T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

METABOLİK SENDROMLU SIÇANLARIN TESTİS DOKUSUNDA VİTAMİN D'NİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MERYEM SARIKAYA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BİLGE ŞADAN ÖZSAİT SELÇUK

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

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

Meryem Sarıkaya

İTHAF

Biricik aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezim olarak bana bu çalışmayı yapma fırsatı veren ve bu süreçte her türlü yanımda olan, yol gösteren sevgili danışmanım Doç. Dr. Bilge Özsait Selçuk'a çok teşekkür ederim. Deney sürecindeki iş birliktelikleri ve deneyin kurulmasındaki büyük katkılarından dolayı Prof. Dr. Ayşe Evrim Bayrak ve Doç. Dr. Fatma Kaya Dağıstanlı'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar alanında samimi ve sabırlı bir şekilde benimle deneyimlerini paylaşan Betül Zorkaya'ya ve dönem arkadaşım, kaderdaşım Esra Nur Demirtaş'a teşekkür ederim.

Bu süreçte tanıştığım ve birlikte yeni yolculuklara adım attığımız müstakbel eşim Ferhat Aktaş'a bana olan saygısı, sevgisi, inancı ve desteği için teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca maddi-manevi beni her türlü destekleyen, yanımda olan, benimle sevinip, benimle üzülen, benimle gurur duyan, canım, biricik aileme; babam Bekir Sarıkaya'ya, annem Selma Sarıkaya'ya ve kardeşlerim Büşra Çakmak ve Burak Kaan Sarıkaya'ya çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39216

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Meryem Sarıkaya tarafından Doç. Dr. Bilge Ş. Özsait Selçuk'un danışmanlığında hazırlanan "Metabolik Sendromlu Sıçanların Testis Dokusunda Vitamin D'nin Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 05/08/2024 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Fatma Kaya Dağıstanlı
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Jüri-(Danışman)

Doç. Dr. Bilge Ş. Özsait Selçuk
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. A. Evrim Bayrak
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... XİX
ABSTRACT XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM 4
2.1.1. ER Yapısı 4
2.1.2. ER işlevleri 7
2.1.2.1. DER'de gerçekleşen işlevler 7
2.1.2.2. GER'de gerçekleşen işlevler 9
2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ 9
2.2.1. Katlanmamış Protein Yanıtı 11
2.2.1.1. IRE1 Yolağı 11
2.2.1.2. PERK Yolağı 13
2.2.1.3. ATF6 Yolağı 14
2.2.2. ERS Aracılı Hücre Ölümü 15
2.2.3. ERS ile İlişkili Hastalıklar 20
2.2.3.1. Metabolik Sendrom ve ERS 25
2.2.3.2. Metabolik Sendromda Vitamin D'nin Etkisi 31
2.3. ERKEK İNFERTİLİTESİ 39
2.3.1. Testis Yapısı ve Fonksiyonu 40
2.3.2. Spermatogenez 42
2.3.3. Testiste Endoplazmik Retikulum Stresi 44
2.3.4. Erkek İnfertilitesinde Vitamin D'nin Etkisi 47

2.4. TEZ ÇALIŞMASINDA ARAŞTIRILAN GENLER....49
2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkili Genler....49
2.4.2. Vitamin D ile İlişkili Genler....53
2.4.3. Testis Fonksiyonu ile İlgili Seçilen Gen....54
3. GEREÇ VE YÖNTEM....56
3.1. Deney Hayvanları....56
3.2. Gereçler....56
3.2.1. Cihazlar....56
3.2.2. Kitler....57
3.2.3. Kimyasallar....57
3.3. Yöntemler....58
3.3.1. Örneklerin eldesi....58
3.3.2. RNA'ların elde edilmesi....60
3.3.3. cDNA Sentezi....62
3.3.4. Primer Tasarımı....63
3.3.5. qRT-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Analizi....64
3.3.6. Gen Ekspresyon Datasının Analizi ve İstatiksel Analizler....65
4. BULGULAR....67
4.1. Genlerin Testis Dokusunda Ekspresyonlarını Gösteren Biyoinformatik Analizi....67
4.2. Gene özgü Primer Tasarımı....77
4.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile Gen Ekspresyon Analizi....77
4.4. Gen Ekspresyon Verilerinin Analizi....83
5. TARTIŞMA....89
KAYNAKLAR....94
HAM VERİLER....107
FORMLAR....111
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI....112

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Endoplazmik retikulum stresinin çeşitli hastalıklarla ilişkisi 21
Tablo 2: Endoplazmik retikulum stres temelli klinik çalışmalar 24
Tablo 3: D vitamini takviyesinin metabolik sendrom üzerindeki etkilerinin özeti. 35
Tablo 4: cDNA sentezi reaksiyon içeriği 62
Tablo 5: cDNA sentezi reaksiyon koşulları 62
Tablo 6: Tez çalışmasında kullanılan primer çiftlerine ait diziler 77
Tablo 7: Testis dokusunda VitD uygulamasının kontrol gruplarında karşılaştırılması...84
Tablo 8: Testis dokusunda VitD uygulamasının metabolik sendrom gruplarında karşılaştırılması 85

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: (A) Yoğun salgı gerçekleştiren pankreatik hücrelerde GER membranı ve bağlı ribozomların yer aldığı elektron mikroskobi görüntüsü. Sol üst bölümde nükleus ve nükleer memranlar izlenebilmektedir. (B) ER membranına bağlı poliribozomların elektron mikrografisi..... 5
Şekil 2: (A) İnsan testisinde testosteron hormon salgılayan Leyding hücrelerindeki DER yapılarının elektron mikroskobi görüntüsü. (B) Karaciğer hücrelerinde DER ve GER'in üç boyutlu yeniden yapılandırılması..... 6
Şekil 3: ER'nin yapısı ve yeniden modellenmesi 7
Şekil 4: ERN1 moleküler etkileşimleri..... 12
Şekil 5: EIF2AK3 moleküler etkileşimleri 14
Şekil 6: ATF6 moleküler etkileşimleri 15
Şekil 7: Endoplazmik retikulum stresi sinyal yolakları 17
Şekil 8: Katlanmamış protein yanıtı, UPR..... 19
Şekil 9: Metabolik Sendromun patofizyolojisi 27
Şekil 10: Vitamin D metabolizması..... 32
Şekil 11: Vitamin D'nin aktivasyonu 33
Şekil 12: Testisin anatomik bileşenleri ve testiküler lümenin histolojik yapısı 42
Şekil 13: Spermatogenez 43
Şekil 14: Tez çalışmasında kullanılan yöntem akış şeması 58
Şekil 15: Sıçanlardan testis dokusunun diseksiyonu 59
Şekil 16: Disekte edilen testis dokusu 60
Şekil 17: Total RNA izolasyonu sırasında pelletlerin kurutulması aşaması..... 61
Şekil 18: cDNA örnekleri 63
Şekil 19: Mikroplate tasarım örneği 65
Şekil 20: Sıçanlarda *Perk* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi..... 68
Şekil 21: Sıçanlarda *Ire1* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi..... 69
Şekil 22: Sıçanlarda *Atf6* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi..... 70
Şekil 23: Sıçanlarda *Atf4* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi..... 71
Şekil 24: Sıçanlarda *Chop* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi..... 72
Şekil 25: Sıçanlarda *Grp78* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi..... 73
Şekil 26: Sıçanlarda *Erp57* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi 74

Şekil 27: Sıçanlarda *Vdr* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi 75
Şekil 28: Sıçanlarda *Cyp19a1* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi... 76
Şekil 29: SK grubunda *Actb, Perk, Vdr, Atf4* ve *Cyp19a1* genlerinin amplifikasyon eğrileri 78
Şekil 30: SK grubunda *Actb, Perk, Vdr, Atf4* ve *Cyp19a1* genlerinin çözülme eğrileri. 79
Şekil 31: qRT-PCR analizinde SKD3 örneğine ait gen amplifikasyon eğrileri 79
Şekil 32: SKD3'ün *Actb, Atf4, Perk, Vdr* ve *Cyp19a1* genlerinin çözülme eğrileri ve pikleri 80
Şekil 33: MS4'te *Perk* geninin çözülme eğrileri 80
Şekil 34: SK1, MS1 ve MSD1 örneklerinde *Atf6* geninin çözülme eğrileri..... 81
Şekil 35: MSD1-2-3-4-5 örneklerinde *Atf4* geninin çözülme eğrileri 81
Şekil 36: *Grp78* geninin çözülme eğrileri..... 82
Şekil 37: SKD1-2-3-4-5 örneklerinde *Vdr* geninin çözülme eğrileri 82
Şekil 38: SK7, SK9, MS9, MSD7 ve MSD8 örneklerinde *Cyp19a1* geninin çözülme eğrileri 83
Şekil 39: MS, MSD ve SKD gruplarında relatif kantitasyon değerlerinin ANOVA testi ile karşılaştırılması 86
Şekil 40: Testis dokusunda MetS indüklü ERS yolağı 87
Şekil 41: MSD grubunda VitD takviyesi sonrası genlerin korelasyon ilişkisi 88

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ER:	Endoplazmik retikulum
GER:	Granüllü endoplazmik reticulum
ERS:	Endoplazmik retikulum stresi
UPR:	Katlanmamış protein yanıtı
PERK:	Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz
IRE1:	İnositol gerektiren kinaz 1
ATF6:	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
GRP78:	Glukozla düzenlenen protein 78
MetS:	Metabolik sendrom
TEKHARF:	Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri
VitD:	D vitamini
VDR:	D vitamini reseptörü
Ca^{+2}:	Kalsiyum
ERGIC:	Endoplazmik retikulum-Golgi ara bölgesi
ATP:	Adenozin trifosfat
PLC:	Fosfolipaz C
IP3:	İnositol 1,4,5-trifosfat
IPR3:	İnositol 1,4,5-trifosfat reseptörü
RyR:	Ryanodin reseptörleri
SERCA:	Sarkoendoplazmik retiküler Ca^{+2} ATPaz

mRNA: Mesajcı RNA

SRP: Sinyal tanıma partikülü

ROS: Reaktif oksijen türleri

ERAD: Endoplazmik retikulum ilişkili yıkım

miRNA: Mikro RNA

lcnRNA Uzun kodlamayan RNA

TRAF2: Tümör nekroz faktör reseptörü

JNK: Jun N-terminal kinaz

bZIP: Temel lösin fermuar

XBP1: X-box bağlayıcı protein 1

XBP1s: İşlenmiş X-box bağlayıcı protein 1

RIDD: Düzenlenmiş IRE1 bağımlı yıkım

GCN2: Genel kontrol baskılanamayan 2 kinaz

HRI: Heme düzenlenmiş eIF2a kinaz

eIF2a: Ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 2a

eIF2B: Ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 2B

ATF4: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4

C/EBP: CAAT/enhancer-bağlayıcı protein

CHOP: CAAT/enhancer-bağlayıcı protein (C/EBP) homoloğu olan protein

GRP94: Glukozla düzenlenen protein 94

GADD34: DNA hasarı indüklenebilir 34

CRT:	Kalretikülin
PDI:	Protein disülfid izomeraz
MLKL:	Psödokinaz gibi karışık soy kinaz alanı
S1P:	Site-1 proteaz
S2P:	Site-2 proteaz
CREB:	Siklik AMP düzenleyici element bağlayıcı protein
CREB3L3:	cAMP düzenleyici element bağlayıcı protein 3 benzeri 3
PUMA:	p53 apoptozun yukarı regüle edilmiş modülatörü
NOXA:	Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1
BID:	BH3 etkileşimli-domain ölüm agonisti
BIM:	Bcl-2 benzeri protein 11
BH3:	Proapoptotik proteinler
TRAIL-R1/DR4:	TNF reseptör süper aile üyesi 10a
TRAIL-R2/DR:	TNF reseptör süper aile üyesi 10b
MCL-1:	MCL1 apoptoz düzenleyicisi
ULK1:	unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1
ASK1:	Apoptotik sinyal düzenleyici kinaz 1
RIPK3:	Reseptör etkileşimli serin/treonin kinaz 3
SREBP-1c:	Sterol düzenleyici element bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1
Bcl-2:	BCL2 apoptoz düzenleyicisi

