ve SKD gruplarına göre pozitif hücre sayısının fazla (p< 0,001) olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.11: Aromataz ekspresyonunun HScore analizinin değişim grafiği (SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

Aromataz ekspresyonu: ^ap <0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla, ^bp<0,001 SK ve SKD gruplarına kıyasla.

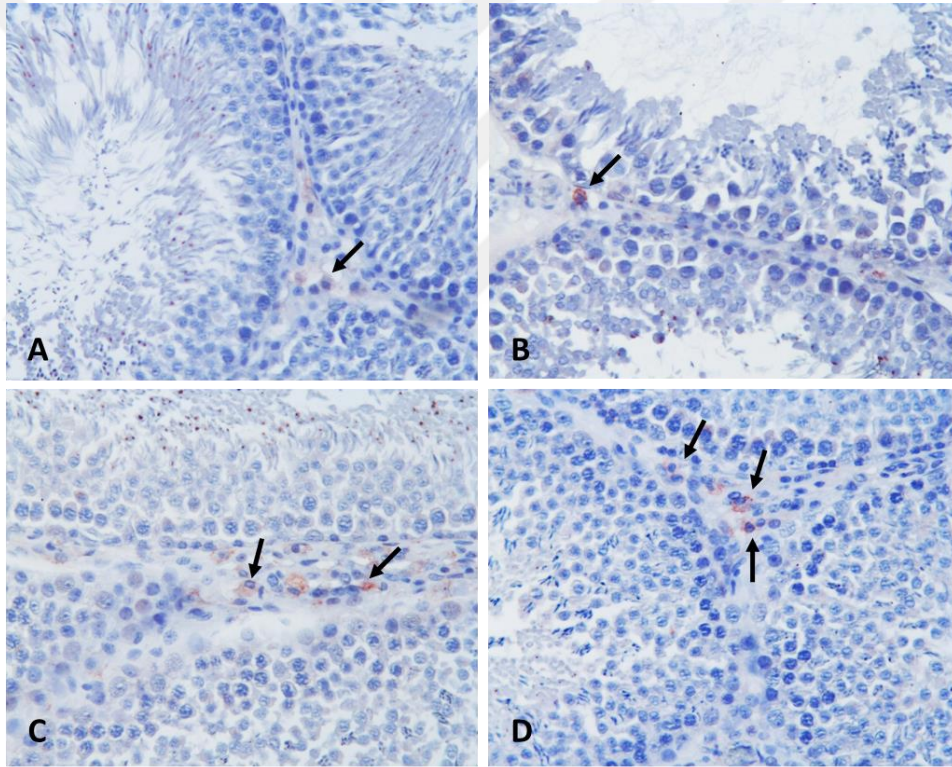


Şekil 4.12: Testis dokusunda immün pozitif Aromataz ekspresyonunun gösterimi. A: SK grubu, B: MS grubu, C: SKD grubu, D: MSD grubu. İmmün boyama: Streptavidin-biotin-peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: X100

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

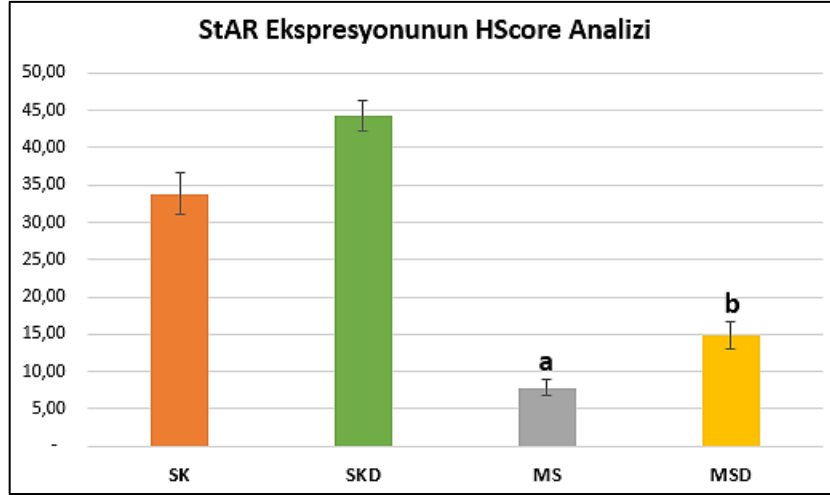
4.5.2. StAR (Steroidogenik Akut Düzenleyici Protein)

Testis doku kesitlerinde StAR antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyamada sitoplazmaları boyanan interstisyel Leydig hücreleri immün pozitif hücreler olarak kabul edildi. İmmün pozitif hücrelerin dağılımı ve boyanma şiddeti dikkate alınarak HScore analizi yapıldı. HScore ortalama değerleri Sağlıklı kontrol grubunda (SK) ($33,8 \pm 2,8$); Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grupta (SKD) ($44,3 \pm 2,07$); Metabolik Sendrom (MS) Grubunda ($7,86 \pm 1,1$) ve Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grupta (MSD) ise ($14,8 \pm 1,78$) olarak bulundu. StAR pozitif hücrelerin özellikle interstisyel alandaki Leydig hücreleri olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13). İmmün pozitif hücre sayısının MS ve MSD gruplarında SK ve SKD gruplarına kıyasla azaldığı ve bu gruplar kontrol grupları arasında istatistiksel olarak çok ileri derece anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.13: Testis dokusunda immün pozitif StAR ekspresyonunun gösterimi. A: SK grubu, B: MS grubu, C: SKD grubu, D: MSD grubuna ait StAR immün pozitif sitoplazmik hücreler (↑). İmmün boyama: Streptavidin-biotin-peroksidad. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: X200

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

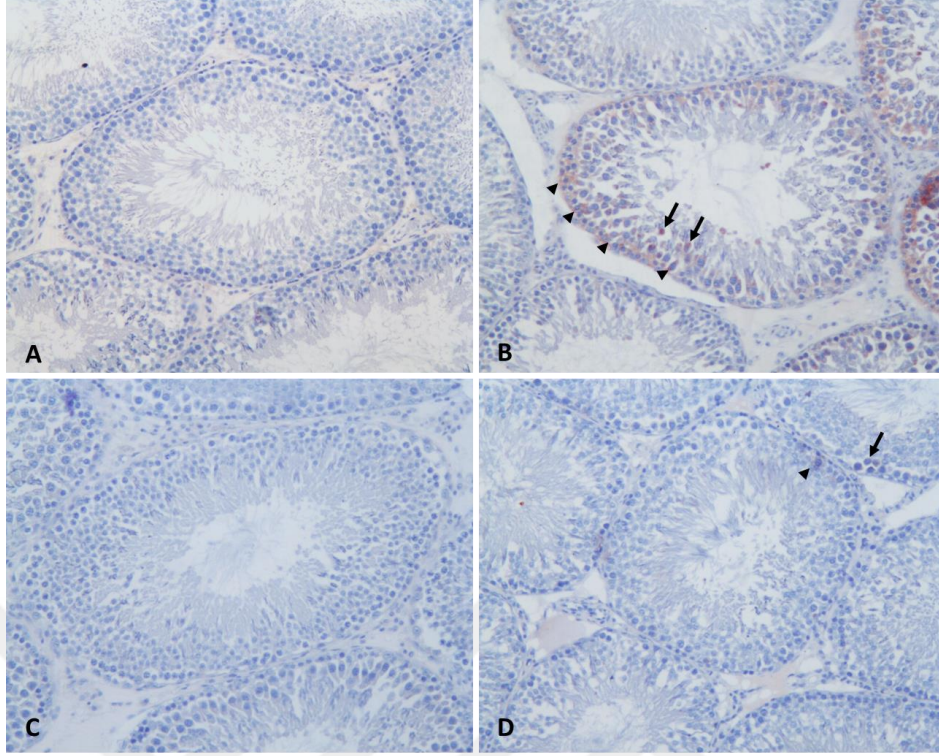


Şekil 4.14: StAR ekspresyonunun HScore analizinin değişim grafiği.

^ap <0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla, ^bp<0,001 SK ve SKD gruplarına kıyasla. (SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

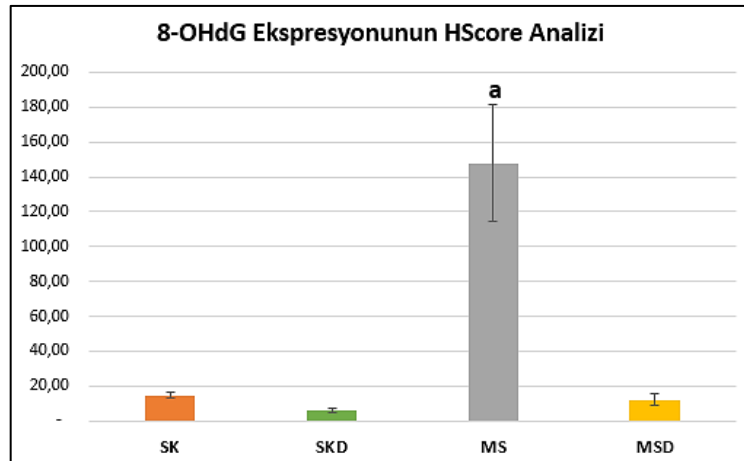
4.5.3. 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)

8-OHdG antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal yöntem ile boyanan testis doku kesitlerinde sitoplazmaları ve nukleusları boyanan hücreler immün pozitif hücreler olarak kabul edildi. Boyanan pozitif hücrelerin dağılımı ve boyanma şiddeti dikkate alınarak HScore analizi yapıldı. HScore ortalama değerleri Sağlıklı kontrol grubunda (SK) ($14,6 \pm 1,7$); Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grupta (SKD) ($5,9 \pm 1,14$); Metabolik Sendrom (MS) Grubunda ($147,6 \pm 33,5$) ve Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grupta (MSD) ise ($12 \pm 3,4$) olarak bulundu. 8-OHdG pozitif hücrelerin özellikle seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücreler olduğu gözlemlendi. İmmün pozitifliğin çoğunlukla hücre sitoplazmasında olduğu ayrıca MS grubunda yer yer nuklear pozitif hücrelerinde olduğu saptandı (Şekil 4.15). Pozitif hücre sayısının ve boyanma şiddetinin HScore analizine göre MS grubunda çok daha yüksek olduğu ve diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak çok ileri derece anlamlı fark ($p < 0,001$) olduğu saptandı (Şekil 4.16). MSD grubunda ise immün pozitifliğin sitoplazmalarında zayıf reaksiyon veren az sayıdaki hücreler olduğu gözlemlendi. MSD grubu ile SK ve SK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).



Şekil 4.15: Testis dokusunda immün pozitif 8-OHdG ekspresyonunun gösterimi. A: SK grubu, B: MS grubu, D: MSD grubuna ait 8-OHdG sitoplazmik immün pozitif hücreler (▲) görülmekte, C: SKD grubu. MS grubuna ait nuklear pozitif hücreler (↑) görülmekte. İmmün boyama: Streptavidin-biotin-peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: X100

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



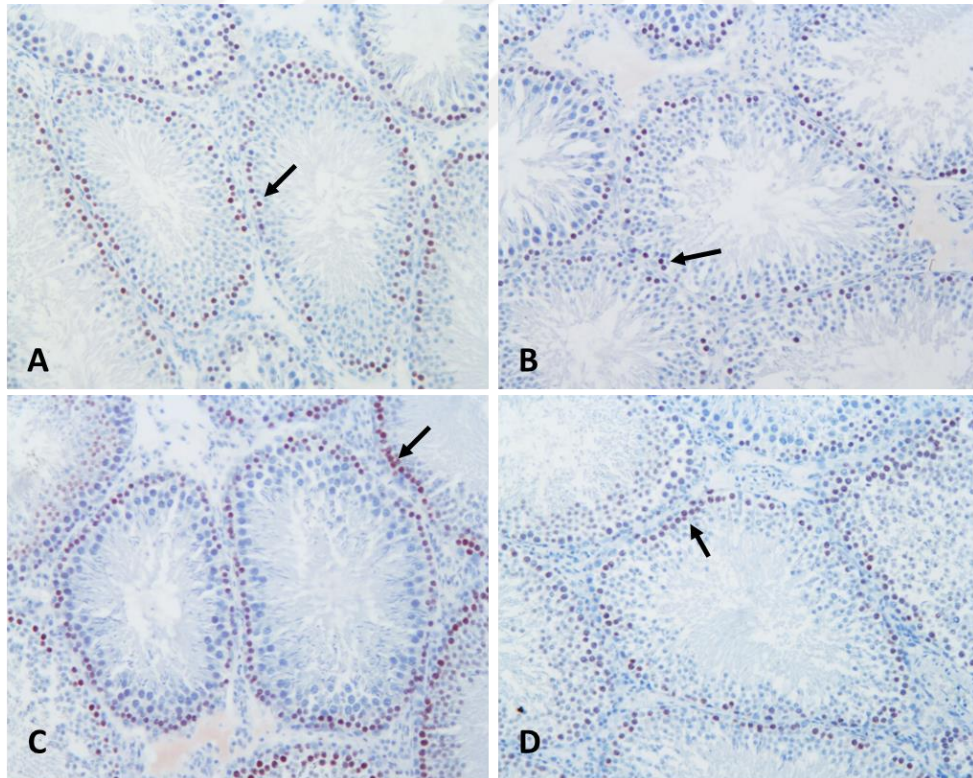
Şekil 4.16: 8-OHdG ekspresyonunun HScore analizinin değişim grafiği.