AH: Alzheimer hastalığı

PH: Parkinson hastalığı

ALS: Amyotrofik lateral skleroz (ALS)

IL-6: İnterlökin 6

CCL2: C-C motifli kemokin ligand 2

CCL20: C-C motifli kemokin ligand 20

CCL3: C-C motifli kemokin ligand 3

CXCL1: C-X-C motifli kemokin ligand 1

CXCL10: C-X-C motifli kemokin ligand 10

Lcn2: Lipokalin 2

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

C3: Komplementer C3

HİFα: Hipoksi indüklenmiş faktör 1α

MYC: MYC proto-onkogen, bHLH transkripsiyon faktörü

IL-β: İnterlökin β

TNFα: Tümör nekroz faktörü α

TLR: Toll-benzeri reseptör

T2D: Tip 2 diyabet

ABCA1: ATP bağlayıcı kaset alt ailesi A üye 1

CETP: Kolesteril ester transfer proteini

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz 3

LPL: Lipoprotein lipaz

TAF8: TATA kutusu bağlayıcı protein ilişkili faktör 8

APOD: Apolipoprotein

APOA5: Apolipoprotein A5

APOE: Apolipoprotein E

APOA4: Apolipoprotein A4

APOC3: Apolipoprotein C3

RETN: Rezistin

CRP: C-reaktif protein

UCP2: Ayrışmayan protein 2

UCP3: Ayrışmayan protein 3

PPARa: Peroksizom proliferatör aktive reseptör alfa

PPARg: Peroksizom proliferatör aktive reseptör gama

GAL: Galanin ve GMAP prepropeptide

USF1: Yukarı akış transkripsiyon faktörü 1

FGB: Fibrinojen beta zinciri

FGG: Fibrinojen gama zinciri

TCF7L2: Transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2

FTO: FTO alfa-ketoglutarat bağımlı dioksijenaz

PSRC1: Prolin ve serin bakımından zengin sarmal bobin 1

ADAM8: ADAM metalopeptidaz etki alanı 8

CYP19A1: Sitokrom P450 aile 19 alt aile A üye 1

ESR1: Östrojen reseptörü 1

MIF: Makrofaj inhibitör faktör

GLUT4: Çözünen madde taşıyıcı aile 2 üye 4

ERp5: Protein disülfür izomeraz ailesi A üye 6

WFS1: Wolframin ER transmembran glikoprotein

KVH: Kardiyovasküler hastalıklar

Hcy: Homosistein

NF-κB: Nükleer faktör kappa B alt birimi 1

Ang II: Anjiyotensin II

NAFLD: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı

NASH: Alkolik olmayan steatohepatit

UVB: Ultraviyole

DBP: VitD bağlayıcı protein

RXR: Retinoid X reseptör

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü,

NC1: Kolajen olmayan 1

(LG)3/4/5: Laminin peptidleri

MAPK-9: Mitojenle aktive olan protein kinaz 9

DEHP: Di-2-(etilheksil) fitalat

Cav-1: Caveolin-1

GLP-1:	Glukagon benzeri peptid-1
PA:	Palmitik asit
TSSK4:	Testise özgü serin kinaz 4
SNP:	Tek nükleotid polimorfizmi
IGF-1:	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
PI3K/AKT:	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz/AKT serin/treonin kinaz
TGF-β:	Dönüştürücü büyüme faktörü-β
iNOS:	Nitrik oksit sentazın indüklenebilir izoformu
HSD3B1:	Hidroksi-delta-5-steroid dehidrojenaz, 3 beta- ve steroid delta-izomeraz 1
ABD:	ATP bağlayıcı bölge
SBD:	Substrat bağlayıcı bölge
CS GRP78:	Hücre yüzeyinde GRP78
HIV-1:	İnsan İmmünoyetmezlik Virüsü-1
ERO1α:	Endoplazmik retikulum oksidoredüktaz 1 alfa
PGC-1α:	PPARG koaktivatör 1 alfa
dNTP:	Deoksinükleotitfosfatlar
MgCl2:	Magnezyum klorür
GTC:	Guanidinyum tiyosiyanat
NaOH:	Sodyum hidroksit
MS:	Metabolik sendrom oluşturulan sıçan grubu
MSD:	Metabolik sendrom oluşturulduktan sonra VitD uygulanan grup

SKD:	Sadece VitD uygulanan grup
SK:	Sağlıklı kontrol grubu
qRT-PCR:	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
cDNA:	Tamamlayıcı DNA
RNA:	Ribonükleik asid
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NCBI:	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
MC:	Çözülme eğrileri
TM:	Çözülme sıcaklığı eğrileri
Ct değerleri:	Eşik döngüsü (‘Threshold cycle’) değerleri
RQ:	Relatif kantitasyon
StAR:	Steroidojenik akut düzenleyici protein
CYP11A1:	Sitokrom P450 aile 11 alt aile A üye 1
HSD3b:	Hidroksi-delta-5-steroid dehidrojenaz, 3 beta- ve steroid delta-izomeraz kümesi
HSD17b:	Hidroksisteroid 17-beta dehidrojenaz
SIRT1:	Sirtuin 1- protein

ÖZET

Sarıkaya, M. (2024). Metabolik Sendromlu Sıçanların Testis Dokusunda Vitamin D'nin Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Küresel epidemi olarak bahsedilen metabolik sendrom (MetS), insülin direnci, yüksek kolesterol seviyesi ve hipertansiyon gibi birkaç faktörün bir arada bulunmasıyla isimlendirilen multifaktöriyel bir durumdur. MetS'nin erkek üreme sistemi üzerine olumuz etkilerini araştıran çalışmalar da bulunmaktadır. MetS'nin etki yolaklarından birisi endoplazmik retikulum stresininin (ERS) tetiklenmesidir. ERS, yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin birikimi sonucu protein homeostazının bozulmasıyla meydana gelmektedir. ERS'ye cevap olarak *PERK*, *IRE1* ve *ATF6* genlerinin rol oynadığı katlanmamış protein yanıtı (UPR) yolakları aktifleşmektedir. UPR aktivasyonu sonucu stresin ağırlığına bağlı olarak ya ERS ortadan kaldırılarak homeostaz sağlanmakta ya da apoptoz indüklenmektedir. Diğer yandan, yapılan çalışmalarda D vitamini (VitD) uygulamasının MetS'nin olumsuz etkilerini düzeltici etki gösterdiği saptanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı MetS modeli oluşturulan sıçanların testis dokusunda VitD'nin ERS üzerine etkisinin incelenmesidir. Çalışmada dört gruba ayrılan (sağlıklı kontrol grubu (SK), sağlıklı+VitD uygulanmış grup (SKD), MetS'li grup (MS) ve MetS+VitD uygulanmış grup (MSD)) sıçanlar 15. hafta sonunda sakrifiye edildi. Testis dokularından total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. *PERK*, *IRE1*, *ATF6*, *ATF4*, *CHOP*, *GRP78*, *ERP57*, *CYP19A1* ve *VDR* genlerinin ekspresyon analizi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile yapıldı. Bilgimiz dahilinde, MetS olgularında testis dokularında gelişen ERS'nin infertilite ve VitD ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, VitD'nin *IRE1* yolağı üzerinden ERS'yi baskıladığı ve *PERK* ve *CYP19A1* seviyesindeki değişimlerle testiküler disfonksiyonu düzelttiği yönündedir.

Sonuçlar, MetS kaynaklı erkek infertilitesinde VitD takviyesinin bir tedavi ya da tedaviye ek olarak önemli bir katkı sağlayabileceğini öne sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metabolik sendrom, endoplazmik retikulum stresi, erkek infertilitesi, testis, D vitamini.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 39216).

ABSTRACT

Sarıkaya, M. (2024). Research on the Effect of Vitamin D on Endoplasmic Reticulum Stress in Testicular Tissue of Metabolic Syndrome Rats. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master's Thesis. İstanbul.

Metabolic syndrome (MetS), a global epidemic, is a multifactorial condition characterised by a combination of several factors such as insulin resistance, high cholesterol levels and hypertension. There are also studies investigating the adverse effects of MetS on the male reproductive system. One of the pathways of MetS is the induction of endoplasmic reticulum stress (ERS). ERS occurs when protein homeostasis is disrupted by the accumulation of misfolded or unfolded proteins. In response to ERS, unfolded protein response (UPR) pathways involving *PERK*, *IRE1* and *ATF6* genes are activated. As a result of UPR activation, depending on the severity of stress, either ERS is eliminated and homeostasis is maintained or apoptosis is induced. On the other hand, studies have shown that vitamin D (VitD) administration has a corrective effect on the negative effects of MetS.

The aim of this thesis study was to investigate the effect of VitD on ERS in testicular tissue of rats with MetS model. The rats divided into four groups (healthy control group (SK), healthy+VitD treated group (SKD), MetS group (MS) and MetS+VitD treated group (MSD)) were sacrificed at the end of 15th week. Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed from testicular tissues. Expression analyses of *PERK, IRE1, ATF6, ATF4, CHOP, GRP78, ERP57, CYP19A1* and *VDR* genes were performed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). To the best of our knowledge, there is no study investigating the relationship between ERS in testicular tissues of MetS patients and infertility and VitD. The findings of this thesis suggest that VitD suppresses ERS via the *IRE1* pathway and improves testicular dysfunction through changes in *PERK* and *CYP19A1* levels.

The results suggest that VitD supplementation may make an important contribution as a treatment or adjunct to treatment in MetS-induced male infertility.

Key Words: Metabolic syndrome, endoplasmic reticulum stress, male infertility, testis, vitamin D.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 39216

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Canlılığın temel yapı birimi olan hücrelerde farklı işlevler için özelleşmiş çeşitli organeller bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde yer alan endoplazmik retikulum (ER), çekirdek zarı ile temas halinde ve sitoplazma içerisine yayılmış membran katmanları yapısında olan bir organeldir. Yüzeyindeki ribozom varlığına göre granüllü ER (GER) ve düz yüzlü ER (DER) olarak adlandırılmaktadır [1,2]. Farklı organellerle etkileşim içerisinde olan ER'un, protein sentezi, katlanması ve hücre içi kalsiyum homeostazının düzenlenmesi dahil çeşitli işlevleri bulunmaktadır [3,4,5].

Endoplazmik retikulum lümeni katlanmakta olan, yanlış katlanmış ya da hücre içerisinde farklı lokalizasyonlara taşınmak üzere etiketlenmiş çeşitli proteinlerin meydana getirdiği fizyolojik olarak belirlenen bir yüke sahiptir. Lümende yanlış katlanmış/katlanmamış protein birikimi sonucunda ER lümeninin fizyolojik yük miktarı aşıldığında katlanmamış protein yanıtı (UPR) gelişmektedir. UPR sonrasında ER homeastazı sağlanamazsa endoplazmik retikulum stresi (ERS) oluşmaktadır [4,6]. ERS durumunda homeostazın düzenlenmesi için ilgili mekanizmalar aktifleşmektedir. Bu süreç, ERS'in ortadan kaldırılması ile hücrenin yaşamına devam etmesi ya da gerekli adaptasyon sağlanmadığı durumda apoptotik hücre ölüm mekanizmasının tetiklenmesi şeklinde sonuçlanmaktadır [7,8]. UPR yolağı protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) sensörleri ile düzenlenmektedir. Normal koşullarda GRP78 (GRP78:BiP, bağlayan immünoglobulin proteini) ile kompleks halinde bulunan bu sensörler ERS varlığında GRP78'in ayrılması ile ER lümenine geçer ve yolakların aktifleşmesini sağlarlar [8].

Etkin hale gelen UPR yolakları ERS'nin seviyesine göre bazı fizyolojik ve patolojik süreçleri etkilemektedir. ERS, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar (KVH), nörodejeneratif hastalıklar ve infertilite gibi çeşitli durumlarla ilişkilendirilmiştir [9]. UPR sensörleri farklı biyolojik mekanizmalarda indükleyici ya da baskılayıcı etkileri sebebiyle ilgili hastalıkların tanısında ya da tedavisinde önemli hedef proteinler olmaktadır [4].

Metabolik sendrom (MetS), insülin direnci, dislipidemi, hipertansiyon ve diğer bazı klinik tabloların bir arada gözlendiği durum olarak tanımlanmaktadır. MetS

olgularında dünyada en yüksek ölüm sebebi olan KVH'ın gözlenmesi riski de yükselmektedir [10–12]. Türkiye'de 1990 yılında başlanan ve ülkenin genelinin dahil edildiği Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışması kapsamında 2015 yılı itibariyle ülkemizde 9.2 milyon kişide MetS gözlendiği ve koroner arter hastalarının %53'ünün MetS grubunda yer aldığı saptanmıştır [13].

Diyabet [14], obezite [14], ateroskleroz [7], hipertansiyon [7] gibi çeşitli MetS bileşenlerinin patofizyolojik mekanizmaları ERS ile ilişkilendirilmiştir. Çeşitli hastalıklarda farklı UPR sensör yolaklarının aktif olduğu ve bu yolaklar üzerinde yapılan düzenlemelerle ilgili hastalığın gelişimindeki etkisi gösterilmiştir.

İnfertilite, 12 aydan uzun sürede gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır ve dünya genelinde 48 milyon çiftte gözlenmektedir [15]. Bu çiftlerin yaklaşık %30'unun erkek infertilitesi kaynaklı olduğu saptanmıştır [16,17]. Erkek infertilitesi tanısında klinik muayane ve hormon seviyelerinin yanısıra semen parametrelerinin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Semen analizinde semen hacmi, sperm hareketliliği, morfolojisi ve sayısı gibi parametreler incelenmektedir [18]. Tüm değerlendirmelere rağmen, erkek infertilitesinin büyük bir bölümünün nedeni açıklanmadan kalmaktadır. Diğer yandan, olguların yaklaşık %15'inde genetik etiyolojinin yer aldığı saptanmıştır [16,19,20].

Erkek üremenin yapısal bir bileşeni olan testisler steroid androjen hormonların ve sperm üretiminin yer aldığı gonadlardır. Çok sayıda seminifer tübüllerin oluşturduğu lobüler yapıdaki testislerde eşey hücrelerinin yanısıra spermatogenez sürecinde önem taşıyan Leydig ve Sertoli hücreleri de yer almaktadır [21,22,23]. Seminifer tübüllerde yer alan spermatogenez, spermatogonial kök hücrelerden olgun spermlerin (spermatozoa) oluşum sürecidir. Günde yaklaşık 275 milyona kadar sperm üretilebilirken bu süreç 74 günü bulmaktadır [17,22]. Spermatogenez, birbirini takip eden üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşama spermatogonia oluşmasıdır. Bu hücreler çoğalıp kendini yenileme sürecinden sonra spermatositlere farklılaşırlar. İkinci aşamada primer ve sekonder spermatositler mayoz geçirdikten sonra haploid spermatidleri meydana getirirler. Son aşamada ise spermatidlerin olgun sperm hücrelerine dönüşümünün yer aldığı spermiogenez sürecidir. Bu üç aşama çoğalma evresi, mayotik evre ve olgunlaşma evresine karşılık gelmektedir [22].

Çeşitli toksik ajanlara maruziyet, aşırı ısı, diyet veya diyabet gibi çeşitli durumların sonucunda testislerde spermatogenezi etkileyecek olumsuz değişimler olabilmektedir. Bu değişimlerin tetiklediği mekanizmaların bir bölümü ERS ile ilişkilendirilmiştir [24–27]. ERS varlığında aktifleşen UPR yolakları, spermatogenez süreci ya da testosteron gibi hormonların üretiminde değişikliğe neden olarak sperm sayısı, hareketi veya morfolojisinde olumsuz etkiye neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra UPR mekanizmasındaki önemli bir şaperon olan GRP78 ve UPR sensörlerinden biri olan ATF6'nın pozitif etkileri gösterilmiştir [28,29].

Vitamin D (VitD), güneş ışığı ile doğrudan ya da besinler aracılığıyla vücuda alınan ve bir çok önemli işlevi bulunan bir vitamindir [30,31,32]. Pasif halde vücuda alınan VitD ilk olarak karaciğerde sonrasında böbrekte geçirdiği enzimatik süreçler sonucunda etkin hale gelmektedir [31]. Etkin hali 1,25(OH)2D olan VitD, VitD reseptörüne (VDR) bağlanarak çeşitli yolakların düzenlenmesinde rol almaktadır [32,33].

VitD'nin etkisi araştırıldığında, MetS'da gözlenen insülin direnci, hipertansiyon ve trigliserid seviyeleri üzerine ve römatoid artrit gibi çeşitli hastalıklarda düzeltici etkileri gösterilmiştir [30,34,35]. Yakın zamanda, VitD'nin infertilite ile ilişkisi araştırılmaya başlanmıştır. Testiste VDR ve VitD metabolize edici enzimlerin varlığı ve değişken ekspresyon seviyelerinin gözlenmesi VitD'nin erkek fertilitesindeki rolünü işaret etmektedir. Sperm hareketi, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir [33,35].

Bu tez çalışmasının amacı testis dokusunda MetS ile tetiklenen ERS üzerine VitD'nin etkisinin incelenmesidir. İleri vadede sonuçların erkek infertilitesi ile ilişkisinin daha kapsamlı olarak araştırılması hedeflenmektedir. Bilgimiz dahilinde literatürde bu yönde bir çalışma bulunmamaktadır. Elde edilen sonuçların MetS olguları ve erkek infertilitesinde hasta yönetimi açısından bilgi verici olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

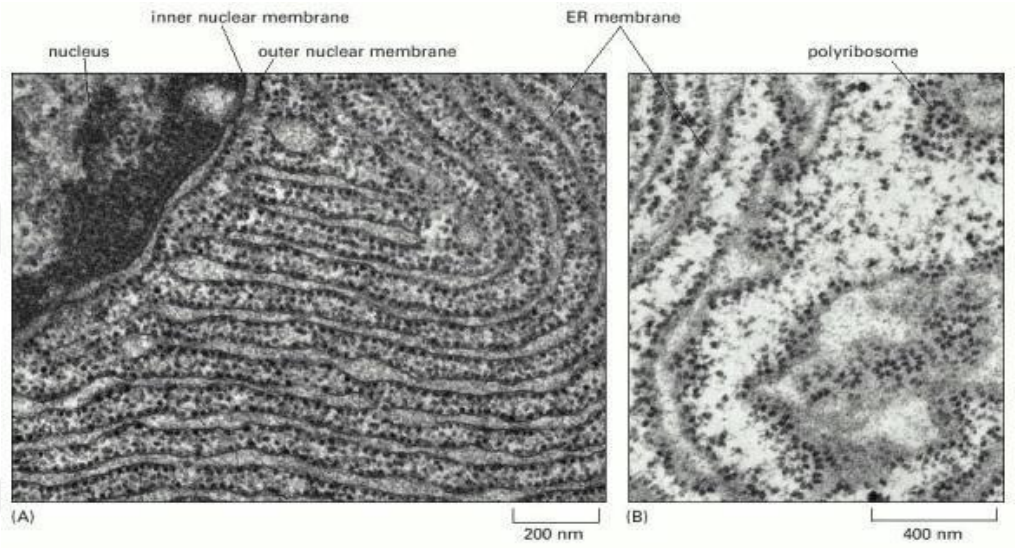
2.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM

Ökaryotik hücrelerde farklı hücresel işlevler için özelleşmiş olan membranla çevrili kompartmanlar hücre organeli olarak isimlendirilmektedir. Bu kompartmanlar, hücre sitozolünden ayrılmış, yapısı ve içeriği açısından işlevine göre özelleşmiştir. Hayvan hücrelerinde toplam mebran yüzeyinin yaklaşık %50'sini teşkil eden endoplazmik retikulum (ER), temel olarak protein katlanması ve post-translasyonel modifikasyonlar, Ca^{+2} homeostazı ve lipid sentezinden sorumlu olan bir organeldir.