^ap < 0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

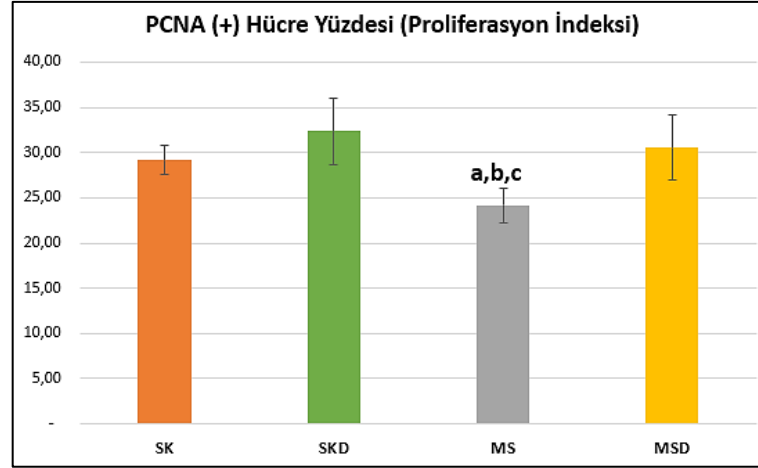
4.5.4. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

Testis doku kesitlerinde PCNA antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu nukleusları boyanan hücreler PCNA pozitif hücreler olarak kabul edildi. Testis doku kesitlerinin PCNA immünopozitif hücre sayılarının ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Bu değerler Sağlıklı kontrol grubunda (SK) ($29,1 \pm 1,6$); Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grupta (SKD) ($32,4 \pm 3,70$); Metabolik Sendrom (MS) Grubunda ($24,2 \pm 1,90$) ve Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grupta (MSD) ise ($30,5 \pm 3,66$) olarak bulundu. PCNA pozitif hücrelerin özellikle seminifer tübülerde konumlanan spermatogonyum hücreleri olduğu gözlemlendi (Şekil 4.17). İmmün pozitif hücre sayısı bakımından MS grubu ile SKD grubu arasında istatistiksel açıdan çok ileri derecede anlamlı farka ($p < 0,001$) sahipken, SK grubuyla ise anlamlı bir farka ($p < 0,05$) sahip olduğu saptandı (Şekil 4.18). MSD grubunun, kontrol gruplarıyla (SK ve SKD) aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olmadığı ($p > 0,05$) ancak MS grubuyla ileri derecede anlamlı ($p < 0,01$) bir farka sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.17: Testis dokusunda immün pozitif PCNA ekspresyonunun gösterimi. A: SK grubu, B: MS grubu, C: SKD grubu, D: MSD grubuna ait nuklear immün pozitif hücreler (↑). İmmün boyama: Streptavidin-biotin-peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: X100

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



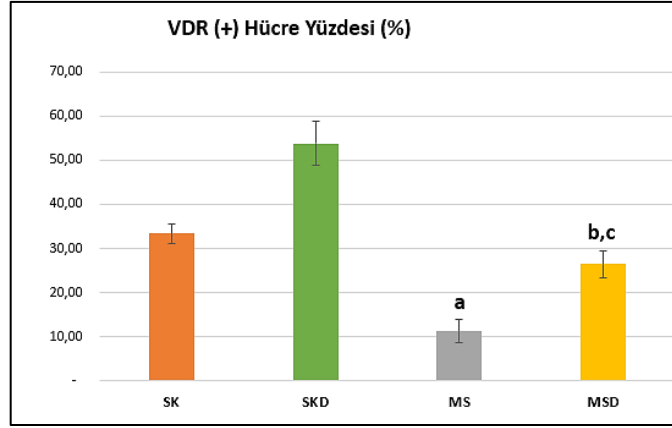
Şekil 4.18: PCNA immün pozitif (+) hücre yüzdesinin değişim grafiği.

^ap < 0,05 SK grubuna kıyasla, ^cp < 0,01 MSD grubuna, ^bp < 0,001 SKD grubuna kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

4.5.5. Vitamin D reseptörü (VDR)

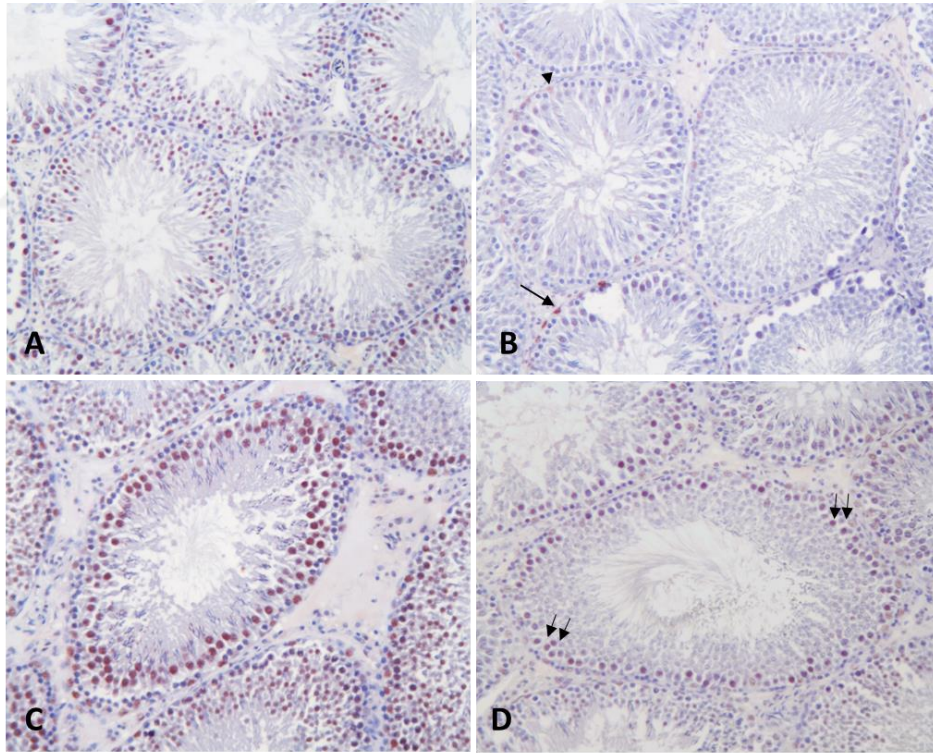
Testis doku kesitlerinde Vitamin D reseptör (VDR) antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu nukleusları boyanan hücreler VDR pozitif hücreler olarak kabul edildi. Testis doku kesitlerinin VDR immünopozitif hücre sayılarının ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Bu değerler Sağlıklı kontrol grubunda (SK) ($33,4 \pm 2,26$); Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grupta (SKD) ($53,8 \pm 4,85$); Metabolik Sendrom (MS) Grubunda ($11,3 \pm 2,6$) ve Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grupta (MSD) ise ($26,4 \pm 3,14$) olarak bulundu. VDR pozitif hücrelerin özellikle seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücreler olduğu ayrıca yer yer sertoli ve miyoid hücrelerde de pozitiflik olduğu gözlemlendi (Şekil 4.20). VDR pozitif hücre sayısının ve boyanma şiddetinin SKD grubunda diğer gruplara kıyasla çok yüksek olduğu, MS grubunda ise belirgin bir azalma olduğu tespit edildi (Şekil 4.19). Ayrıca immün pozitif hücre sayıları bakımından MS grubu diğer gruplarla kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan çok ileri derecede anlamlı fark ($p < 0,001$) olduğu saptandı. MSD ve SK grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0,05$) gözlemlenirken, MSD grubunun MS ve SKD grupları ile çok ileri derece anlamlı fark ($p < 0,001$) olduğu saptandı.



Şekil 4.19: VDR immün pozitif (+) hücre yüzdesinin değişim grafiği.

^ap <0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla, ^bp<0,001 SKD grubuna kıyasla, ^cp<0,05 SK grubuna kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



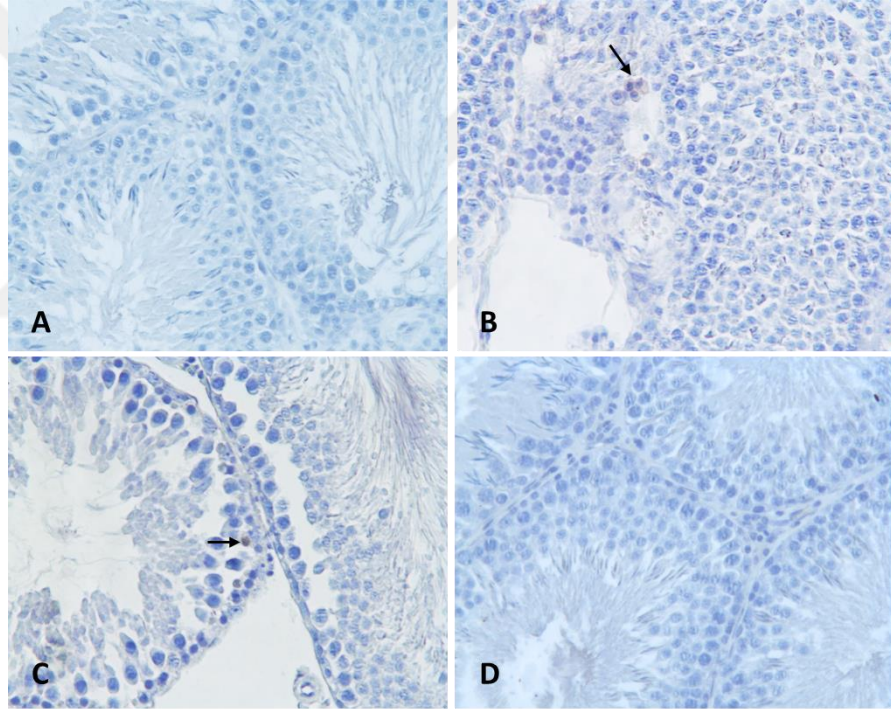
Şekil 4.20: Testis dokusunda immün pozitif VDR ekspresyonunun gösterimi. A: SK grubu, B: MS grubu, C: SKD grubu, D: MSD grubu. Spermatogonyumlardaki (↑↑), miyoid hücredeki (↑) ve sertoli hücrelerindeki (▲) immün pozitif hücreler.

İmmün boyama: Streptavidin-biotin-peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: X100

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

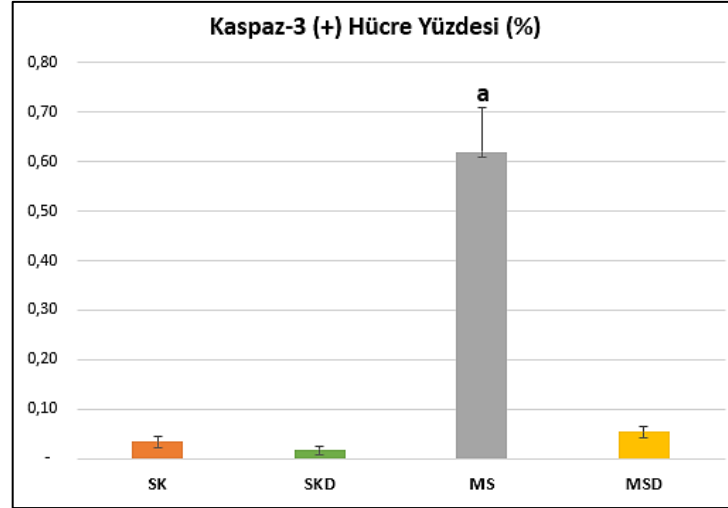
4.5.6. Aktif Kaspaz-3

Testis doku kesitlerinde aktif kaspaz-3 antikoruna kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu sitoplazmaları boyanan hücreler kaspaz-3 pozitif hücreler olarak kabul edildi. Testis doku kesitlerinin aktif kaspaz-3 immün pozitif hücre sayılarının ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Bu değerler Sağlıklı kontrol grubunda (SK) ($0,03 \pm 0,01$); Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grubu (SKD) ($0,02 \pm 0,008$); Metabolik Sendrom (MS) Grubunda ($0,6 \pm 0,09$) ve Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grubu (MSD) ise ($0,05 \pm 0,01$) olarak bulundu. Sadece MS grubunda bazı alanlarda zayıf boyanan 2-3 immün pozitif hücreye rastlanıldı (Şekil 4.21) ve bu grubun diğer gruplarla istatistiksel açıdan çok ileri derece anlamlı farka ($p < 0,001$) sahip olduğu saptandı (Şekil 4.22). MSD grubu ile SK ve SKD grupları aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.



Şekil 4.21: Testis dokusunda immün pozitif Aktif kaspaz-3 ekspresyonunun gösterimi. A: SK grubu, B,C: MS grubu, D: MSD grubu. MS grubuna ait immün pozitif hücreler (↑) görülmekte. İmmün boyama: Streptavidin-biotin-peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: X200

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



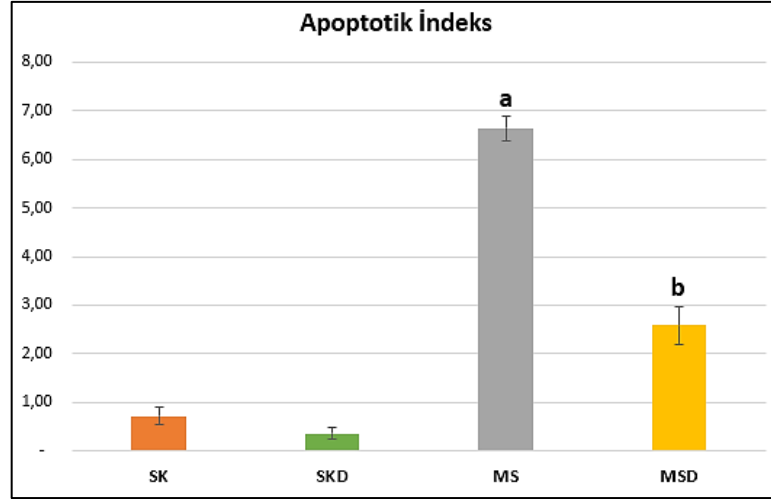
Şekil 4.22: Aktif kaspaz-3 immün pozitif (+) hücre yüzdesinin değişim grafiği.