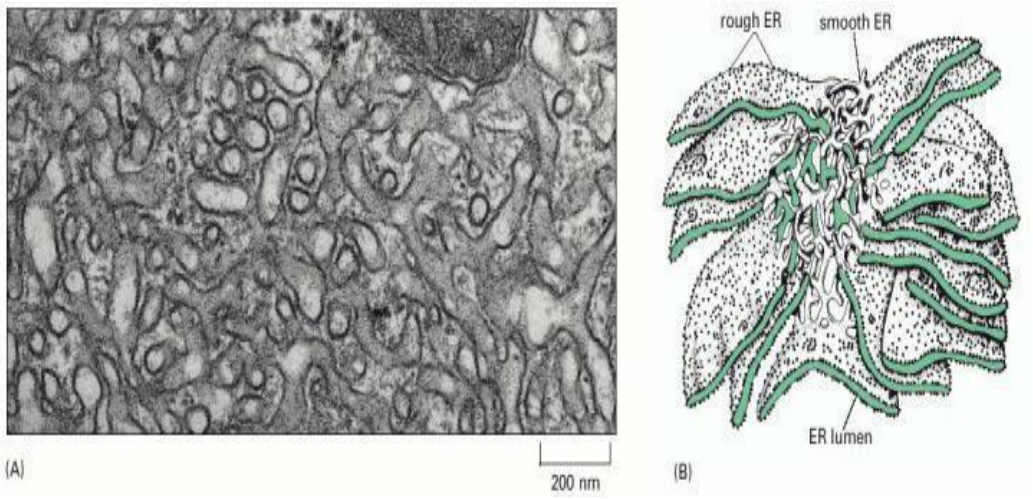
2.1.1. ER Yapısı

ER, granüllü ER (GER) ve düz yüzlü ER (DER) olarak yapısal ve fonksiyonel olarak ikiye ayrılmaktadır. GER'un membranlarında sitozole bakan yüzeylerinde ribozomlar olması nedeni ile granüllü olarak isimlendirilmiştir (Şekil 1). GER ve DER iki ayrı organel kompartmanı olarak görünse de aslında aynı organelin alt-kompartmanlarıdır (Şekil 2). Alternatif olarak, membran yapısına dayanarak yapılan sınıflandırmada olarak üç bölüme ayrılmıştır. Birinci bölüm içerisinde incelenen nükleer çevre, çekirdek zarı ve periferik ER ile ortak lümene sahiptir. Buradaki çift zar yapısı moleküllerin çekirdeğe giriş çıkışında kontrolü sağlamaktadır. Diğer bölümler ise tabaka benzeri sisternalar ve poligonal tübüller olarak ikiye sınıflanan periferik ER'dur. ER'nin tübülleri ve sisternaları arasında kalan kısım lümen veya sisternal boşluk olarak adlandırılmaktadır. Protein üretiminde özelleşen hücrelerde GER daha geniş bir alanı kaplarken lipid ve steroid hormon üretimi yapan hücrelerde DER daha yoğun olarak yer almaktadır [1, 2]. ER'de gerçekleşen protein sentezi, taşınımı gibi yolaklar sonucu ER lümen ortamı, hücre zarından geçen proteinlerin varlığıyla karşılaştırıldığında hücre dışı matriks ile birbirine benzemektedir [36, 37].

GER, nükleusa bitişik konumlanmıştır ve dış nükleer zarın bir devamı şeklindedir. Nükleusa yakın konumu, protein sentezi ve katlanmasında bir sorun olduğunda nükleusa sinyal iletiminin hızlı gerçekleşmesi açısından önemlidir. GER, Golgi kompleksi ile hem işlevsel hem de konum olarak yakın ilişki içerisindedir. ER, mitokondri, endozom, lizozom, ve hücre zarı gibi diğer organellerle de etkileşim içerisindedir [3].



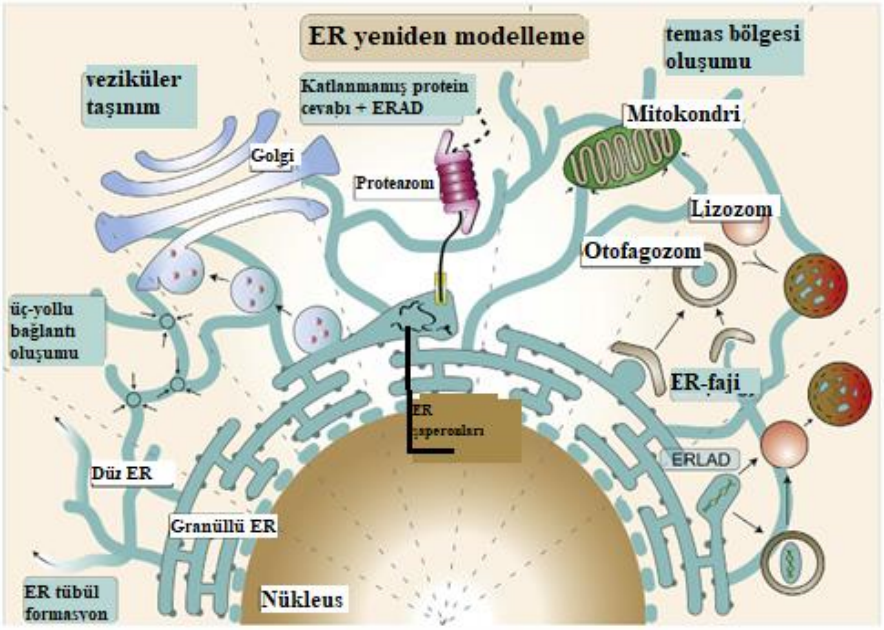
Şekil 1: (A) Yoğun salgı gerçekleştiren pankreatik hücrelerde GER membranı ve bağlı ribozomların yer aldığı elektron mikroskobi görüntüsü. Sol üst bölümde nükleus ve nükleer memranlar izlenebilmektedir. (B) ER membranına bağlı poliribozomların elektron mikrografisi (Kaynak 38'den alınmıştır).



Şekil 2: (A) İnsan testisinde testosteron hormon salgılayan Leyding hücrelerindeki DER yapılarının elektron mikroskobi görüntüsü. (B) Karaciğer hücrelerinde DER ve GER'in üç boyutlu yeniden yapılandırılması (Kaynak 38'den alınmıştır).

DER, GER'den daha tübüler bir yapıya sahiptir ve ER'un birbirleri ile etkileşimde olan sitoplazma içerisine hemen hemen eşit oranda yayılmış bir sistemini oluşturmaktadırlar. ER'nin yapısında tübüllerin veya katmanların yoğunluğu hücrenin tipine ve fonksiyonuna göre farklılık göstermektedirler. ER'nin aktif yapısında tübüllerin büyük bir önemi vardır. Tübüller büyüyebilir veya yeniden düzenlenebilmektedir. Ayrı tübüller birbirlerine üç-yollu kesişme noktalarından bağlanır ve hücre periferine yayılmış bir halde konumlanırlar. Üç-yollu kesişme noktalarının oluşumu için bazı retikulonlar, atlastinler ve proteinler önemli ve gereklidirler [1,2].

Hücrenin işlevine bağlı olarak farklı uyaranların olduğu durumlarda veya farklı hücre hatlarında ER morfolojisinde dinamik değişimler gerçekleşmektedir. Bu durum ER yeniden modellenmesi olarak isimlendirilmektedir. ER'nin yeniden modellenmesi çeşitli integral membran proteinleri ve diğer organellerle ve hücre iskeleti ile etkileşimiyle düzenlenmektedir [1,2]. ER'nin yapısı ve yeniden modellenmesi Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3: ER'nin yapısı ve yeniden modellenmesi, *[1] numaralı kaynaktan Türkçeye çevrilmiştir.*

2.1.2. ER işlevleri

Kompleks bir organel olan ER, kalsiyum (Ca^{+2}) depolanması, hücre içi Ca^{+2} homeostazı, kolesterol dahil lipidlerin sentezi, proteinlerin sentezi, katlanması, post-translasyonel modifikasyonları, kalite kontrolü ve yıkımını içeren ve hücrenin yaşamını sürdürebilmesi için oldukça önemli çok sayıda görevi olan bir organeldir [4,5]. GER'da genellikle protein sentezi ve katlanması gerçekleşirken DER'da lipid biyogenezi, kalsiyum homeostazı gibi işlevler gerçekleşmektedir.

2.1.2.1. DER'de gerçekleşen işlevler

Lipid Biyogenezi: ER membran üretimi, yağ birikimi lipid dropletleri ve vesikül oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Lipid biyogenezi ER-Golgi ara bölgesi ("ER-Golgi intermediate compartment", ERGIC) olarak bilinen ve tübüllerin ve veziküllerin bulunduğu endomembran kısımda meydana gelmektedir. ER'nin Golgi aygıtına bağlı olan bölgesine transfer edilen proteinler ve fosfolipidler biyokimyasal olarak modifiye

edilir ve ERGIC'da mobilize edilir. Sonrasında salgı vezikülleriyle veya organel etkileşimleriyle hücre içerisinde ilgili bölgeye taşınır. Aynı zamanda, hücresel lipid konsantrasyonundaki değişiklik durumuna uygun olarak ER membran yapısında da aktif bir değişim olmaktadır. ER membranında lipid sentezinde yer alan enzimler öncü molekülleri (prekürsörler) üretmektedir. Öncü moleküller takiben yapısal lipidlere, sterollere, steroid hormonlarına, safra asitlerine, dolikollere, prenil donörlerine ve hücre metabolizması için temel işlevlere sahip sayısız izoprenoid türüne dönüştürülmektedir [2,4]. ER membranı, mitokondri ve peroksizom membran lipidlerinin çoğunun sentezlenmesinde rol alarak bu organellere önemli katkıda bulunur.

Detoksifikasyon: DER, bir grup organik kimyasalın, vücuttan atılımı zor ve birikimi sonucu toksik etkiye sebep olan fenobartibal gibi ilaç etkenlerinin daha güvenli olan suda çözülebilir ürünlere çevirilmesinde rol oynayarak detoksifikasyon sürecine önemli katkı sağlar. Özellikle karaciğer spesifik hücresi hepatositlerde bol miktarda DER bulunur ve bazı etkenlerin vücutta miktarı arttığında hem detoksifikasyon enzimleri hem de DER'in büyüklüğü geri dönüşümlü olarak artar [38].

Kalsiyum homeostazı: Kalsiyum, ikincil mesajcı olarak geniş etki alanı olan bir sinyal molekülüdür. Gen ekspresyonu, proteinlerin işlevi ve hücre içi lokalizasyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolizma ve apoptoz süreçlerinde rol almaktadır. İşlerin bir bölümü Ca^{+2} bağımlı olan ER aynı zamanda Ca^{+2} depolanması için temel organelidir. ER zarında ER ve hücre içi Ca^{+2} homeostazını düzenleyen çeşitli mekanizmalar vardır. ER zarında sitozolden lümene Ca^{+2} taşınmasında yer alan adenozin trifosfata (ATP) bağımlı Ca^{+2} pompaları, ER lümeninde serbest kalsiyumu ayıran Ca^{+2} bağlayıcı şaperonlar ve kalsiyumun sitozole düzenli salınımı için ER membran kanalları bunlardan bazılarıdır. Ca^{+2} salınımında fosfolipaz C'nin (PLC) uyarılmasıyla inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) reseptörüne (IP3R) bağlanır. Ca^{+2} salınımı ile hücre içi Ca^{+2} seviyelerinde artış gerçekleşir. Kalsiyumun ER'den sitoplazmaya sızması durumunda ise sarkoendoplazmik retiküler Ca^{+2} ATPaz'lar (SERCA'lar) aracılığıyla ER'ye geri pompalanır [2,4].

2.1.2.2. GER'de gerçekleşen işlevler

Protein sentezi ve işlenmesi: Endoplazmik retikulumun temel, en önemli işlevlerinden bir diğeri ise protein sentezidir ve tüm proteinlerin yaklaşık %30'u ER'ye hedeflenerek yönlendirilmektedir. Hücre dışarısına salgılanan ve transmembran proteinlerin ve ek olarak bazı sitozolik proteinlerin sentezi, katlanması, modifikasyonu, kalite kontrolü ve yıkımı gerçekleşmektedir.

Ribozomlarda gerçekleşen protein sentezinde mesajcı RNA'nın (mRNA) üçlü kodları polipeptid zinciri haline çevrilmektedir. Hücre içerisinde kullanılacak olan proteinlerin sentezi serbest ribozomlarda gerçekleştikten sonra gidecekleri yere yönlendirilmektedir. Hücre dışına salgılanan proteinler ve transmembran proteinlerin sentezi ise GER membranına bağlı ribozomlarda gerçekleşmektedir. ER'da sentezlenecek olan polipeptidlerin başında ER sinyal dizisi bulunmaktadır. Bu dizi ribozomları ER'a yönlendirir ve sinyal dizisi sinyal tanıma partikülü (SRP) tarafından tanınarak "SRP:yeni sentezlenen aminoasit zinciri:ribozom:mRNA" kompleksi oluşur. Bu kompleks SRP reseptörüne bağlandıktan sonra sentezlenen polipeptidler ER membranında bulunan transmembran protein (translokon) aracılığı ile ER lümenine doğru uzarlar. ER lümeninde, şaperonların ve diğer moleküllerin aracılığı ile proteinlerin katlanması ve translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleşir. Bu modifikasyonlar, ek grupların eklenmesi, N-glikozilasyon, lipid konjugatlarının veya prolinlerin izomerizasyonunu ve disülfit bağlarının eklenmesini içermektedir. Bu mekanizmanın düzgün gerçekleşmesi sonucunda proteinler doğru şekilde katlanarak işlevsel yapılarını kazanmaktadırlar. ER'de proteinlerin katlanma süreci sıkı bir denetim altındadır ve yanlış katlanmış proteinlerin düzeltilmesi veya düzeltilmesi mümkün değilse hücre tarafından yıkılmasını sağlamak amacıyla oldukça sıkı düzenlenmiş kalite kontrol sistemleri bulunmaktadır [2,4].

2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Bazı fizyolojik ve patolojik faktörler, ER'un fizyolojik olarak belirlenen yükünün aşılmasını veya homeostazının bozulmasına neden olmaktadır. Farklı kanser

türleri, yaşlanmayla ilişkili hastalıklar (tip 2 diyabet, KVH gibi), nörodejeneratif hastalıklar, obezite, besin ve oksijen eksikliğinden mikroçevrede oluşan stres, eksojen moleküllere (“tunicamycin”, “thapsigargin”, ve “cyclopiazonic acid” gibi ER stresörlerine ve “tauroursodeoxycholic acid” gibi ER homeostazı arttırıcılarına) maruz kalma, vücut sıcaklığı değişikliği ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisi gibi durumlar sonucunda kalsiyum dengesi zarar görmekte veya ER lümeninde yanlış katlanmış/katlanmamış protein birikimi meydana gelmektedir. ER homeostazısının bozulması durumu endoplazmik retikulum stresi olarak tanımlanmaktadır [4,6].

Protein sentez sürecinde birincil yapıdaki proteinlerin fonksiyonel formunu aldığı son aşama sentezlenen primer proteinin ER lümenine geçişi ile başlamaktadır. Bu aşamada ER kalite kontrol (“ERQC”) mekanizması aktif olmaktadır. ERQC yolaklarında çeşitli şaperonlar, katlama enzimleri ve yıkım faktörleri rol almaktadır. ER lümenine geçiş yapan proteinler katlanarak işlevsel yapıya ulaşır ve kontrollü bir şekilde Golgi’ye taşınımı sağlanır. Yanlış katlanan veya katlanmayan proteinler ise ER-ilişkili yıkım (ERAD) sistemi ile veya lizozomal yıkım ile degrede olmaktadır [39].

Yanlış katlanan/katlanmayan proteinlerin birikimi sonucu ERS meydana gelmektedir. ERS’nin üç aşaması bulunmaktadır: alarm, adaptasyon ve hücre ölümü. Alarm evresinde, hücre içi protein dengesinin (proteostaz) bozulması sonucunda koruyucu mekanizmalar aktifleşmektedir. Katlanmamış proteinlerin birikmesi sebebiyle yeni protein sentezleri engellenir, şaperon genlerinin transkripsiyonu arttırılır ve yanlış katlanmış proteinlerin proteazomal yıkım ile taşınması ve uzaklaştırılmasını sağlayan ERAD sistemi indüklenir. ERAD sisteminde aktifleşen yolaklar katlanmamış protein yanıtı olarak adlandırılmaktadır. Bu süreçteki UPR’deki sensör proteinler, katlanmamış protein/şaperon sisteminin dengelenmesinde rol oynamaktadır. Alarm evresinde PERK, IRE1 ve ATF6 protein yolaklarından oluşan UPR, ERAD sistemindeki genlerin regülasyonunu düzenlemektedir.

ERS’nin ikinci aşamasında ise adaptasyon süreci gerçekleşmektedir. ER homeostazını düzenlemek için UPR’deki üç yolak da aktifleşir. PERK-ATF4, IRE1-işlenmiş X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1s) yolakları üzerinden transkripsiyon faktörleri aktive edilir ve çeşitli şaperon genlerinin ekspresyonlarında artış olacak şekilde düzenleme olur. Genlerin aktifleşmesi ile ER’nin protein katlama kapasitesi arttırılmaktadır.

Adaptasyonun sağlanamadığı durumlarda ise son aşama yıkım sürecidir. UPR, ER homeostazını dengelemek için aktifleştiği halde uzun süreli ve şiddetli ERS durumunda, UPR bağımlı ya da bağımsız şekilde hücre ölümü gerçekleşmektedir. ATF6 ve PERK yolakları sonucu aktifleşen CHOP (CAAT/enhancer-bağlayıcı protein) aracılı apoptoz ya da IRE1 aktivasyonu sonucu kaspaz enzimleri ve Jun N-terminal kinaz (JNK) yolağı ile apoptoz meydana gelmektedir [7,8].

2.2.1. Katlanmamış Protein Yanıtı

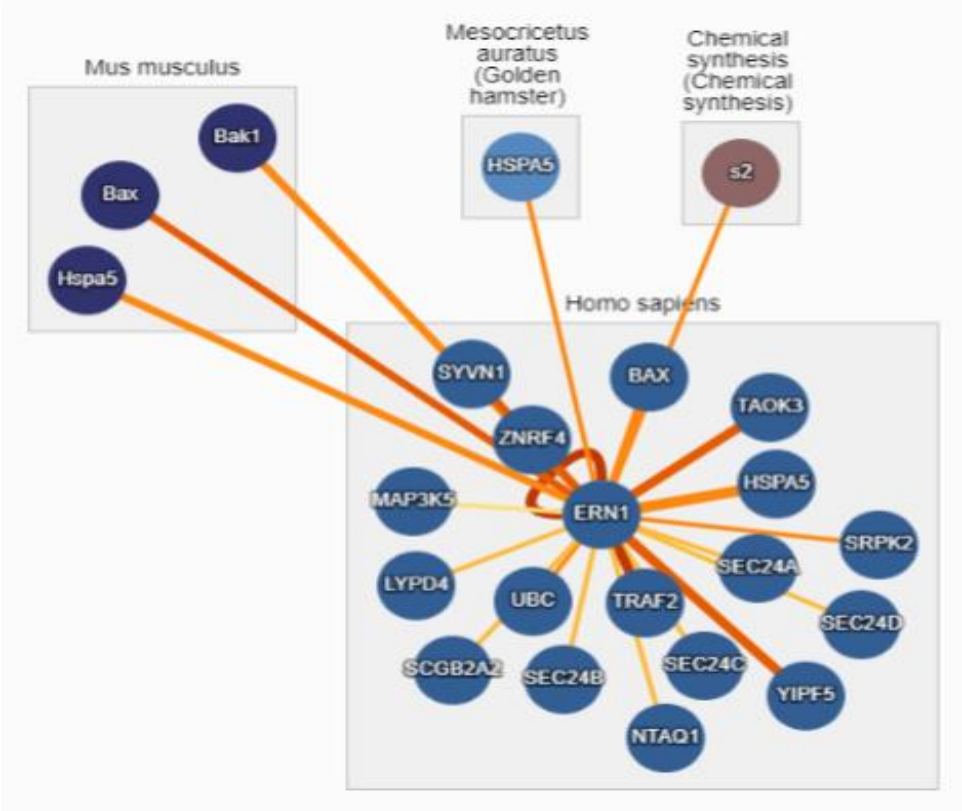
Katlanmamış protein yanıtı temel olarak üç farklı sinyal yolağı tarafından düzenlenmektedir. Bu üç sinyal yolağının başlangıç molekülleri PERK, IRE1 ve ATF6 proteinleridir. Bu proteinler, normal koşullarda, şaperon olarak görev yapan GRP78 ile inaktif formda bulunmaktadır. ERS durumunda GRP78, proteinlerin katlanmasına yardımcı olmak için ER lümenine gönderildiğinde PERK, IRE1 ve ATF6 aktif forma geçer ve UPR yolakları etkinleşir [8].

Bu üç yolağın protein sensörleri aynı zamanda mikroRNA (miRNA), uzun kodlamayan RNA (lncRNA) gibi kodlamayan RNA'lar tarafından da düzenlenmektedir. IRE1 için belirli sayıda miRNA'nın, ATF6 ve PERK için birer miRNA'nın rolü gösterilmiştir. Bu etkileşim mekanizması çift yönlü olarak gelişmektedir ve hücre stresine göre seviyeleri değişmektedir [4].

2.2.1.1. IRE1 Yolağı

IRE1 hem kinaz hem de endoribonükleaz aktivitesi gösteren bölgesi bulunan bir ER transmembran proteinidir. Çeşitli proteinlerle etkileşimi vardır. Proteinlerin birbiriyle olan etkileşimleri, 11 farklı moleküler interaksiyon veri tabanlarını bir arada sunan IntAct platformunda, ilgili proteinin bağlantılı olduğu proteinler türlere göre gruplandırılarak da gösterilmiştir [40] (Şekil 4). IRE1'in *ERN1* (ER'dan nükluesa sinyalleme yapan 1) ve *ERN2* genleri tarafından kodlanan α ve β