^ap <0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

4.6. TUNEL Bulguları

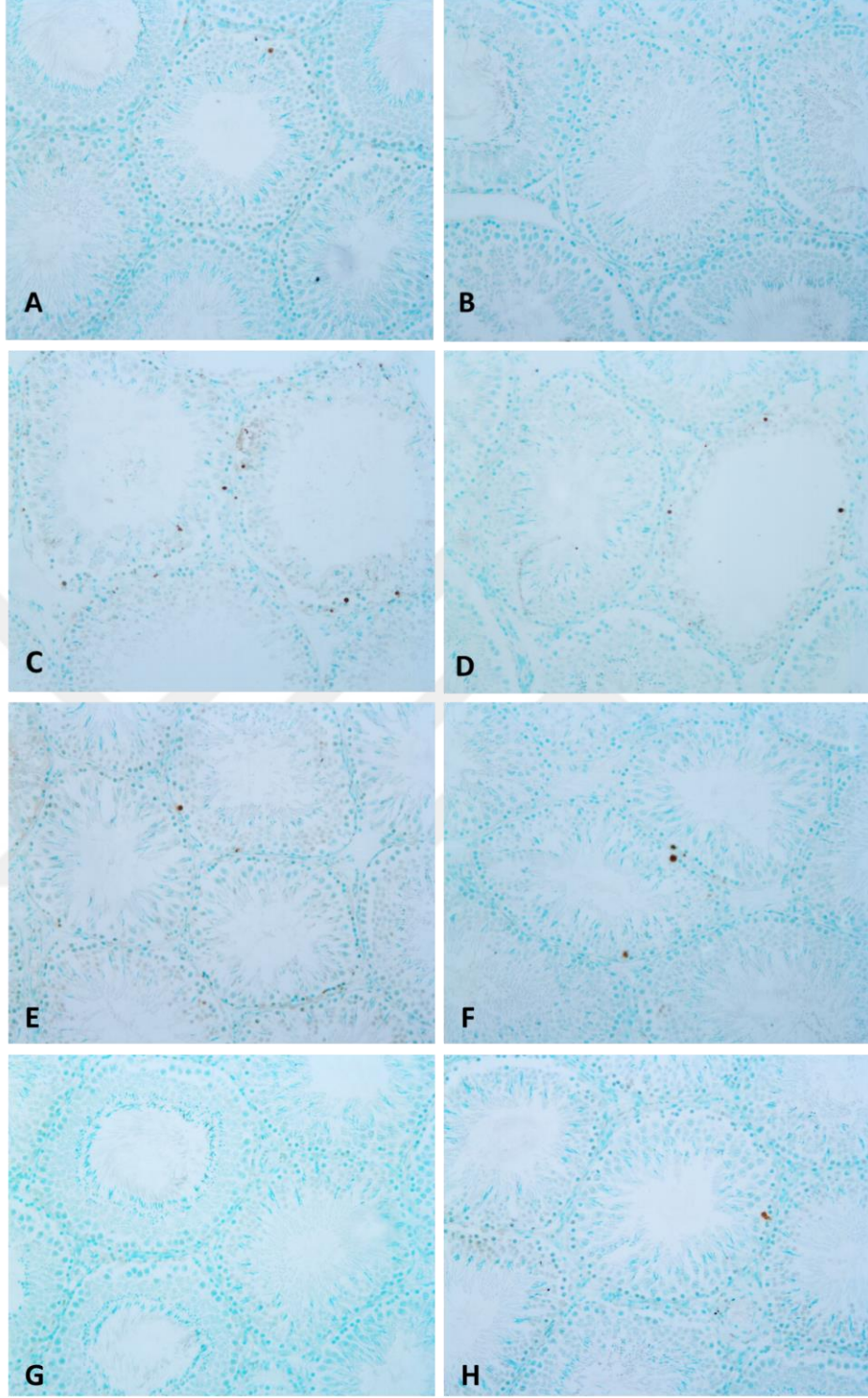
Testis doku kesitlerine TUNEL boyama yöntemi uygulanarak apoptoza giden hücreler işaretlendi. Nukleusları boyanan hücreler TUNEL pozitif hücreler olarak kabul edildi. Testis doku kesitlerinin TUNEL pozitif hücre sayılarının ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Bu değerler Sağlıklı kontrol grubunda (SK) ($0,7 \pm 0,2$); Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grupta (SKD) ($0,4 \pm 0,11$); Metabolik Sendrom (MS) Grubunda ($6,6 \pm 0,25$) ve Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grupta (MSD) ise ($2,6 \pm 0,4$) olarak bulundu. TUNEL pozitif hücrelerin özellikle seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücreler olduğu (Şekil 4.24) ve bu pozitifliğin MS grubunda diğer gruplara kıyasla yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.23). Ayrıca immün pozitif hücre sayıları bakımından MS grubu diğer gruplarla kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan çok ileri derecede anlamlı fark ($p < 0,001$) olduğu saptandı.



Şekil 4.23: TUNEL pozitif (+) hücre yüzdesinin değişim grafiği

Apoptotik İndeks: ^ap <0,001 SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla, ^bp<0,001 SK ve SKD gruplarına kıyasla.

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan grup, MS: Metabolik Sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)



Şekil 4.24: Testis dokusunda TUNEL pozitif ekspresyonunun gösterimi. A, B: SK grubu, C, D: MS grubu, E, F: MSD grubu, G, H: SKD grubuna ait immün pozitif hücreler görülmekte. Büyütme: X100

(SK: Sağlıklı kontrol grubu, SKD: Sağlıklı Kontrol + Vitamin D Uygulanan Grup, MS: Metabolik sendrom grubu, MSD: Metabolik Sendrom + Vitamin D Uygulanan Grup)

5. TARTIŞMA

Metabolik sendrom (MS), fazla enerji alımı, hareketsiz yaşam alışkanlıkları ve obezitenin neden olduğu dünya çapında halk sağlığını etkileyen bir sorundur (Practice., 2019). MS, hipertansiyon, bozulmuş glukoz toleransı, dislipidemi ve obezite gibi birçok metabolik bozukluğun bir araya gelmesi olarak tanımlanır ve obezite, sendromun etiyolojisinde önemli bir faktördür. MS'nin başta gelişmiş ülkeler olmak üzere dünyada yaygınlaşması, önemli bir sağlık sorunu haline gelmekte ve bu patolojiye karşı yeni tedaviler geliştirme ihtiyacı hızla artmaktadır (Fernandez ve diğ., 2018).

"Batı Diyeti" olarak adlandırılan yağ veya şeker açısından zengin, yüksek kalorili yiyecek ve içecekler yani enerji bakımından yüksek gıdalar artık modern toplumlarda yaygın olarak tüketilmektedir (Lozano ve diğ., 2016; Fernandez ve diğ., 2018). Genetik yatkınlık, fiziksel hareketsizlik ve bu tür diyetler insanlarda gelişen obezitenin başlıca nedenleri olarak kabul edilmektedir (Lozano ve diğ., 2016). Bu beslenme tarzıyla birlikte üreme çağında olup aşırı kilolu veya obez erkeklerin oranı %50'yi aşmış ve bu oran artmaya devam etmektedir. Hipotalamik-hipofiz-gonadal ekseninde değişiklik, testiküler steroidogenezin bozulması, insülin, sitokinler ve adipokinler dahil olmak üzere çeşitli metabolik düzensizlikler nedeniyle obeziteye bağlı infertilite oldukça önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Obezitenin testis hacminde azalmaya, semen kalitesinde düşüşe ve spermatogenezde bozulmaya yol açan değişiklikler yapabileceği bildirilmiştir. Çeşitli çalışmalar bu sıkıntıyla ilgili farklı görüşler ortaya koymaktadır ancak obezite ile erkek kısırlılığı arasındaki ilişkinin daha fazla ortaya çıkarılması gerekmektedir (Chaudhuri ve diğ., 2022; Leisegang ve diğ., 2021).

Metabolik sendromun hücresel ve biyokimyasal mekanizmaları oldukça geniş ve karmaşıktır ayrıca mevcut tedaviler ise tam olarak etkili değildir. Bu nedenle, metabolik sendromun metabolik ve biyokimyasal komplikasyonlarını taklit eden, tekrarlanabilir ve erişilebilir hayvan modelleri tasarlanmıştır (Rodríguez ve diğ., 2020). Diyetle oluşturulan MS modelleri geliştirilmiş ve günümüz batı diyetine en çok benzeyen yüksek yağlı ve yüksek karbonhidratlı diyet (Gancheva ve diğ., 2015; Fernandez ve diğ., 2018; Gunawan ve diğ., 2021), değişen yeme alışkanlıklarına yönelik mevcut eğilime en çok benzeyen diyet modelidir. Bu kombinasyon diyeti çeşitli avantajlar sağlar, trigliseritlerdeki artış esas olarak yüksek fruktozlu diyetlerden

kaynaklanırken, obezite ise yüksek yağlı diyetlerden kaynaklanmaktadır (Fernandez ve diğ., 2018; Gunawan ve diğ., 2021).

Gancheva ve arkadaşları (2015) sıçanlara yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu (%10 fruktozlu su ve %17 yağ ve %17 fruktoz) diyet uygulayarak yeni bir metabolik sendrom modeli oluşturmuşlardır. Bu çalışmada Gancheva ve arkadaşlarının (2015) MS modeli %10'luk fruktoz yerine %20'lik fruktozlu su verilerek modifiye edildi ve 15 hafta süresince sıçanlara %17 yağ ve %17 fruktoz içeren özel yem ile birlikte uygulandı.

Gancheva ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada deney grupları arasında vücut ağırlık değerleri bakımından anlamlı fark görmemekle beraber yüksek yağlı ve yüksek fruktoz diyeti ile beslenen hayvanların visseral yağlanmasında artış olduğunu saptamışlardır (Gancheva ve diğ., 2015). Yüksek yağlı ve/veya yüksek fruktozlu diyetle yapılan birçok çalışmada insülin direncine yol açan hepatik karbonhidrat metabolizmasının işlevini bozduğu, hiperinsülinemi, glukoz intoleransı gibi bir dizi fizyolojik anormallik geliştiği bildirilmiştir (Gancheva ve diğ., 2015).

Yapılan bu çalışmada deney gruplarındaki her bir hayvanın günlük tükettiği yem ve fruktozlu su miktarı dikkate alınarak her hayvanın günlük kalori alımı hesaplandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Ayrıca deney başlangıcında ve sonunda her bir hayvanın ağırlıkları ve açlık kan glukozları ölçüldü. MS grubundaki hayvanların günlük kalori alımının, deney sonundaki vücut ağırlığının ve açlık kan glukozu değerlerinin diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı. Tüm bu sonuçlar modelimizin metabolik sendromla uyumlu olduğunu desteklemektedir.

Steroid bir hormon olan Vitamin D, kalsiyum-fosfat metabolizması, bağışıklık sistemi ve metabolizma gibi çeşitli yolların düzenlenmesinde yer almaktadır (Mustahsan ve diğ.,2022). Vitamin D'nin adipogenezi, lipolizi ve lipogenezi düzenleyerek lipid metabolizmasının düzenlenmesinde de rol oynadığı bilinmektedir. VitD'nin başlıca kaynağı olan güneşe maruziyetin azaldığı coğrafyalarda hipovitaminoz sıklığı ve dolayısıyla potansiyel diyabet veya MS gelişme riski daha yüksektir (Malsawmhriatzuala ve diğ., 2019). MS' nin özellikleri dikkate alındığında, düşük VitD seviyeleri obezite, bozulmuş glikoz metabolizması ve yüksek kan basıncı ile ilişkilendirilmiştir (Mustahsan ve diğ.,2022). Obezite, yetersiz VitD ile yakından ilişkilidir ve yapılan çalışmalar obezitenin daha düşük VitD seviyelerine yol açtığını göstermiştir (Zanatta ve diğ., 2011; Zanatta ve diğ., 2011). Düzenli olarak VitD alımının vücut kitle indeksinin ve bel çevresinin azalmasına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Torino ve diğ., 2017).

Bu çalışmada VitD uygulamasının MS'de streoidogenez üzerine etkilerini incelemek amacıyla 3. haftadan itibaren SKD ve MSD gruplarına VitD uygulamalarına başlandı. Buradaki amaç, yüksek fruktoz ve yağ içeren diyet tüketiminin sebep olduğu testis hasarının VitD etkisi ile ne kadar geri döndürülebileceğini incelenmesi amaçlandı. Çalışmada VitD uygulanan MS grubunda kan glukozunun ve vücut ağırlığının MS grubuna göre anlamlı olarak düştüğü saptandı. Ayrıca SK ve SKD gruplarına göre daha yüksek kalori almalarına rağmen bu gruplara kıyasla MSD grubunda vücut ağırlığının anlamlı olarak düştüğü görüldü. MS grubu deney sonunda başlangıç ağırlığından %83.55 daha fazla iken SK, SKD ve MSD gruplarında bu artış sırasıyla %44.69, %36.46 ve %41.58 olarak saptandı. Vitamin D'nin olası metabolik düzenleyici etkisiyle kilo artışında bir azalma olduğu sonucuna varıldı.