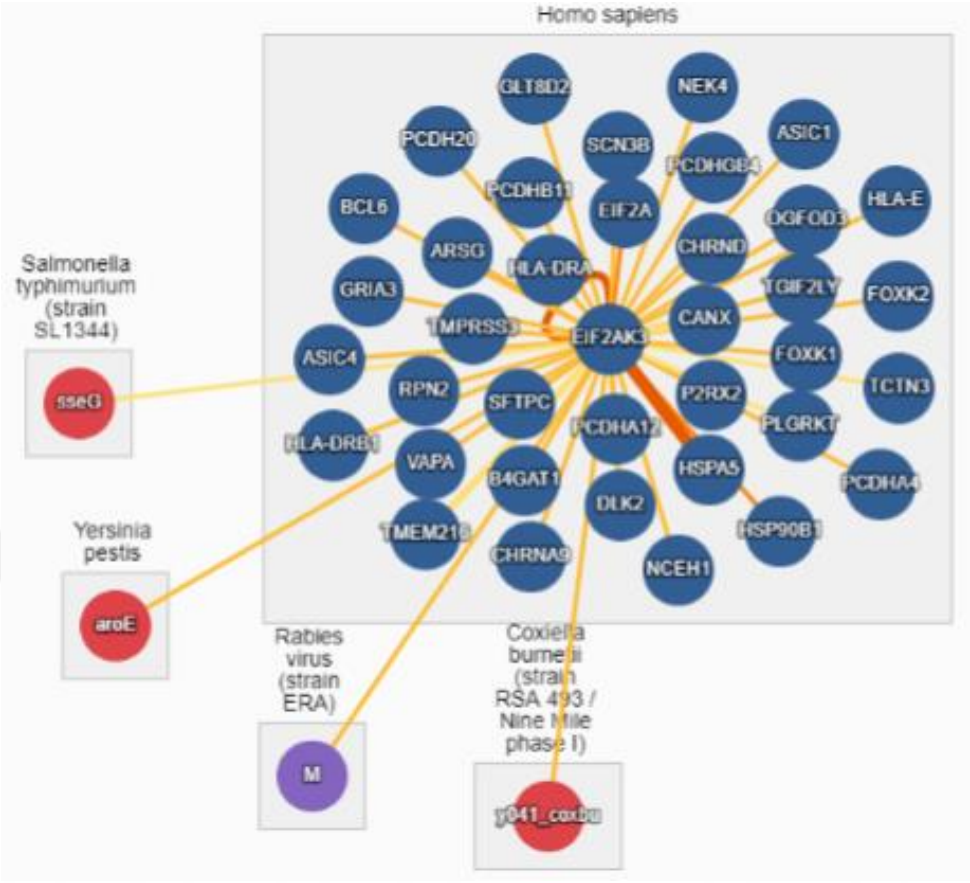
olmak üzere iki paralogu bulunur. GRP78'in IRE1'den ayrılmasıyla IRE1 oligomer forma geçer ve transotofosforillenerek aktive olur. Bu fosforilasyon aynı zamanda tümör nekroz faktör reseptörü (TRAF2) ve JNK yolak sinyalinin başlatılması için gereklidir. Kinaz bölgesi aktive olan IRE1, temel lösin fermuar (bZIP) transkripsiyon faktörü olan X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) mRNA'sını 26 nükleotid farkla kırpılmasını sağlar ve işlenmiş XBP1 mRNA'sının translasyonu gerçekleşir. Sonrasında transkripsiyon faktörü olarak XBP1s, ER şaperonlarının, ERAD yolağındaki katlanmaya yardımcı olan enzim komponentlerinin ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımında rol alan genlerin transkripsiyonunu indükler. XBP1s aynı zamanda lipid biyosentezi, glukoz metabolizması, insülin sinyali, redox metabolizması, DNA tamiri gibi çeşitli metabolik yolakların düzenlenmesine katılır ve hücrenin yaşamı, farklılaşması ve gelişiminde rol oynar. Ayrıca ökaryotlarda korunmuş bir mekanizma olan düzenlenmiş IRE1 bağımlı yıkım (RIDD) ile IRE1, RNaz aktivitesiyle korunmuş sekans (CUGCAG) içeren diğer transkriptleri keser ve hücresel ekzoribonükleazlarla yıkıma uğramalarını sağlar. RIDD ve XBP1s ER homeostazını dengeler [4,7,8,41].



Şekil 4: ERN1 moleküler etkileşimleri (IntAct, https://www.ebi.ac.uk/intact/home)

2.2.1.2. PERK Yolağı

RNA bağımlı protein kinaz (PKR), genel kontrol baskılanamayan 2 kinaz (GCN2) ve heme düzenlenmiş eIF2a kinaz (HRI) benzeri olan PERK, ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 2a (eIF2a) kinaz alt ailesinin bir üyesi olan serin/treoinin kinazdır. IntAct tarama sonucunda elde edilen yolak haritası Şekil 5'te gösterilmiştir. Grp78'in ayrılmasıyla PERK transotofosforillasyonla homodimerize olur ve aktif hale geçer. Sonrasında aktif PERK üç alt üniteden oluşan (α, β, ve γ) ökaryotik başlama faktörü 2'nin (eIF2) eIF2α birimini fosforiller. eIF2α'nın fosforillenmesiyle ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 2B'nin (eIF2B) aktivitesi inhibe edilir. Bunun sonucunda bazı ilgili proteinlerin translasyonu hariç genel translasyon azaltılacak şekilde düzenlenir ("down" regüle) ve ilgili bazı proteinlerin ise miktarı atar. Miktarı artan proteinlerden biri aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4) proteinidir. ATF4, CHOP; GADD153 promotoruna bağlanır ve ekspresyonunu artırır. ATF4 ve CHOP, UPR için gerekli genlerin ekspresyonunu indüklese de bu genlerin artmış ekspresyonu ATP eksiği, oksidatif stres ve hücre ölümüyle sonuçlanabilir. Ek olarak, ATF4, *GRP78* ve glukozla düzenlenen protein 94 (*GRP94*) gibi genlerin de ekspresyonunu da arttırır. eIF2α'nın fosforillenmesiyle büyüme durması ve DNA hasarı indüklenebilir 34 *(GADD34)* ekspresyonunun pozitif yönde regülasyonu gerçekleşir. Kalsiyum bağlayıcı şaperon kalneksin, kalretikülin (*CRT*) ve protein disülfid izomeraz (*PDI*) ve sarco (endo) plazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz 2α *(SERCA2α)* gibi protein katlama enzimlerinin de ekspresyonu artar [4,7,8,41].

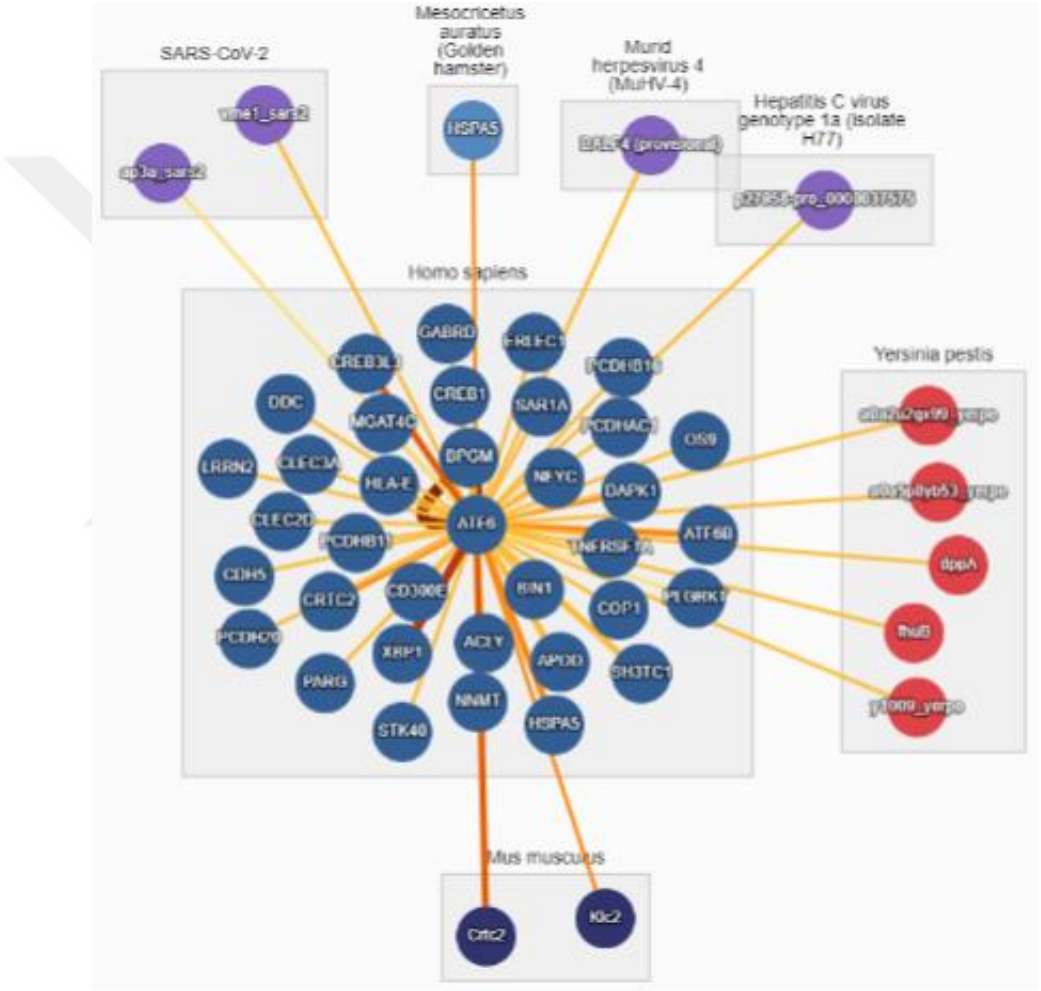


Şekil 5: EIF2AK3 moleküler etkileşimleri (IntAct, https://www.ebi.ac.uk/intact/home)

2.2.1.3. ATF6 Yolağı

Üçüncü yolak olan ATF6 (ATF6p90) lösin fermuar protein ailesinin bir üyesidir. İki izoformu vardır ve bunlardan ilki ATFα; *ATF6A* tarafından kodlanır, diğeri ise daha az transkripsiyonel aktivitesi olan ATFβ; *ATF6B* tarafından kodlanır. IntAct platformunda yapılan tarama sonucunda elde edilen yolak haritası Şekil 6'da gösterilmiştir. ERS durumunda Grp78'in ATF6'dan ayrılmasından sonra ATF6 transkripsiyon sonrası modifikasyona uğrar. Golgi aygıtına gönderilen ATF6'nın site-1 proteaz (S1P) ve site-2 proteaz (S2P) tarafından kırpılması sonucunda ATF6p50 oluşur. ATF6p50 nükleusa gider ve diğer siklik AMP düzenleyici element bağlayıcı protein (CREB), cAMP düzenleyici element bağlayıcı protein 3 benzeri 3 (CREB3L3) gibi

diğer bZIP'lerle ve çeşitli transkripsiyon faktörleriyle etkileşim kurarak ilgili genlerin ekspresyonunu arttırır. Aynı zamanda *XBP1* ve *CHOP*'un ekspresyonunu indükleyebilir. ATF6p50 ve XBP1s benzer şekilde etki gösterir buna ek olarak ERS durumunda hücrenin salgılama kapasitesini arttırılması için ER ve Golgi aygıtının biyogenezini de desteklerler [4,7,8,41].



Şekil 6: ATF6 moleküler etkileşimleri (IntAct, https://www.ebi.ac.uk/intact/home)

2.2.2. ERS Aracılı Hücre Ölümü

Ortadan kaldırılamayan, şiddetli ERS durumunda hücre ölümü tetiklenmektedir ve homeostazı düzenlemek amaçlı indüklenen UPR yolakları bu sefer

hücre ölümünde rol alabilmektedirler. Apoptoz, nekroz, otofaji ve ferroptoz olmak üzere çeşitli hücre ölüm tipleri bulunmaktadır [4,42].