Testis disfonksiyonu, testislerin anormal fonksiyonunu belirtmek için kullanılan genel bir terimdir. Özellikle testislerin ekzokrin yetersizliği, spermatogenez bozukluğu anlamına gelirken, endokrin yetmezlik ise hipogonadizm olarak adlandırılmaktadır (Goulis ve Tarlatzis, 2008). Aşırı beslenme ve egzersiz azlığına bağlı olarak aşırı yağ birikiminin sonuçlarından biri de erkek infertilitesidir (Hammoud ve diğ., 2008; Rahali ve diğ., 2020). Metabolik sendrom bileşenlerinin yetişkin androjen eksikliği ve geç başlangıçlı hipogonadizm (LOH) ile güçlü bir bağlantısı olduğu bilinmektedir (Corona ve diğ., 2009; Winter ve diğ., 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalar obezitenin hipotalamus-hipofiz-testis eksenini olumsuz etkileyerek infertiliteye yol açtığı göstermiştir (Monteiro ve Azevedo, 2010; Yang ve diğ., 2012.). Deneysel çalışmalar, yüksek yağlı bir diyetin spermatogenezin normal ilerlemesine müdahale ederek hormonal dengesizliğe ve testis hasarına neden olduğunu göstermiştir (Verderame ve diğ., 2018; Migliaccio ve diğ., 2019). Yüksek yağlı diyetin özellikle sperm kalitesinde, motilitesinde, serum testosteron seviyelerinde ve testiküler androjen reseptörlerinde bir azalmaya neden olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Kort ve diğ., 2006; Palmer ve diğ., 2012). Yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda testis morfolojisinde dejenerasyonlar olduğu, seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığında sağlıklı hayvanlara göre anlamlı azalmalar olduğu gösterilmiştir. Yüksek fruktoz içeren diyet uygulanan bir başka çalışmada ise yüksek fruktozla beslenen sıçanların seminifer tübüllerinde belirgin deformasyonlar, bazal membranında düzensizlikler ve tübül çapında azalmalar gözlemlenmiştir. Bu hayvanların Johnsen skorlamasının sağlıklı hayvanlara göre düşük olduğu saptanmıştı (Meydanli ve diğ., 2017). Bu çalışmada ise MS grubunda yapılan incelemede seminifer tübüllerin düzensiz olduğu ve tübül çaplarının diğer gruplara kıyasla azaldığı saptandı. Bazal membrandan tübül lümenine doğru spermatogenik hücre popülasyonunda

azalmalar ve vakuolizasyonlar görüldü. Seminifer epitelin özellikle germ hücre kaybından kaynaklı olarak diğer gruplara kıyasla incelendiği görüldü. Spermatogenezin semikantitatif değerlendirilmesinde kullanılan Johnsen skorlamasının MS grubunda diğer gruplara oranla düşük olduğu ve bu sonuca göre seminifer tübüllerdeki spermatid hücre sayısında ve lümende bulunan sperm sayısında diğer gruplara kıyasla belirgin azalmalar olduğu saptandı. Bu sonuçlar MS grubunda spermatogenez bozulmasını desteklemektedir.

Yapılan çalışmalar erkeklerdeki hipogonadizm biçimlerinin sıklıkla yetersiz VitD ve düşük testosteron seviyelerine sahip olduğunu göstermiştir (Cohen, 2010; Zarotsky ve diğ., 2014). Vitamin D eksikliğinin kemirgenlerde gonadal yetmezliğe, testisin histolojik anormalliğine ve belirgin bir fonksiyonel sperm sayısında azalmalara neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kwiecinski ve diğ., 1989; Kinuta ve diğ., 2000). Vitamin D tedavisi uygulanan MS grubunda testis morfolojisinin düzeldiği, seminifer tübül çapının ve epitel kalınlığının arttığı ve MS grubunda artmış olan bazal membran kalınlığının incelmış olduğu saptandı. Bu sonuçlar metabolik sendromda vitamin D takviyesinin testis morfolojisini düzeltmekte etkili olduğunu düşündürdü.

Leydig hücreleri testisin interstisyel bölümünde, seminifer tübüllerin dışında bulunur ve testosteron üretiminden sorumludur. Testosteron birincil erkek seks steroididir ve erkek üreme dokusunun gelişiminde, ikincil cinsel özelliklerin teşvikinde, sperm üretiminde ve kemik sağlığında önemli bir rol oynar (Lorenzen ve diğ., 2017). Aromataz, testosteronun östrojene dönüştürülmesinde yer alan bir enzimdir. Aromataz erişkin testis dokusunda (spermatogonyum, spermatosit, spermatid, sperm, Leydig ve sertoli hücrelerinde), ovaryum, meme, kemik, beyin ve yağ dokusunda eksprese edilir (Flück ve Pandey, 2017). Obezitede adipoz dokudaki artış, aromatazın ekspresyonunu da artırır ve testosteronun aromatzasyonundan elde edilen östrojen düzeylerinde artışa sebep olur (Vermeulen ve diğ., 2002; Nordt ve Divasta, 2008). Azalmış testosteron seviyesi kas kütlelerinin azalması, insülin direncinin artması, dislipidemi ve buna bağlı olarak lipoprotein lipaz aktivitesinin artması ile abdominal bölgede yağ birikimine sebep olmaktadır (Alkandur ve Kum, 2021). Aşırı doymuş yağ içeren diyetin, östrojen reseptörleri ve aromatazın ekspresyonu üzerindeki etkisi nedeni ile spermatogenezin ciddi şekilde etkilediği ileri sürülmüştür (Verderame ve diğ., 2018).

Bu çalışmada MS sonucu erkek infertilitesinin etkilediğini göstermek amacıyla interstisyel leydig hücrelerindeki Aromataz enzim ekspresyonu immünohistokimya yöntemiyle gösterildi. MS grubunda immün pozitif hücre sayısının diğer gruplara kıyasla fazla olduğu ve HScore

ortalamasının ($146,1 \pm 10,6$) da SK, SKD ve MSD gruplarına kıyasla yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum abdominal yağlanmanın hipotalamus-hipofiz-testis eksenini etkileyerek Leydig hücrelerindeki testosteron sentezinde azalmalara ve sonuç olarak erkek infertilitesinin gelişmesine sebep olduğunu göstermektedir. Bu hipotezi desteklemek amacıyla serum örneklerinde testosteron seviyesi ölçüldü. MS grubunda diğer gruplara göre testosteron seviyesi daha düşük bulundu. Yüksek yağlı diyetle beslenme sonucu adipoz dokuda meydana gelen artışla beraber hipogonadal-obezite döngüsü ile testosteron miktarında azalma meydana gelir. Yüksek yağlı diyetle beslenen gruplarda sperm fonksiyonu ve doğurganlıktaki bu bozulmanın nedeni, Cohen (2010) tarafından açıklanan erkeklerde obezite ile ilişkili durumlarda ortaya çıkan hipogonadal-obezite döngüsüne bağlıdır (Cohen, 2010). Bu döngüye göre adipoz doku artışı, Sitokrom P450 enzimi olan aromatazın ekspresyonunu artırarak testosteronun azalmasına ve artan östrojen üretimine yol açar (Merino ve diğ., 2018). Bu çalışmada da yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyet sonucun artan kilo alımı ve abdominal yağlanmaya bağlı olarak aromataz ekspresyonunda artış olduğunu bu nedenle MS grubunda testosteron seviyesinin düşmüş olduğu düşünüldü.

Vitamin D reseptörünün (VDR) ve vitamin D metabolize edici enzimler, Leydig hücrelerinde eksprese edilir, bu da vitamin D'nin steroidogenezin düzenlenmesinde doğrudan bir rol oynadığını gösterir. Vitamin D'nin testosteron üretimi üzerindeki etkisini araştıran çok az işlevsel çalışma vardır. Birkaç insan çalışması, serum 25OHD ve testosteron arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Primer insan testis kültürünün kullanıldığı in vitro çalışmada, VDR aktivasyonunun testosteron üretimini arttırdığını gösterilmiştir (Lorenzen ve diğ., 2017; Hofer ve diğ., 2014). Ayrıca vitamin D'nin hormonal olarak aktif formu olan kalsitriolün aromataz ekspresyonunu doku seçici bir şekilde düzenlediğini gösterilmiştir. Kalsitriolün, insan meme kanseri hücrelerinde ve tümör çevresindeki adipositlerde aromataz ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Krishnan ve diğ., 2010). Bu çalışmada vitamin D tedavisi uygulanan MS grubunda aromataz immün pozitif hücre sayısının MS grubuna kıyasla düşük ancak SK ve SKD gruplarına kıyasla istatistiksel olarak yüksek olduğu saptandı. Ayrıca vitamin D tedavisi uygulanan MS grubunun serum testosteron seviyesinin MS grubuna kıyasla arttığı görüldü. Bu durum Vitamin D'nin steroidogenezin düzenlenmesinde etkili olduğu ve testosteron arasında pozitif bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

Vitamin D (VitD) mineral metabolizması üzerindeki genel etkisinin yanı sıra hem erkek hem de dişi üreme süreçlerini modüle etmede önemli rol oynayan endokrin hormondur

(Gurusubramanian ve Kumar, 2019). VitD, çoklu etkilerini VDR bağlanması ve onun aktivasyonu yoluyla gösterir (Gurusubramanian ve Kumar, 2019; Angelis ve diğ., 2017). VDR ekspresyonu, prostat, seminal veziküller, epididimis ve testiste özellikle spermatogonia ve spermatositleri içeren bir grup germ hücresinde ve olgunlaşmış sertoli hücrelerinde bulunmaktadır (Angelis ve diğ., 2017). Klasik bir transkripsiyonel faktör olarak VitD/VDR kompleksi, insan, fare genomlarında çok çeşitli gen ekspresyonunu düzenler. VDR, tercihen retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturur ve doğrudan VDRE'lere bağlanır. Hofer ve ark. VitD/VDR'nin yetişkin insan testis hücrelerinde steroidogenezde görevli HSD3B2 ve CYP11A1 enzimlerinin gen ekspresyonunu arttırdığını bulmuştur (Hofer ve diğ., 2014). Buna göre VDR'nin Leydig hücrelerinde Cyp11a1 ve Hsd3b1 ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyebileceğini ileri sürmüştür. Bu nedenle, VitD/VDR'nin lipid metabolizması ve testosteron sentezi arasındaki genomik ve genomik olmayan etkisini daha sonraki çalışmalarda araştırmak önemlidir (Angelis ve diğ., 2017). VDR ve VitD metabolize edici enzimlerin erkek üreme sisteminde ve özellikle testislerde ve spermatozoada bulunması semen kalitesi üzerine etkisi olduğunu göstermektedir (Gurusubramanian ve Kumar, 2019; Blomberg, 2013). VDR'nin ekspresyonu, erkek üreme sisteminde geniş çapta araştırılmıştır ve en çok çalışılan hayvan modeli ise kemirgenlerdir (Angelis ve diğ., 2017). Klinik çalışmalar infertil erkeklerin testislerindeki VDR ve VitD metabolik enzimlerinin aktivitelerinin normal erkeklere göre daha düşük olduğunu göstermiştir, bu da VDR'nin erkek üremesinde de önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir (Boisen ve diğ., 2017). VitD/VDR, yağ dokusunda lipid sentezini ve metabolizmasını düzenler (Xu ve diğ., 2019). Testosteron biyosentezi, testislerin etrafında bulunan gonadal adipoz dokudaki lipid metabolizması ile yakından ilişkilidir. VDR, adipositlerdeki lipid metabolizmasını da düzenleyebilir. Bununla birlikte, VDR'nin testiste testosteron biyosentezini etkilemek için lipid metabolizmasını nasıl düzenlediği hala bilinmemektedir (Wang ve diğ., 2022).

Çalışmamızda vitamin D reseptörünün (VDR) ekspresyonunu göstermek amacıyla yapılan immünohistokimya yöntemi sonucuna göre yüksek yağ ve yüksek fruktoz içeren diyetle beslenen MS immün pozitif hücre sayısının diğer gruplara kıyasla düşük olduğu ancak vitamin D tedavisi uygulanan MS grubundaki immün pozitif hücre sayısında MS grubuna kıyasla artış olduğu ve neredeyse ortalamasının SK grubuna yaklaştığı saptandı. Vitamin D uygulanan gruplarda aromataz ekspresyonunun azalması buna karşılık StAR ekspresyonunun ve serum

testosteron seviyelerinin artmasının VDR'nin steroidogenezin düzenlenmesinde rol oynadığı sonucuna varıldı.

Steroidogenezdeki ilk adım mitokondride gerçekleşmektedir. StAR ise steroid sentezinin ilk aşaması için gerekli olan kolesterolün dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana transferinde görev almaktadır (Yewei ve ark.2014; Miller ve Auchus, 2011). Mitokondriyal homeostaz, StAR'ın ekspresyonunu ve aktivitesini sürdürmesi açısından oldukça önemlidir. Leydig hücreleri, oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır (Xiaohui ve diğ., 2018). Yapılan araştırmalar mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasının StAR degradasyonuna neden olabileceğini göstermiştir. Mitokondriyal ATP seviyelerindeki düşüşün, StAR translasyonunda azalmalara sebep olduğu bilinmektedir (Arakane ve diğ., 1997; Clark ve diğ., 2001). Mitokondriyal membran geçirgenliğinin ana düzenleyicisi olan siklofilin D (CypD), mitokondriyal fonksiyonun sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar. Wang ve arkadaşları (2012), yüksek yağlı diyetin (HFD) CypD protein ekspresyon seviyelerini artırabileceğini ve fare karaciğerinde mitokondriyal disfonksiyonu indükleyebileceğini göstermiştir; buna karşılık CypD azaltılmasının, HFD'nin neden olduğu hepatik mitokondriyal stresi iyileştirebildiğini ileri sürmüşlerdir. HFD'nin CypD ekspresyonunu artırması nedeni ile mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olabileceğini söylemişlerdir (Wang ve diğ., 2012). Su ve ark. (2019) Leydig hücrelerinde CypD'ye bağlı mitokondriyal disfonksiyonun HFD'nin neden olduğu StAR ekspresyonunun deregülasyonunda rol oynadığını ileri sürmüşler (Su ve diğ., 2019).

Yüksek yağlı diyet (HFD) ile 18 hafta beslenen hayvanlarda erken evre obezitenin endojen leptin seviyesini arttırdığını gösterilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, artan leptin düzeylerinin testis dokusunda reseptörünün (LepR) ekspresyonunu azaltabileceğini göstermiştir. Testiküler leptin reseptörünün azalmasına bağlı olarak LEP-JAK2-STAT3 sinyal iletimini bozduğu ve testosteron biyosentezini engellendiği gösterilmiştir. Serum leptini kan-testis bariyerini geçebilir ve testiküler Leydig hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanarak testosteron biyosentezini düzenleyebilir. Leptin sentezindeki artışın testiküler testosteron sentezinin anahtar faktörleri ve enzimleri olan steroidojenik faktör-1 (Sf-1), steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ve P-450 yan zincir parçalama enziminin mRNA ekspresyonlarında belirgin bir düşüşe neden olduğu, bu durumda testiküler testosteron sentezini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır (Xuejie, 2017).

Vitamin Dinin ayrıca adipogenez ve enerji metabolizmasını düzenlediğine bilinmektedir. Leptin yollarının düzenlenmesinde ve adipogenezin inhibisyonunda önemli rol oynadığı

gösterilmiştir (Nimitphong, 2020). Ayrıca *in vitro* çalışmalar, adiposit kültürüne 1,25 (OH) D3 vitamini eklenmesinin leptin salgılanmasını engellediği ve klinik bir çalışmada da serum 25 (OH) D vitamini ile leptin seviyeleri arasında anlamlı bir negatif ilişki bulunmuştur. İnsülin direnci olan kişilerde dolaşımdaki leptin seviyeleri daha yüksek, 25 (OH) D vitamini seviyelerinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (Madhu ve diğ., 2022; Chenzhao ve diğ., 2016). Bu çalışmada steroidogenezin ilk aşamasında görevli olan StAR proteininin Leydig hücrelerindeki ekspresyonunu göstermek amacıyla immünohistokimya yöntemi yapıldı. Yüksek yağ ve fruktoz diyeti ile oluşturulan MS ve MSD grubunda immün pozitif hücre sayısının SK ve SKD gruplarına göre azaldığı saptandı. Bunun nedeninin yüksek yağ ve yüksek fruktoz içeren diyet tüketimine bağlı olarak endojen leptin seviyesinin artması ve oksidatif strese neden olan hücre içi yolakları aktiveştirmesinden kaynaklı olabileceği bu nedenle de StAR ekspresyonunun diğer gruplara kıyasla azaldığı düşünüldü. Ayrıca vitamin D uygulanan MS grubunda StAR ekspresyonunun MS grubuna kıyasla artmış olduğu da tespit edildi. Vitamin D'nin olası leptin nedenli StAR ekspresyonunun azaltılmasını engellemiş olabileceği sonucuna varıldı.

Hücrel oksidatif stres ve mitokondriyal değişiklikler testiküler disfonksiyonun başlıca nedenleridir. Mitokondri, spermatogenez sırasında hücrel olgunlaşma ve farklılaşmanın yanı sıra sperm hareketliliği, kapasitasyon ve dölleme yeteneği için enerji sağlayarak üreme işlevinde önemli bir rol oynar (Debora ve diğ., 2022). Mitokondriyal disfonksiyon oksidatif dengesizliğe neden olur ve sperm fonksiyonunu etkiler (Koppers ve diğ., 2008). Hiperlipidemik diyetlerin serbest radikal üretimini, oksidatif stresi ve DNA hasarını arttırdığı bilinmektedir (Verderame ve diğ., 2018). Yüksek yağlı, yüksek karbonhidrat içeren diyetlerin tüketimi, süperoksit oluşumu ve oksidatif fosforilasyon gibi biyokimyasal mekanizmalarla oksidatif strese neden olan hücre içi yolakları uyarır. Oksidatif stres, testiste DNA hasarına, testiküler germ hücre apoptozuna, azalmış sperm hareketliliğine ve konsantrasyonuna yol açarak erkek infertilitesinin gelişmesine sebep olur (Hersek ve diğ., 2022).

Sperm DNA'sı, yüksek yağlı diyetin neden olduğu oksidatif strese karşı oldukça hassastır. Bu durum DNA fragmentasyon indeksinin artmasına ve sonuç olarak erkek infertilitesine neden olur (Mariailaria ve diğ., 2018). Yapılan çalışmalarda aşırı yağ birikiminin cinsiyet hormonları profilinde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Seftel, 2006; Liu ve diğ., 2014). Yapılan bir çalışmada obez erkeklerin testis dokularında artmış DNA fragmentasyonu bildirilmiştir (Blokhina ve diğ., 2003). Oksidatif strese bağlı testis hasar modellerinde oksidatif DNA hasarını belirlemek için en sık kullanılan yöntemlerden biri olan 8-OHdG (8-

Hidroksideoksiguanozin) (Mustahsan ve diğ., 2022) düzeyinin ve apoptotik hücre ölümünün arttığı bildirilmiştir (Hersek ve diğ., 2022). Vitaminin D'nin oksidatif stresi azalttığı, DNA ve hücre membranlarını oksidatif hasara karşı koruduğu ve sperm hareketliliğini artırdığı ayrıca vitamin D seviyeleri ile semen kalitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu bilinmektedir (Maghsoumi ve diğ., 2021). VitD eksikliği, obez ve diyabetik kişilerde, kronik hastalığı olan hastalarda ve yaşlılarda artmış oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir ve bu kişilere VitD takviyesinin, oksidatif stresi iyileştirebileceğini göstermiştir (Makariou ve diğ., 2018).

Bu çalışmada hem nuklear hem de mitokondriyal olası oksidatif DNA hasarını belirlemek amacıyla 8-OHdG varlığına bakıldı. MS grubunda diğer gruplara kıyasla 8-OHdG pozitifliğinin oldukça yüksek olduğunu MSD grubunda ise kontrole benzer olduğu saptandı. Yüksek yağ ve fruktoz diyetinin sebep olduğu oksidatif stresin VitD tedavisi ile regüle edilmiş olabileceği düşünüldü.

Testisteki germ hücre dinamikleri, hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge ile düzenlenmektedir (Fua ve diğ., 2017; Angelis ve diğ., 2017). Apoptoz, obezite dahil birçok hastalıkla ilişkilidir. Spermatogenez sırasında germ hücre popülasyonu apoptoz tarafından düzenlense de artan apoptotik aktivite erkek infertilitesine neden olabilir. Yapılan bir çalışmada obez sıçanlardan oluşan grupta patolojik düzeyde apoptoz gözlemlenmiş ve testiküler germ hücre popülasyonunda önemli derecede azalmalar meydana gelmiştir (Choubey ve ark.2020). Yapılan başka bir çalışmada ise yüksek yağlı diyetin testislerde apoptotik hücre artışına neden olduğu bildirilmiştir (Suleiman ve diğ., 2003; Miao ve diğ., 2018).

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), replikasyon ve DNA onarım mekanizmasının bileşeni olarak nükleik asit metabolizmasında oldukça önemlidir. Yapılan bir çalışmada obez hayvanlarda kontrollere kıyasla PCNA mRNA seviyelerinin ve PCNA (+) olan hücre sayılarının kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmüştür (Masoumeh ve diğ.,2021).

Çok sayıda çalışma, VitD'nin, VDR sinyalini aktive ederek hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlediğini bildirmiştir (Gurusubramanian ve Kumar, 2019; Fua ve diğ., 2017). Yapılan bir çalışmada VitD eksikliği olan hayvana VitD takviyesinin fare testislerinde PCNA ekspresyonunu artırarak germ hücre proliferasyonunu uyardığını gösterilmiştir (Fu, 2017). Testis fonksiyonlarının yaşla birlikte azalmasını araştıran başka bir çalışmada ise proliferasyon ve apoptoz ile ilgili olarak VitD'nin rolü araştırılmıştır. Bu çalışma VitD tedavisinin yaşlı testislerde PCNA ekspresyonunu arttığını açıkça göstermiştir. Bu sonuçlar, VitD'nin hücre proliferasyonunu uyardığını ve yaşla ilişkili testiküler germ hücre kaybının VitD tedavisi ile telafi edilebileceğini göstermektedir (Gurusubramanian ve Kumar, 2019).

Bu çalışmada metabolik sendrom sonucu artan adipoz doku miktarının germ hücre dinamiklerini bozduğunu ve dolaylı olarak erkek infertilitesini etkilediğini göstermek amacıyla her grubun kaspaz-3 immün pozitif hücre sayısı hesaplanarak ortalaması alındıktan sonra sadece Metabolik Sendromlu (MS) grupta 2-3 immün pozitif hücre görülmüştür. Apoptoza giden hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL pozitif hücreler de belirlenerek bu sonuç desteklenmiştir.

Ayrıca DNA onarım mekanizmasında ve hücre proliferasyonunda yer alan PCNA'nın immün pozitifliğinin MS grubunda diğer gruplara oranla azaldığı da bulunmuştur. SKD ve MSD grubunda TUNEL pozitif hücrelerin sırasıyla SK ve SKD gruplarına kıyasla azalmış olduğu ve PCNA pozitif hücrelerin ise SKD ve MSD gruplarında diğer iki gruba kıyasla artmış olması Vitamin D'nin hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyararak germ hücre kaybını en aza indirdiğini kanıtlamaktadır. Bu sonuçlar Vitamin D uygulanan SKD ve MSD gruplarındaki 8-OHdG immün pozitifliğinin sırasıyla SK ve MS gruplarına kıyasla düşük olmasını da desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gancheva ve arkadaşlarının (2015) yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu (%10 fruktozlu su ve %17 yağ ve %17 fruktoz) diyet uygulayarak oluşturdukları metabolik sendrom modeli çalışmamızda modifiye edilerek (%17 yağ ve %17 fruktoz içeren özel yem ve %20'lik fruktozlu su) metabolik sendromun neden olduğu testis hasarı ve VitD uygulamasının etkisi araştırıldı. Oluşturulan modelde kan glukoz değerleri, bozulmuş glukoz toleransı ve santral obezite gibi etkenlerin MS ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, metabolik sendromdan kaynaklı olarak meydana gelen adipoz doku artışının hipotalamus-hipofiz-testis eksenini olumsuz etkilediği ve steroidogeneze görevli olan Aromataz ve StAR moleküllerinin ekspresyonlarını değiştirerek steroidogenezin normal işleyişini bozduğu ve sonuç olarak azalmış testosteron üretimine sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yüksek yağ ve yüksek fruktoz içeren diyetin testis morfolojisini de bozarak germ hücre kaybına ve azalmış spermatozoa üretimine sebep olduğu da gösterilmiştir. Yüksek yağ ve yüksek fruktoz içeren diyetin sebep olduğu oksidatif stresin testiste DNA hasarına ve testiküler germ hücre apoptozuna yol açarak erkek infertilitesinin gelişmesine sebep olduğu da saptanmıştır. Steroidogenezin düzenlenmesinde, oksidatif stresin azaltılmasında ve hücre proliferasyonunu artırmada etkisi olduğu düşünülen Vitamin D uygulamasının testiste oluşan hasarın düzeltilmesinde de etkili olduğu tespit edildi. Sonuç olarak bu çalışma metabolik sendromda (%17 yağ ve %17 fruktoz içeren özel yem ve %20'lik fruktozlu su) Vitamin D uygulamasının testis dokusunda StAR proteini üzerine etkilerini gösteren ve steroidogeneze ile ilgili bu kapsamdaki ilk çalışmadır.

Bu çalışmanın devamında Aromataz ve StAR moleküllerinin gen ekspresyonlarına bakılması, elektron mikroskobu ile ultrastrüktürel olarak mitokondri yapısının incelenmesi ve serum leptin düzeylerinin ölçümünün yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Aarts, E., van Groningen, L., Horst, R., Telting, D., van Sorge, A., Janssen, I., & de Boer, H. (2011, May). Vitamin D absorption: consequences of gastric bypass surgery. *European Journal of Endocrinology*, 164(5), 827–832.

Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American journal of reproductive immunology*, 59(1), 2-11.

Aghazadeh, Y., Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2015). Pharmacological regulation of the cholesterol transport machinery in steroidogenic cells of the testis. *Vitamins & Hormones*, 98, 189-227.

Aitken, R. J., Findlay, J. K., Hutt, K. J., & Kerr, J. B. (2011). Apoptosis in the germ line. *Reproduction*, 141(2), 139.

Aitken, R. J., Jones, K. T., & Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health. *Journal of andrology*, 33(6), 1096-1106.

Alberti, K., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P. T., Loria, C. M., & Smith, S. C. (2009, October 20). Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation*, 120(16), 1640–1645.

Alkandurur, A., & Kum, Ş. (2021). The effect of the metabolic syndrome on the histological structure of the testes tissue and the sperm morphology in the rats. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 45(5), 841-850.

Amaral, S., Amaral, A., & Ramalho-Santos, J. (2013). Aging and male reproductive function: a mitochondrial perspective. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, 5(1), 181-197.

Andric, S. A., Kostic, T. S., Stojilkovic, S. S., & Kovacevic, R. Z. (2000). Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1248. *Biology of Reproduction*, 62(6), 1882-1888.

Angelis, C., Galdiero, M., Pivonello, C., Garifalos, F., Menafrà, D., Cariati, F., ... & Pivonello, R. (2017). The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 18, 285-305.

Angelova, P., & Boyadjiev, N. (2013). A review on the models of obesity and metabolic syndrome in rats. *Trakia J Sci*, 11(1), 5-12.

Angelova, P., & Kamenov, Z. (2014, April). Vitamin D in men with metabolic syndrome with low or normal testosterone levels. In *Endocrine Abstracts* (Vol. 35). Bioscientifica.

Arakane, F., King, S. R., Du, Y., Kallen, C. B., Walsh, L. P., Watari, H., ... & Strauss, J. F. (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32656-32662.

- B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, UK, 4th edition, 2007.
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*, 2011.
- Basciano, H., Federico, L., & Adeli, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & metabolism*, 2(1), 1-14.
- Bender, D. A., & Mayes, P. A. (2018). Overview of metabolism & the provision of metabolic fuels. *Harper's illustrated biochemistry*, 31e. New York: McGraw-Hill Education.
- Berg, A. H., & Scherer, P. E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research*, 96(9), 939-949.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.
- Blomberg Jensen, M., Bjerrum, P. J., Jessen, T. E., Nielsen, J. E., Joensen, U. N., Olesen, I. A., ... & Jørgensen, N. (2011). Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Human reproduction*, 26(6), 1307-1317.
- Bouchard, C. (1995). Genetics and the metabolic syndrome. *Int J Obes*, 19(1), S52-S59.
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., Van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., ... & Demay, M. (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine reviews*, 29(6), 726-776.
- Brand, J. S., Van Der Tweel, I., Grobbee, D. E., Emmelot-Vonk, M. H., & Van Der Schouw, Y. T. (2010). Testosterone, sex hormone-binding globulin and the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *International journal of epidemiology*, 40(1), 189-207.
- Bremer AA, Miller WL. (2014) In: *Cellular Endocrinology in Health and Disease*. Alfredo U-A, Michael Conn P, editors. Academic Press. pp. 207–227
- Brown, M. A., Storlien, L. H., Huang, X. F., Tapsell, L. C., Else, P. L., Higgins, J. A., & Brown, I. L. (2011). Dietary fat and carbohydrate composition: Metabolic disease.
- Bucak, M. N., Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Sakin, F., Ateşşahin, A., Kulaksız, R., & Çevik, M. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89(1), 24-30.
- Cameron, A. J., Shaw, J. E., & Zimmet, P. Z. (2004). The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 33(2), 351-375.
- Carreau, S., Genissel, C., Bilinska, B., & Levallet, J. (1999). Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *International journal of andrology*, 22(4), 211-223.
- Carreau, S., Wolczynski, S., & Galeraud-Denis, I. (2010). Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1571-1579.
- Catt, K. J., Harwood, J. P., Clayton, R. N., Davies, T. F., Chan, V., Katikineni, M., ... & Dufau, M. L. (1980, January). Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. In *Proceedings of the 1979 Laurentian Hormone Conference* (pp. 557-622). Academic Press.

Celebi, G., Anapali, M., Dagistanli, F. K., Akdemir, A. S., Aydemir, D., Ulusu, N. N., ... & Komurcu-Bayrak, E. (2022). Effect of vitamin D supplementation on OPG/RANKL signalling activities in endothelial tissue damage in diet-induced diabetic rat model. *Pharmacological Reports*, 1-11.

Chandrasekera, P. C., & Pippin, J. J. (2014). Of rodents and men: species-specific glucose regulation and type 2 diabetes research. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 31(2), 157-176.

Choubey, M., Ranjan, A., Bora, P. S., & Krishna, A. (2020). Protective role of adiponectin against testicular impairment in high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Biochimie*, 168, 41-52.

Chung, B. C., Matteson, K. J., Voutilainen, R., Mohandas, T. K., & Miller, W. L. (1986). Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(23), 8962-8966.

Clark, B. J., Ranganathan, V., & Combs, R. (2001). Steroidogenic acute regulatory protein expression is dependent upon post-translational effects of cAMP-dependent protein kinase A. *Molecular and cellular endocrinology*, 173(1-2), 183-192.

Clement, P., & Giuliano, F. (2015). Anatomy and physiology of genital organs—men. *Handbook of clinical neurology*, 130, 19-37.

Cohen, P. (2010). The Hypogonadal–obesity–vitamin D-insufficiency/deficiency cycle in men. *Medical hypotheses*, 5(75), 473.

Cohen, P. G. (1999). The hypogonadal–obesity cycle: role of aromatase in modulating the testosterone–estradiol shunt—a major factor in the genesis of morbid obesity. *Medical hypotheses*, 52(1), 49-51.

Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.

Costabile, R. (2013). Anatomy and physiology of the male. *Surgical and Medical Management of Male Infertility*, 1.

Crisóstomo, L., Videira, R. A., Jarak, I., Starčević, K., Mašek, T., Rato, L., ... & Alves, M. G. (2020). Diet during early life defines testicular lipid content and sperm quality in adulthood. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 319(6), E1061-E1073.

D'Amelio, P. (2021). Vitamin D deficiency and risk of metabolic syndrome in aging men. *The world journal of men's health*, 39(2), 291.

Desai, N. R., Mahfouz, R., Sharma, R., Gupta, S., & Agarwal, A. (2010). Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. *Fertility and sterility*, 94(4), 1541-1543.

Desai, N., Sharma, R., Makker, K., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2009). Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertility and sterility*, 92(5), 1626-1631.

Després, J. P. (2006). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?. *Annals of medicine*, 38(1), 52-63.

Desroches, S., & Lamarche, B. (2007). The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32(1), 23-32.

di Fiore, M.S.H. (1981) *Atlas of Human Histology*, 5th ed., 209. Lea & Febiger, Philadelphia

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.

Duprez, D., De Buyzere, M., de Backer, T., & Clement, D. (1994). Relationship between vitamin D3 and the peripheral circulation in moderate arterial primary hypertension. *Blood Pressure*, 3(6), 389-393.

Eacker, S. M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H. L., Gong, E. Y., Lee, K., & Braun, R. E. (2008). Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Molecular Endocrinology*, 22(3), 623-635.

Earthman, C. P., Beckman, L. M., Masodkar, K., & Sibley, S. D. (2012). The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *International journal of obesity*, 36(3), 387-396.

El-Shehawi, A. M., El-Shazly, S., Ahmed, M., Alkafafy, M., Sayed, S., Farouk, S., ... & Elseehy, M. M. (2020). Transcriptome analysis of testis from HFD-induced obese rats (*Rattus norvegicus*) indicated predisposition for male infertility. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6493.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Elseweidy, M. M., Amin, R. S., Atteia, H. H., & Ali, M. A. (2017). Vitamin D3 intake as regulator of insulin degrading enzyme and insulin receptor phosphorylation in diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 155-159.

Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J. M., Periasamy, R., Park, S., & Tappy, L. (2005). Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*, 54(7), 1907-1913.

Feldman, H. A., Longcope, C., Derby, C. A., Johannes, C. B., Araujo, A. B., Coviello, A. D., Bremner, W. J., & McKinlay, J. B. (2002, February). Age Trends in the Level of Serum Testosterone and Other Hormones in Middle-Aged Men: Longitudinal Results from the Massachusetts Male Aging Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(2), 589-598.

Fernandes, G. S., Arena, A. C., Campos, K. E., Volpato, G. T., Anselmo-Franci, J. A., Damasceno, D. C., & Kempinas, W. G. (2012). Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 1-6.

Fernandez, C. D., Bellentani, F. F., Fernandes, G. S., Perobelli, J. E., Favareto, A. P. A., Nascimento, A. F., & Kempinas, W. D. (2011). Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 1-10.

Ferreira, P. P., Cangussu, L., Bueloni-Dias, F. N., Orsatti, C. L., Schmitt, E. B., Nahas-Neto, J., & Nahas, E. A. P. (2020). Vitamin D supplementation improves the metabolic syndrome risk profile in postmenopausal women. *Climacteric*, 23(1), 24-31.

Ferris, H. A., & Kahn, C. R. (2012). New mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: make no bones about it. *The Journal of clinical investigation*, 122(11), 3854-3857.

- Florez, H., Martinez, R., Chacra, W., Strickman-Stein, N., & Levis, S. (2007). Outdoor exercise reduces the risk of hypovitaminosis D in the obese. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 103(3-5), 679-681.
- Ford, S. L., Reinhart, A. J., Lukyanenko, Y., Hutson, J. C., & Stocco, D. M. (1999). Pregnenolone synthesis in immature rat Sertoli cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 157(1-2), 87-94.
- Fu, L., Chen, Y. H., Xu, S., Ji, Y. L., Zhang, C., Wang, H., ... & Xu, D. X. (2017). Vitamin D deficiency impairs testicular development and spermatogenesis in mice. *Reproductive Toxicology*, 73, 241-249.
- Gancheva, S., Zhelyazkova-Savova, M., Galunska, B., & Chervenkov, T. (2015). Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scripta Scientifica Medica*, 47(2), 14-21.
- Ghaderi, A., Banafshe, H. R., Motmaen, M., Rasouli-Azad, M., Bahmani, F., & Asemi, Z. (2017). Clinical trial of the effects of vitamin D supplementation on psychological symptoms and metabolic profiles in maintenance methadone treatment patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 79, 84-89.
- Ghosh, S., & Mukherjee, S. (2018). Testicular germ cell apoptosis and sperm defects in mice upon long-term high fat diet feeding. *Journal of cellular physiology*, 233(10), 6896-6909.
- Ginsberg, H. N., Zhang, Y. L., & Hernandez-Ono, A. (2005). Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Archives of medical research*, 36(3), 232-240.
- Goel, P., & Popa, A. R. (2018). The relation between metabolic syndrome and testosterone level. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*, 25(1), 109-114.
- Goldstone, J. V., Sundaramoorthy, M., Zhao, B., Waterman, M. R., Stegeman, J. J., & Lamb, D. C. (2016). Genetic and structural analyses of cytochrome P450 hydroxylases in sex hormone biosynthesis: Sequential origin and subsequent coevolution. *Molecular phylogenetics and evolution*, 94, 676-687.
- Goulis, D. G., & Tarlatzis, B. C. (2008). Metabolic syndrome and reproduction: I. testicular function. *Gynecological Endocrinology*, 24(1), 33-39.
- Griswold, M. D. (1998, August). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 9, No. 4, pp. 411-416). Academic Press.
- Grundy, S. M. (2002). Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106, 3143-3421.
- Grundy, S. M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in cardiovascular medicine*, 26(4), 364-373.
- Gunawan, S., Aulia, A., & Soetikno, V. (2021). Development of rat metabolic syndrome models: A review. *Veterinary World*, 14(7), 1774.
- Halade, G. V., Rahman, M. M., Williams, P. J., & Fernandes, G. (2010). High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(12), 1162-1169.
- Hales, D. B. (2007). Regulation of Leydig cell function as it pertains to the inflammatory response. *The Leydig cell in health and disease*, 305-321.
- Haller, H., & Hanefeld, M. (1975). Synoptische betrachtung metabolischer risikofaktoren. *Lipidstoffwechselstörungen*, 254-264.

Han, T. S., & Lean, M. E. J. (2011). Metabolic syndrome. *Medicine*, 39(1), 24-31.

Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M., & Norman, A. W. (2011, August). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: Genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(4), 543–559. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.010>

Heaney, R. P. (2008). Vitamin D in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(5), 1535-1541.

Hersek, İ., Koroğlu, M. K., COSKUNLU, B., Ertaş, B., Şener, G., & Ercan, F. (2023). Apocynin Ameliorates Testicular Toxicity in High-Fat Diet-Fed Rats By Regulating Oxidative Stress. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 13(1), 75-83.

Hikim, A. S., & Swerdloff, R. S. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*, 4(1), 38-47.

Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., & Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal*, 23(10), 2134-2145.

Hofer, D., Münzker, J., Schwetz, V., Ulbing, M., Hutz, K., Stiegler, P., ... & Obermayer-Pietsch, B. (2014). Testicular synthesis and vitamin D action. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(10), 3766-3773.

Holick, M. F., & Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American journal of clinical nutrition*, 87(4), 1080S-1086S.