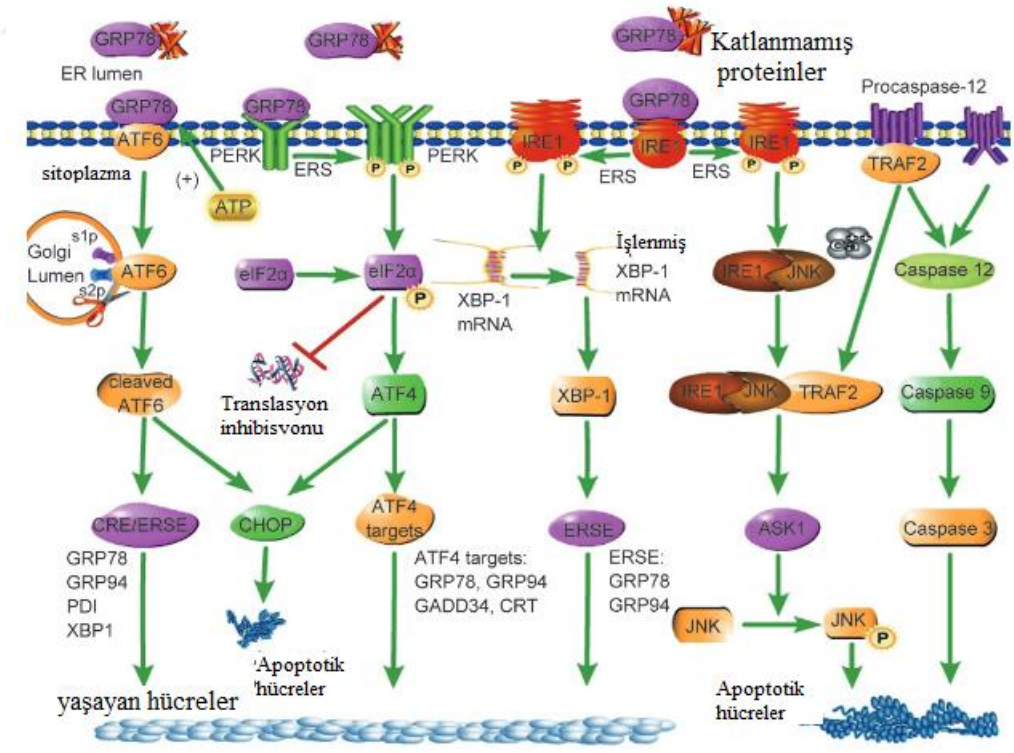
Programlanmış hücre ölümünde iki önemli yolak bulunmaktadır. İlk olarak dışsal apoptoz yolağı, proteaz ailesinden olan kaspazların hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri tarafından aktive edilmesiyle hücre dışında başlamaktadır. İçsel apoptoz yolağı proapoptotik proteinler tarafından mitokondriden salınan sitokrom c tarafından aktive edilmesiyle hücre içinde meydana gelmektedir. Şiddetli ERS her iki yolağın da aktive edilmesine sebep olabilmektedir. ERS kaynaklı apoptozda p53 apoptozun yukarı regüle edilmiş modülatörü (PUMA), phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1 (NOXA), BH3 etkileşimli-domain ölüm agonisti (BID) ve BCL2 apoptoz düzenleyicisi (Bcl-2) benzeri protein 11 (BIM) dahil olmak üzere proapoptotik proteinler ("BH3-only") ailesi merkezi moleküllerdir. Şiddetli ERS durumunda PERK reseptörünün ilerleyen sinyal yolağında bulunan ATF4 transkripsiyon faktörü olan CHOP ile doğrudan etkileşir. CHOP, BIM, PUMA proapoptotik proteinlerin transkripsiyonunu aktive etmekte ve tümör nekroz faktörü α (TNF) reseptör süper aile üyeleri *TRAIL-R1/DR4* ve *TRAIL-R2/DR5* proapoptotik genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Aynı zamanda MCL1 apoptoz düzenleyicisi (MCL-1) gibi antiapoptotik proteinlerin transkripsiyonunu baskılamaktadır. IRE1 ise doğrudan TRAF2 ile etkileşerek farklı apoptotik yolakları aktive etmektedir. Ayrıca IRE1, RIDD aktivitesiyle de apoptoza katkı sağlamaktadır. Bunlara ek olarak ERS sonucunda oluşan apoptozda, miRNA'ların da etkin olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Hatta hücre dışı matriks kaynaklı hiyalüronidaz etkisiyle gerçekleşen diğer yolakların aktivitesi de gösterilmiştir [4,41].

Hücrelerin lizozom aktivitesiyle kendi kendini yok etmesi otofaji olarak adlandırılmaktadır. Besin eksikliği durumunda meydana gelen otofaji, otofagozomlarla amino asitler, lipidler, karbonhidratlar gibi birikmiş makromoleküllerin yok edilmesini sağlamaktadır. Otofaji, hücresel proteostazın ve enerji seviyesinin düzenlenmesinde bununla birlikte hücresel strese karşı verilen tepkide büyük önemi vardır [43]. Bu süreçte otofagozom formunun oluşumunu sağlayan unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1 (ULK1) interaksiyonunun gerçekleşmesi için IRE1α aracılı TRAF2 ve apoptotik sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1) sinyal yolağı aktive göstermektedir. PERK ise ATF4 ile vezikül uzamasını indükleyerek otofajiyi etkilemektedir [4]. Bunlara ek olarak,

ER'nin yeniden modellenmesinde etkili olan ER-fajilerin reseptörlerinin otofagozomlarla etkileşerek otofajiye yardımcı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [43].

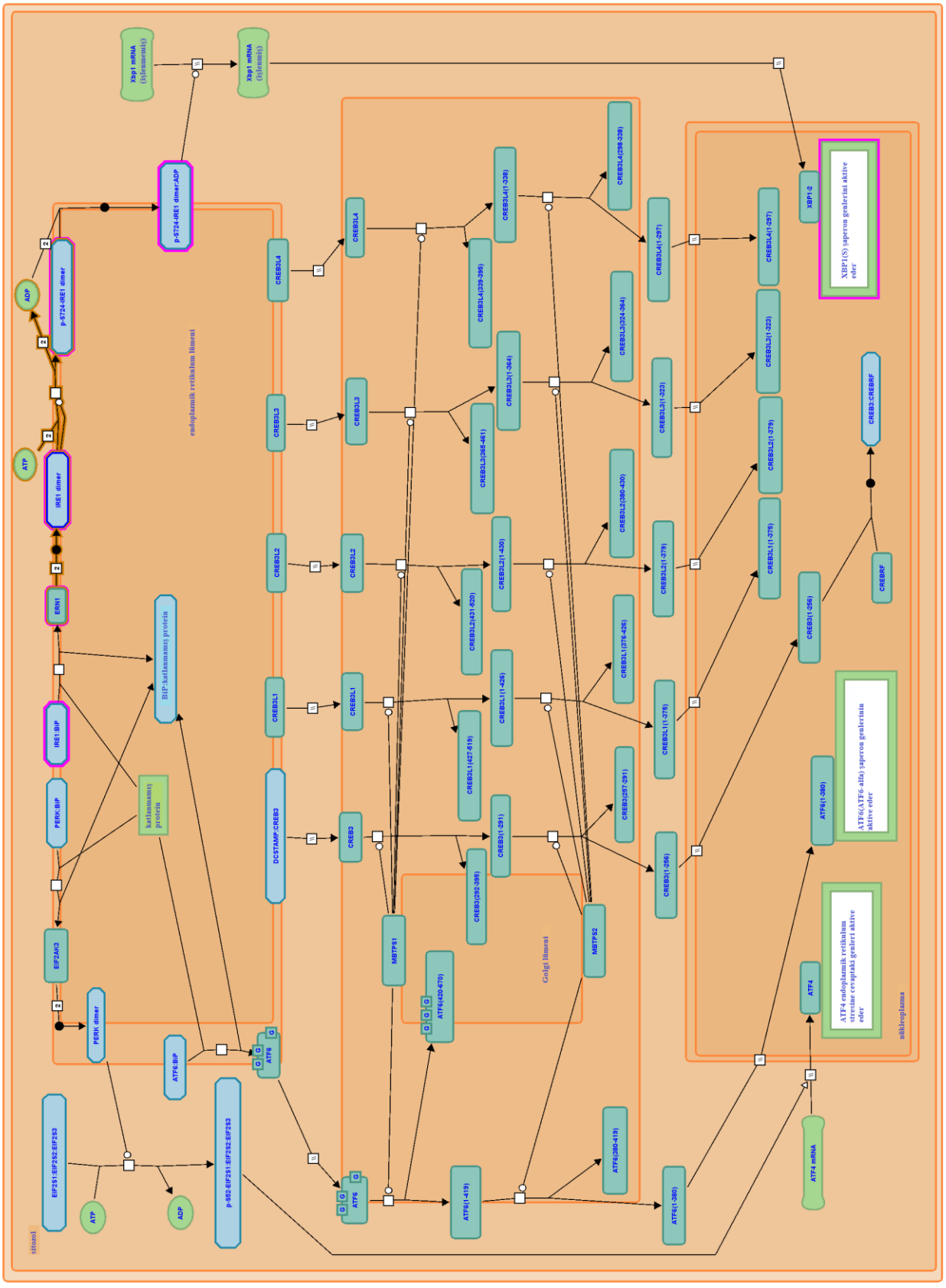
Programlı gerçekleşmeyen yani apoptotik olmayan patolojik bir süreci gösteren hücresel ölüm çeşidi ise nekroz olarak adlandırılmaktadır. Nekroz ve ERS'nin indüklendiği in vivo fare modelinde yapılan bir çalışmada nekroptotik mikrogliaların/makrofajların ER'sinde nekrozda aktive olan reseptör etkileşimli serin/treonin kinaz 3 (RIPK3) ve psödokinaz gibi karışık soy kinaz alanı (MLKL) bulunması ERS ile nekroz arasında ilişki olduğu düşüncesini oluşturmaktadır [4].

Diğer hücresel ölüm çeşidi ise hücresel ROS birikimi sonucu oluşan ve demir bağımlı ferroptozdur. Ferroptoz sürecinde oluşan ROS tarafından indüklenen ERS, ferroptoz indükleyicilerin UPR yolaklarından PERK sinyalizasyonuna sebep olması ve ferroptoz agonistlerinin ATF4-CHOP yolunu aktive edebilmesi ile ferroptoz ve ERS arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [42].



Şekil 7: Endoplazmik retikulum stresi sinyal yolakları *[7] numaralı kaynaktan Türkçeye çevrilmiştir.*

ERS sinyal yolakları Şekil 7'de gösterilmiştir. Ayrıca, katlanmamış protein yanıtının, Reactome veritabanında yapılan tarama sonucunda elde edilen şeması Şekil 8’de gösterilmiştir [44].