Holstein, A. F., Maekawa, M., Nagano, T., & Davidoff, M. S. (1996). Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Archives of histology and cytology*, 59(2), 109-125.

Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease models & mechanisms*, 2(5-6), 231-237.

IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. (2005). International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. http://www.idf.org/webdata/docs/Metabolic_syndrome_def.pdf.

Jensen, M. B. (2014). Vitamin D and male reproduction. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(3), 175-186.

Jensen, M. B., Jørgensen, A., Nielsen, J. E., Steinmeyer, A., Leffers, H., Juul, A., & Rajpert-De Meyts, E. (2012). Vitamin D metabolism and effects on pluripotency genes and cell differentiation in testicular germ cell tumors in vitro and in vivo. *Neoplasia*, 14(10), 952-IN18.

Jensen, M. D., Haymond, M. W., Rizza, R. A., Cryer, P. E., & Miles, J. (1989). Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *The Journal of clinical investigation*, 83(4), 1168-1173.

Jeremy, M., Gurusubramanian, G., & Roy, V. K. (2019). Vitamin D₃ regulates apoptosis and proliferation in the testis of D-galactose-induced aged rat model. *Scientific Reports*, 9(1), 14103.

Johnson, A. D. (Ed.). (2012). *The testis: biochemistry*. Elsevier.

- Jones, T. H. (2007). Testosterone associations with erectile dysfunction, diabetes, and the metabolic syndrome. *European Urology Supplements*, 6(16), 847-857.
- Kaler, L. W., & Neaves, W. B. (1978). Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *The Anatomical Record*, 192(4), 513-518.
- Kalthur, S. G., & Kalthur, G. (2017). *Anatomy and Development of the Male Reproductive System. Male Infertility: A Clinical Approach*, 1-15.
- Kamycheva, E., Sundsfjord, J., & Jorde, R. (2004). Serum parathyroid hormone level is associated with body mass index. The 5th Tromso study. *European Journal of Endocrinology*, 151(2), 167-172.
- Kaur, J. (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 1–21.
- Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., ... & Zacharewski, T. (2002). NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reproductive toxicology*, 16(5), 655-678.
- Keim, N. L., & Havel, P. J. (2013). Fructose: absorption and metabolism.
- Khitan, Z., & Kim, D. H. (2013). Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension. *Journal of nutrition and metabolism*, 2013.
- Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., & Seino, Y. (2000). Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 141(4), 1317-1324.
- Klaunig, J. E., Babich, M. A., Baetcke, K. P., Cook, J. C., Corton, J. C., David, R. M., ... & Fenner-Crisp, P. A. (2003). PPAR α agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *Critical reviews in toxicology*, 33(6), 655-780.
- Kolovou, G. D., Anagnostopoulou, K. K., Salpea, K. D., & Mikhailidis, D. P. (2007). The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *The American journal of the medical sciences*, 333(6), 362-371.
- Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(8), 3199-3207.
- Kort, H. I., Massey, J. B., Elsner, C. W., Mitchell-Leef, D., Shapiro, D. B., Witt, M. A., & Roudebush, W. E. (2006). Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of andrology*, 27(3), 450-452.
- Kotula-Balak, M., Hejmej, A., & Bilińska, B. (2012). Hydroxysteroid Dehydrogenases—localization, function and regulation in the testis. *Intech Chapter*, 11, 265-288.
- Kozan, O., Oguz, A., Abaci, A., Erol, C., Ongen, Z., Temizhan, A., & Celik, S. (2007). Prevalence of the metabolic syndrome among Turkish adults. *European journal of clinical nutrition*, 61(4), 548-553.
- Krishnan, A. V., Swami, S., Peng, L., Wang, J., Moreno, J., & Feldman, D. (2010). Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology*, 151(1), 32-42.

- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J. L., & Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *The FASEB Journal*, 9(13), 1277-1287.
- Kull, M., Kallikorm, R., & Lember, M. (2009). Body mass index determines sunbathing habits: implications on vitamin D levels. *Internal medicine journal*, 39(4), 256-258.
- Kumar, S., Agrawal, D., Sharma, K., & Swain, T. R. (2015). Association of male infertility to metabolic syndrome and other related disorders. *Journal of Integrative Nephrology and Andrology*, 2(4), 107.
- Kwiecinski, G. G., Petrie, G. I., & DeLuca, H. F. (1989). Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *The Journal of nutrition*, 119(5), 741-744.
- Kylin, E. (1923) Studien ueber das hypertonie-hyperglykamie-hyperurikamiesyndrom. *Zentralblatt für innere Medizin*, 44, 105-127.
- Lamirande, E., Leclerc, P., & Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular human reproduction*, 3(3), 175-194.
- Latino, D., Baccari, G. C., Di Fiore, M. M., Cioffi, F., Venditti, M., Giacco, A., & Santillo, A. (2022). Autophagy and mitochondrial damage in the testis of high-fat diet fed rats. *General and Comparative Endocrinology*, 328, 114104.
- Lê, K. A., & Tappy, L. (2006). Fructose Consumption, Lipid Metabolism and the Metabolic Syndrome. *Current Nutrition & Food Science*, 2(3), 221-229.
- Le, M. T., Tran, N. Q. T., Nguyen, N. D., & Nguyen, Q. H. V. (2021). The prevalence and components of metabolic syndrome in men from infertile couples and its relation on semen analysis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 1453-1463.
- Lehr, S., Hartwig, S., & Sell, H. (2012). Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *PROTEOMICS—Clinical Applications*, 6(1-2), 91-101.
- Leisegang, K., Henkel, R., & Agarwal, A. (2019). Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *American journal of reproductive immunology*, 82(5), e13178.
- Lemieux, P., Weisnagel, S. J., Caron, A. Z., Julien, A. S., Morisset, A. S., Carreau, A. M., ... & Gagnon, C. (2019). Effects of 6-month vitamin D supplementation on insulin sensitivity and secretion: a randomised, placebo-controlled trial. *European journal of endocrinology*, 181(3), 287-299.
- Lin, L., Ercan, O., Raza, J., Burren, C. P., Creighton, S. M., Auchus, R. J., ... & Achermann, J. C. (2007). Variable phenotypes associated with aromatase (CYP19) insufficiency in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(3), 982-990.
- Liu, T., Wang, L., Chen, H., Huang, Y., Yang, P., Ahmed, N., & Chen, Q. (2017). Molecular and cellular mechanisms of apoptosis during dissociated spermatogenesis. *Frontiers in physiology*, 8, 188.
- Liu, Y., Zhao, W., Gu, G., Lu, L., Feng, J., Guo, Q., & Ding, Z. (2014). Palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1): An obesity-induced rat testicular marker of reduced fertility. *Molecular reproduction and development*, 81(1), 55-65.

- Lockshin, R. A., & Williams, C. M. (1964). Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmooths. *Journal of Insect Physiology*, 10(4), 643-649.
- Long, L., Qiu, H., Cai, B., Chen, N., Lu, X., Zheng, S., ... & Li, Y. (2018). Hyperglycemia induced testicular damage in type 2 diabetes mellitus rats exhibiting microcirculation impairments associated with vascular endothelial growth factor decreased via PI3K/Akt pathway. *Oncotarget*, 9(4), 5321.
- Lorenzen, M., Boisen, I. M., Mortensen, L. J., Lanske, B., Juul, A., & Jensen, M. B. (2017). Reproductive endocrinology of vitamin D. *Molecular and cellular endocrinology*, 453, 103-112.
- Lotti, F., & Maggi, M. (2018). Sexual dysfunction and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 15(5), 287-307.
- Lotti, F., Marchiani, S., Corona, G., & Maggi, M. (2021). Metabolic syndrome and reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1988.
- Lozano, I., Van der Werf, R., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pinget, M., ... & Dal, S. (2016). High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition & metabolism*, 13, 1-13.
- Lundqvist, J. (2014). Vitamin D as a regulator of steroidogenic enzymes. *F1000Research*, 3, 155.
- M. Al-Ali, B., Gutschi, T., Pummer, K., Zigeuner, R., Brookman-May, S., Wieland, W. F., ... & Aziz, A. (2014). Body mass index has no impact on sperm quality but on reproductive hormones levels. *Andrologia*, 46(2), 106-111.
- Madhu, S. V., Aslam, M., Mishra, B. K., Gupta, A., & Jhamb, R. (2022). Association of 25 (OH) Vitamin D and Leptin in Individuals with Insulin Resistance. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 26(5), 435-438.
- Maghsoumi-Norouzabad, L., Zare Javid, A., Mansoori, A., Dadfar, M., & Serajian, A. (2021). Evaluation of the effect of vitamin D supplementation on spermatogram, seminal and serum levels of oxidative stress indices in asthenospermia infertile men: a study protocol for a triple-blind, randomized controlled trial. *Nutrition journal*, 20(1), 49.
- Mahfouz, R. Z., Sharma, R. K., Said, T. M., Erenpreiss, J., & Agarwal, A. (2009). Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 91(4), 1110-1118.
- Makariou, S. E., Elisaf, M., Challa, A., Tellis, C., Tselepis, A. D., & Liberopoulos, E. N. (2019). Effect of combined vitamin D administration plus dietary intervention on oxidative stress markers in patients with metabolic syndrome: A pilot randomized study. *Clinical nutrition ESPEN*, 29, 198-202.
- Manna, P. R., Dyson, M. T., & Stocco, D. M. (2009). Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Molecular human reproduction*, 15(6), 321-333.
- Manna, P. R., Stetson, C. L., Slominski, A. T., & Pruitt, K. (2016). Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. *Endocrine*, 51, 7-21.
- Marcucci, G., Cianferotti, L., & Brandi, M. L. (2018). Clinical presentation and management of hypoparathyroidism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(6), 927-939.

- Martin, L. J., & Touaibia, M. (2020). Improvement of testicular steroidogenesis using flavonoids and isoflavonoids for prevention of late-onset male hypogonadism. *Antioxidants*, 9(3), 237.
- Martins, A. D., Majzoub, A., & Agawal, A. (2019). Metabolic syndrome and male fertility. *The world journal of men's health*, 37(2), 113-127.
- Means, G. D., Mahendroo, M. S., Corbin, C. J., Mathis, J. M., Powell, F. E., Mendelson, C., & Simpson, E. (1989). Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 264(32), 19385-19391.
- Melguizo-Rodríguez, L., Costela-Ruiz, V. J., García-Recio, E., De Luna-Bertos, E., Ruiz, C., & Illescas-Montes, R. (2021). Role of vitamin D in the metabolic syndrome. *Nutrients*, 13(3), 830.
- Merino, O., Sánchez, R., Gregorio, M. B., Sampaio, F., & Risopatrón, J. (2019). Effect of high-fat and vitamin D deficient diet on rat sperm quality and fertility. *Theriogenology*, 125, 6-11.
- Meydanli, E. G., Gumusel, A., Ozkan, S., Tanriverdi, G., Balci, M. B. C., Develi Is, S., Hazar, A. I., Uysal, M., & Bekpinar, S. (2017, December). Effects of resveratrol on high-fructose-induced testis injury in rats. *Ultrastructural Pathology*, 42(1), 65–73.
- Miao, X. L., Gao, G. M., Jiang, L., Xu, R., & Wan, D. P. (2018). Asiatic acid attenuates high-fat diet-induced impaired spermatogenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3), 2397-2403.
- Migliaccio, V., Di Gregorio, I., Putti, R., & Lionetti, L. (2019). Mitochondrial involvement in the adaptive response to chronic exposure to environmental pollutants and high-fat feeding in a rat liver and testis. *Cells*, 8(8), 834.
- Miller, W. L. (2002). Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Molecular and cellular endocrinology*, 198(1-2), 7-14.
- Miller, W. L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and cellular endocrinology*, 379(1-2), 62-73.
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*, 32(1), 81-151.
- Miller, W. L., & Bose, H. S. (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking: thematic review series: genetics of human lipid diseases. *Journal of lipid research*, 52(12), 2111-2135.
- Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1–10.
- Moradi-Ozarlou, M., Moshari, S., Agdam, H. R., Nomanzadeh, A., Shahmohamadlou, S., & Razi, M. (2021). High-fat diet-induced obesity amplifies HSP70-2a and HSP90 expression in testicular tissue; correlation with proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Life Sciences*, 279, 119633.
- Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., Vera, G., Astier, J., Landrier, J. F., & Miguel, M. (2018). High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients*, 10(10), 1502.
- Nakajin, S., Shively, J., Yuan, P. M., & Hall, P. F. (1981, July 1). Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymic activities (17.alpha.-hydroxalase and C17,20 associated with one protein. *Biochemistry*, 20(14), 4037–4042.

- Nimitphong, H., Park, E., & Lee, M. J. (2020). Vitamin D regulation of adipogenesis and adipose tissue functions. *Nutrition research and practice*, 14(6), 553-567.
- Nitta, H., Bunick, D. A. V. I. D., Hess, R. A., Janulis, L. Y. N. N., Newton, S. C., Millette, C. F., ... & Bahr, J. M. (1993). Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*, 132(3), 1396-1401.
- Nordt, C. A., & DiVasta, A. D. (2008). Gynecomastia in adolescents. *Current opinion in pediatrics*, 20(4), 375-382.
- Norman, A. W., Bishop, J. E., Bula, C. M., Olivera, C. J., Mizwicki, M. T., Zanello, L. P., ... & Okamura, W. H. (2002). Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by $1\alpha, 25$ (OH) 2-vitamin D₃. *Steroids*, 67(6), 457-466.
- Palmer, N. O., Bakos, H. W., Fullston, T., & Lane, M. (2012). Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*, 2(4), 253-263.
- Panchal, S. K., & Brown, L. (2010). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Payne, A. H., & Hardy, M. P. (Eds.). (2007). *The Leydig cell in health and disease*. Springer Science & Business Media.
- Peltola, V., Huhtaniemi, I., & Ahotupa, M. (1992). Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *Journal of Andrology*, 13(5), 450-455.
- Penning, T. M. (1997). Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine reviews*, 18(3), 281-305.
- Perna, S. (2019). Is vitamin D supplementation useful for weight loss programs? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicina*, 55(7), 368.
- Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2006). Etiology of insulin resistance. *The American journal of medicine*, 119(5), S10-S16.
- Pierrepont, C. G., Griffiths, K., Grant, J. K., & Stewart, J. S. S. (1966). Neutral steroid sulphation and oestrogen biosynthesis in vitro by a feminizing Leydig cell tumour of the testis. *Journal of Endocrinology*, 35(4), 409-417.
- Pikuleva, I. A. (2006). Cholesterol-metabolizing cytochromes P450. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(4), 513-520.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Pollex, R. L., & Hegele, R. A. (2006). Genetic determinants of the metabolic syndrome. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*, 3(9), 482-489.
- Pozza, C., & Isidori, A. M. (2018). What's behind the obesity epidemic. *Imaging in bariatric surgery*, 1-8.
- Practice C. R. A. (2019). Retracted: A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology research and practice*, 2019, 4301528. <https://doi.org/10.1155/2019/4301528>

- Prasad, P., & Kochhar, A. (2016). Interplay of vitamin D and metabolic syndrome: a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 10(2), 105-112.
- Print, C. G., & Loveland, K. L. (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*, 22(5), 423-430.
- Pucci, G., Alcidì, R., Tap, L., Battista, F., Mattace-Raso, F., & Schillaci, G. (2017). Sex-and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature. *Pharmacological research*, 120, 34-42.
- Rahali, D., Dallagi, Y., Hupkens, E., Veegh, G., Mc Entee, K., Asmi, M. E., ... & El Golli, N. (2020). Spermatogenesis and steroidogenesis disruption in a model of metabolic syndrome rats. *Archives of physiology and biochemistry*, 1-11.
- Rajakumar, A., & Senthilkumaran, B. (2020). Steroidogenesis and its regulation in teleost-a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46, 803-818.
- Rao, B., Soufir, J. C., Martin, M., & David, G. (1989). Lipid peroxidation in human spermatozoa as relatd to midpiece abnormalities and motility. *Gamete research*, 24(2), 127-134.
- Razzaque, M. S. (2017). Can adverse effects of excessive vitamin D supplementation occur without developing hypervitaminosis D?. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 180, 81-86.
- Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.
- Rizkalla, S. W. (2010). Health implications of fructose consumption: A review of recent data. *Nutrition & metabolism*, 7, 1-17.
- Robertson, G. S., LaCasse, E. C., & Holcik, M. (2009). Programmed Cell Death. In *Pharmacology* (pp. 455-473). Academic Press.
- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y., & Carvajal, K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice?. *Nutrition & diabetes*, 10(1), 24.
- Rooij, D. G., & Russell, L. D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology*, 21(6), 776-798.
- Ross, M.H,& Pawlina, W. (2010). *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology* (6th ed.)
- Ruwanpura, S. M., McLachlan, R. I., & Meachem, S. J. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. *Journal of Endocrinology*, 205(2), 117-131.
- Sakkas, D., Urner, F., Bizzaro, D., Manicardi, G., Bianchi, P. G., Shoukir, Y., & Campana, A. (1998). Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 11-19.
- Sassi, F., Tamone, C., & D'Amelio, P. (2018). Vitamin D: nutrient, hormone, and immunomodulator. *Nutrients*, 10(11), 1656.
- Savitskaya, M. A., & Onishchenko, G. E. (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80, 1393-1405.

- Schaller, C. E., Wang, C. L., Beck-Engeser, G., Goss, L., Scott, H. S., Anderson, M. S., & Wabl, M. (2008). Expression of Aire and the early wave of apoptosis in spermatogenesis. *The Journal of Immunology*, 180(3), 1338-1343.
- Schuler, M., & Green, D. R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(6), 684-688.
- Sebastian, S., & Bulun, S. E. (2001). A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10), 4600-4602.
- Seftel, A. (2006). Male hypogonadism. Part II: etiology, pathophysiology, and diagnosis. *International journal of impotence research*, 18(3), 223-228.
- Shafik, A., & Olfat, S. (1981). Scrotal lipomatosis. *British journal of urology*, 53(1), 50-54.
- Shaha, C., Tripathi, R., & Mishra, D. P. (2010). Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1501-1515.
- Shapses, S. A., Sukumar, D., Schneider, S. H., Schlussek, Y., Brolin, R. E., & Taich, L. (2012). Hormonal and dietary influences on true fractional calcium absorption in women: role of obesity. *Osteoporosis International*, 23, 2607-2614.
- Shulman, G. I. (2014). Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *New England Journal of Medicine*, 371(12), 1131-1141.
- Sikka, S. C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current medicinal chemistry*, 8(7), 851-862.
- Sofi, N. Y., Jain, M., Kapil, U., Seenu, V., Kamal, V. K., & Pandey, R. M. (2017). Nutritional risk factors and status of serum 25 (OH) D levels in patients with breast cancer: A case control study in India. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 175, 55-59.
- Sofikitis, N., Giotitis, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., & Pardalidis, N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(3-5), 323-330.
- Steger, K., & Weidner, W. (2011). Anatomy of the male reproductive system. *Practical Urology: Essential Principles and Practice: Essential Principles and Practice*, 57-68.
- Stocco, D. M., & McPhaul, M. J. (2006). Physiology of testicular steroidogenesis. In *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (pp. 977-1016). Academic Press.
- Storbeck, K. H., Swart, P., & Swart, A. C. (2007). Cytochrome P450 side-chain cleavage: insights gained from homology modeling. *Molecular and cellular endocrinology*, 265, 65-70.
- Su, X., Lin, D., Luo, D., Sun, M., Wang, X., Ye, J., ... & Guan, Q. (2019). Cyclophilin D participates in the inhibitory effect of high-fat diet on the expression of steroidogenic acute regulatory protein. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(10), 6859-6871.
- Suleiman, J. B., Nna, V. U., Zakaria, Z., Othman, Z. A., Bakar, A. B. A., & Mohamed, M. (2020). Obesity-induced testicular oxidative stress, inflammation and apoptosis: Protective and therapeutic effects of orlistat. *Reproductive Toxicology*, 95, 113-122.

- Taniyama, Y., & Griendling, K. K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42(6), 1075-1081.
- Tchernof, A., & Després, J. P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*.
- Terashima, M., Toda, K., Kawamoto, T., Kuribayashi, I., Ogawa, Y., Maeda, T., & Shizuta, Y. (1991). Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 285(2), 231-237.
- Toda, K., Terashima, M., Kawamoto, T., Sumimoto, H., Yokoyama, Y., Kuribayashi, I., ... & Shizuta, Y. (1990). Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *European Journal of Biochemistry*, 193(2), 559-565.
- Torino, C., Pizzini, P., Cutrupi, S., Tripepi, R., Vilasi, A., Tripepi, G., ... & Zoccali, C. (2017). Effect of vitamin D receptor activation on the AGE/RAGE system and myeloperoxidase in chronic kidney disease patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Tugaeva, K. V., & Sluchanko, N. N. (2019). Steroidogenic acute regulatory protein: structure, functioning, and regulation. *Biochemistry (Moscow)*, 84, 233-253.
- Vague, J. (1947). Sexual differentiation; Factor determining forms of obesity. *La Presse Médicale*, 55(30), 339.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Veldurthy, V., Wei, R., Campbell, M., Lupicki, K., Dhawan, P., & Christakos, S. (2016). 25-Hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase: a key regulator of 1, 25 (OH) 2D3 catabolism and calcium homeostasis. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 100, pp. 137-150). Academic Press.
- Verderame, M., Migliaccio, V., & Scudiero, R. (2018). Role of estrogen receptors, P450 aromatase, PCNA and p53 in high-fat-induced impairment of spermatogenesis in rats. *Comptes Rendus Biologies*, 341(7-8), 371-379.
- Vermeulen, A., Kaufman, J. M., Goemaere, S., & Van Pottelberg, I. (2002). Estradiol in elderly men. *The aging male*, 5(2), 98-102.
- Vimaleswaran, K. S., Berry, D. J., Lu, C., Tikkanen, E., Pilz, S., Hiraki, L. T., ... & Hyppönen, E. (2013). Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS medicine*, 10(2), e1001383.
- Vitale, I., Pietrocola, F., Guilbaud, E., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., ... & Pasparakis, M. (2023). Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death & Differentiation*, 1-58.
- Wang, C., Cui, Y. G., Wang, X. H., Jia, Y., Sinha Hikim, A., Lue, Y. H., ... & Swerdloff, R. S. (2007). Transient scrotal hyperthermia and levonorgestrel enhance testosterone-induced spermatogenesis suppression in men through increased germ cell apoptosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(8), 3292-3304.

- Wang, L., Lu, H., Wang, S., Liu, H., Guo, M., Bai, H., ... & Zhang, T. (2022). Vitamin D Receptor affects male mouse fertility via regulation of lipid metabolism and testosterone biosynthesis in testis. *Gene*, 834, 146589.
- Wang, Y., Chen, F., Ye, L., Zirkin, B., & Chen, H. (2017). Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(4), R111.
- Wang, Y., Yang, J., & Yi, J. (2012). Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxidants & redox signaling*, 16(7), 649-657.
- Weinbauer, G. F., Aslam, H., Krishnamurthy, H., Brinkworth, M. H., Einspanier, A., & Hodges, J. K. (2001). Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. *Biology of reproduction*, 64(1), 120-126.
- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2010). Physiology of Testicular Function. *Andrology*, 11-59.
- Winter, A. G., Zhao, F., & Lee, R. K. (2014). Androgen deficiency and metabolic syndrome in men. *Translational andrology and urology*, 3(1), 50.
- Wisloff, U., Najjar, S. M., Ellingsen, Ø., Haram, P. M., Swoap, S., Al-Share, Q., ... & Britton, S. L. (2005). Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, 307(5708), 418-420.
- Wofford, M. R., King, D. S., & Harrell, T. K. (2006). Drug-induced metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Hypertension*, 8(2), 114-119.
- Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Ahmad, F., & Ima-Nirwana, S. (2018). The effects of a modified high-carbohydrate high-fat diet on metabolic syndrome parameters in male rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 126(04), 205-212.
- Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Ahmad, F., & Ima-Nirwana, S. (2016). The relationship between metabolic syndrome and osteoporosis: a review. *Nutrients*, 8(6), 347.
- Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & metabolism*, 13, 1-12.
- Wortsman, J., Matsuoka, L. Y., Chen, T. C., Lu, Z., & Holick, M. F. (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 72(3), 690-693.
- Wu, F. C. W. (1992). 7 Testicular steroidogenesis and androgen use and abuse. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*, 6(2), 373-403.
- Wu, J. Q., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200-206.
- Xu, H., Li, X., Adams, H., Kubena, K., & Guo, S. (2018). Etiology of metabolic syndrome and dietary intervention. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 128.
- Yang, Z. H., Miyahara, H., Takeo, J., & Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & metabolic syndrome*, 4, 1-10.

- Ye, L., Guo, J., & Ge, R. S. (2014). Environmental pollutants and hydroxysteroid dehydrogenases. *Vitamins & hormones*, 94, 349-390.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- Zanatta, L., Zamoner, A., Gonçalves, R., Zanatta, A. P., Bouraïma-Lelong, H., Carreau, S., & Silva, F. R. M. B. (2011). 1α , 25-Dihydroxyvitamin D3 signaling pathways on calcium uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. *Biochemistry*, 50(47), 10284-10292.
- Zanatta, L., Zamoner, A., Gonçalves, R., Zanatta, A. P., Bouraïma-Lelong, H., Bois, C., ... & Silva, F. R. M. B. (2011). Effect of 1α , 25-dihydroxyvitamin D3 in plasma membrane targets in immature rat testis: ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 515(1-2), 46-53.
- Zanatta, L., Zamoner, A., Zanatta, A. P., Bouraïma-Lelong, H., Delalande, C., Bois, C., ... & Silva, F. R. M. B. (2011). Nongenomic and genomic effects of 1α , 25 (OH) 2 vitamin D3 in rat testis. *Life sciences*, 89(15-16), 515-523.
- Zanuy, M. V., & Carranza, F. H. (2007). Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 16(4), 63-70.
- Zarotsky, V., Huang, M. Y., Carman, W., Morgentaler, A., Singhal, P. K., Coffin, D., & Jones, T. H. (2014). Systematic literature review of the risk factors, comorbidities, and consequences of hypogonadism in men. *Andrology*, 2(6), 819-834.
- Zucker, L. M., & Antoniades, H. N. (1972). Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology*, 90(5), 1320-1330.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

METABOLİK SENDROMLU ŞİÇANLARDA VİTAMİN D UYGULAMASININ TESTİS DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 8	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	acikerisim.demiroglu.bilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	avesis.iuc.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☐ Kurum izni gerekmektedir.
- ☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Tuğçe ÖZBİLENLER