Şekil 8: Katlanmamış protein yanıtı, UPR (Reactome, https://reactome.org/)

2.2.3. ERS ile İlişkili Hastalıklar

Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi sonucu homeostaz dengesinin bozulmasıyla hücrede ERS oluşumu meydana gelmektedir. ERS düzenlenmesinde hücreler ve organeller arası etkileşimde önemlidir ve ERS'nin ortadan kaldırılması için oluşan UPR sinyalizasyonu fizyolojik ve patolojik süreçleri etkilemektedir. ERS adhezyon, proliferasyon, göç ve otofaji gibi çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlemektedir. Bu düzenleme mekanizması tek bir açıdan oluşmamaktadır. Örneğin, bir grup araştırmacıya göre ERS hücrelerin proliferasyonunu ve göçünün inhibe ederken diğer araştırmacılara göre hücre adhezyonunu, proliferasyonu, göçü ve otofajiyi arttırmaktadır [7]. UPR sinyal yolaklarının etkisinin embriyoloji ve gelişimi, büyüme ve farklılaşma, lipid, amino asit ve glukoz metabolizması üzerine farklı model organizmalarda incelendiği çalışmalar bulunmaktadır [4]. ERS hafif bir seviyedeyken uygun bir yanıtla homeostazı dengelemektedir ve aynı zamanda çeşitli mekanizmalarla etkileşimi sonucu patolojik süreçlere karşı olumlu etki sağlamaktadır. GRP78 ve IRE1 bağlantılı mekanizmaların erken zamanlı ateroskleroz ilerlemesine karşı koruyucu etkisi ve *GRP78*'in aşırı ekspresyonunun sterol düzenleyici element bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1'in (SREBP-1c) aktivasyonunu azaltarak yağlı karaciğer hastalığını inhibe etmesi bu olumlu etkilere örnek olarak verilebilir [9]. ERS şiddetli bir seviyeye geldiğinde ise hücrenin kaderi UPR bağımlı otofaji, sitoplazmaya Ca^{+2} salınımıyla bağlantılı otofaji ya da Bcl-2'nin inhibe edilmesi sonucunda ER'nin otofajisine, apoptoza doğru yol almaktadır [45]. Bu süreçte Ca^{+2} metabolizmasının bozulması ve CHOP aktivasyonu ile patolojik mekanizmalara katkı sağlamaktadır. Örneğin, PERK aracılı CHOP aktivasyonu ile aterosklerozun son evrelerinde makrofaj apoptozu gelişmektedir [9]. ERS kardiyovasküler, nörolojik, immünolojik, kanser, obezite, diyabet, yağlı akciğer hastalıkları, bağırsak inflamasyonu, erkek infertilitesi, depresyon gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [7,9,41,46,47]. Tablo 1'de ERS'nin çeşitli hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir.

Tablo 1: Endoplazmik retikulum stresinin çeşitli hastalıklarla ilişkisi

Genler	**Örnekler/Hastalıklar**	**Sonuçlar**
GRP78/GRP94	• Kültüre edilmiş kardiyomiyositler • Kalp yetmezliği olan hastalar • ob/ob fare modeli • Kanser hücre hatları ve insan tümör örnekleri • İnsan diyabetik böbrekleri	• GRP78 ve GRP94'un aşırı ekspresyonu apoptozu azaltarak canlılığı yükseltmiştir. • GRP78 ekspresyonunda artış ve sXBP-1 ile ilişkisi tespit edilmiştir. • GRP78'in aşırı ekspresyonu hepatik steatoza karşı koruyucu etkiler göstermiştir. • İndüklenen GRP78 seviyeleri, hücre canlılığını artırarak kemoresistanlık sağlamıştır. • Diyabetli hastalarda bazal diyabet bireylerine kıyasla yüksek GRP78 seviyeleri tespit edilmiştir.
IRE1/XBP-1	• Karaciğere özgü XBP-1 eksikliği olan fareler • İnsan karaciğer örnekleri • Fare testis örnekleri	• XBP-1 eksikliği hepatik lipogenez ve lipit birikiminde bir azalmaya neden olmuştur. • NASH hastalarında IRE1 ve sXBP-1 ifadelerinin artışı gözlenmiştir. • IRE1 / XBP-1 yolağı hipertermi durumunda ER stresinde aktif olduğu görülmüştür.
PERK/ATF4-eIF2α	• İnsan karotis plak örnekleri • Primer hepatositler • Tip 2 diyabet hastaları • Parkinson hastalarının dopaminerjik nöronları	• PERK ifadesi nekrotik çekirdeğe kıyasla plak periferinde daha fazla ifade edilmiştir. • PERK ile ilişkili sinyal yolları VLDL reseptör ekspresyonunu ve lipit birikimini indüklemiştir. • Bireysel olarak, PERK eksikliği ve elF2a fosforilasyon başarısızlığı pankreas β hücrelerinde apoptozun artmasına neden olmuştur. • Fosfo PERK ve eIF2a'nın Lewis-body oluşumuna dahil olduğu gösterilmiştir.

Tablo 1 devamı

CHOP	• Kültüre edilmiş kardiyomiyositler • Farelerde ateroskleroz gelişimi • İnsan koroner arter örnekleri • Fare testis örnekleri	• Anjiyotensin II, CHOP ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklemiştir. • CHOP yukarı regülasyonunun endotelyal hücre apoptozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. • Arttırılmış CHOP ve GRP78 ekspresyonu gözlenmiştir. • CHOP gibi ER stresine bağlı apoptoz mekanizmaları, tekrarlayan hipertermi döngüleri ile indüklenmiştir.

NASH: alkolik olmayan steatohepatit

Kaynak: *[9] kaynaktan Türkçeye çevrilmiştir.*

Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH) ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörolojik hastalıkların temelinde protein agregatları, yanlış katlanmış proteinlerin birikimi bulunmaktadır. AH'da β-amiloid plakları, PH'da α-sinüklein birikimi ve ALS'de ise *SOD1* geninde bulunan nokta mutasyonu sonucu oluşan protein agregasyonu toksik bir etki oluşturarak nöronların dejenerasyonuna sebep olmaktadır. Creutzfeldt-Jakob hastalığı dahil ensefalopatilerin patogenezinde de proteinlerin yanlış katlanmasını tetikleyen prionlar bulunmaktadır. UPR sinyal reseptörlerinin beynin normal fizyolojik süreçlerinde farklı görevleri vardır. Örneğin, PERK sinyalizasyonu kortekste nörogenezi regüle etmektedir, IRE1α ise filamin A ile etkileşerek hücre hareketini ve hücre iskeleti dinamiğini etkilemektedir. Şiddetli ERS durumunda UPR yolakları patolojik süreçleri de etkilemektedir. Yapılan araştırmalarda IRE1α–XBP1 yolağının genetik manipülasyonu ile AH, PH, ALS, Hungtinton hastalığı, omurilik dahil sinir sistemini etkileyen patolojik durumlarda UPR'nin çeşitli rollerini göstermiştir. Alzheimer üzerine yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda da β-amiloid aracılı CHOP indüksiyonunun olduğu gösterilmiştir. Nöroinflamatuar ve nörodejeneratif hastalıklar sırasında ise astrositlerde oluşan ERS'nin UPR aktivitesiyle interlökin 6 (IL-6), C-C motifli kemokin ligandları (CCL2, CCL20, CCL3), C-X-C motifli kemokin ligandları (CXCL1, CXCL10), lipokalin 2 (Lcn2), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve komplementer C3 (C3) dahil olmak üzere enflamatuar

moleküllerin üretimini etkilediğini böylelikle nörotoksisiteye ve/veya nöronal ve sinaptik desteğin azalmasına katkıda bulunabildiği kanıtlanmıştır [9,41,46,48].

ERS ile ilişkilendirilen başka bir hastalık grubu da kanserdir. Kanser, kontrolsüz ve sınırsız sayıda çoğalabilen, hücre ölümüne dirençli, büyüme baskılayıcılardan kaçabilen, anjiyogenezi indükleyen ve invazyon ve metastaz özelliği olan hücreler topluluğundan oluşan tümörlerdir. Tümörler büyürken kendi mikro çevrelerini oluştururlar. Tümör mikroçevresinde yüksek metabolik ihtiyacı, hipoksi, hücre içi ROS birikimi, besin eksikliği ve düşük pH gibi durumlar söz konusudur. Bu durumlar sağlıklı komşu hücrelerin de Ca^{+2} ve lipid homeostazını bozarak hem tümör hücrelerinde hem de komşu hücrelerde ERS'yi indüklemektedir. Aşırı şiddetli olmayan ERS durumunda meydana gelen tepkiler tümör hücrelerinin çoğalmasını, metastazı, anjiyogenezi, immün kaçışı ve kemorezistanı destekleyen mekanizmaları uyarmaktadır. Bu nedenle UPR yolaklarının tümör hücrelerinin yaşamı için gerekli olabileceğini göstermektedir. Aşırı şiddetli ERS'nin gelişmesiyle ise UPR yolakları aktifleşir ve otofajiye ve ya apoptoza sebep olabilirler. UPR yolakları glioblastoma, miyelom, meme, mide, özofagus ve karaciğer karsinomları gibi çeşitli kanser tipleriyle ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarla IRE1α−XBP1 yolağının hipoksi indüklenmiş faktör 1 α (HİFα) ile etkileşimiyle anjiyogenezi ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak meme kanserini, B lenfositlerin farklılaşmasındaki rolüyle miyelomu, MYC proto-onkogen, bHLH transkripsiyon faktörü (MYC) sinyalini aktifleştirerek prostat kanserini, hepatosit proliferasyonunu ve metabolik inflamasyonu arttırarak hepatoselüler karsinomu desteklediği kanıtlanmıştır. Aynı zamanda onkogenezi önlemek için IRE1α yolağı gereklidir. IRE1α'nın tümör baskılayıcı rolü olduğu üzerine lenfoma, kolorektal karsinom, melanom ve beyin kanseri ile ilişkili çalışmalar yapılmıştır. PERK sinyalizasyonu ise kolorektal karsinomda tümör boyutunu küçültürken eIF2α'nın metastatik prostat kanserinde sitotoksik etkileri tetikleyebildiği bulunmuştur. ER şaperonu olan *GRP78*'in ekspresyonunun değiştirilerek yapıldığı in vivo çalışmalarda da tümör hücrelerinin inhibe edildiği kanıtlanmıştır [41,46,49].

İmmünolojik ve alerjik hastalıklar ise bağışıklık sistemi ile ilişkilidir. Vücudun kendi hücrelerine karşı oluşturduğu immün yanıt otoimmün hastalıkların temelini oluşturmaktadır. Doğal bağışıklığın ve adaptif bağışıklığın birçok evresinde UPR sinyalizasyonu yer almakta ve immün hücrelerinin farklılaşmasında ve

proliferasyonunda aktif rol oynamaktadır. Çeşitli çalışmalar UPR yolaklarının immünolojik hastalıklar ile ilişkisini göstermiştir. Yapılan bu çalışmalarda, IRE1α ilişkili β hücrelerinin hasarıyla aktive olan intrinsik apoptotik yolaklar ve IRE1α aracılı CHOP aktivitesi ile olan Tip 1 diyabetin ilişkisi; IRE1α'nın interlökin (IL-β), IL-6, ve TNFα gibi çeşitli proinflamatuar sitokinleri ve inflamasyonu arttırmasının römatoid artritle olan ilişkisini; IRE1α/XBP1s/CHOP ve IRE1α/JNK/Bcl-2-ilişkili X proteini bağlantılı apoptozun yönlendirilmesinin sistemik lupus eritematozus ile ilişkisini; IRE1α/XBP1s/TNFα yolağının melanosit kök hücre farklılaşmasını inhibe etmesi ve IRE1α aracılı üretilen sitokinlerin melanosit kaybına sebep olmasının vitiligo ile ilişkisini; IRE1α'nın inflamatuar bağırsak hastalığı ve sistemik sklerozla olan ilişkileri gösterilmiştir. Alerjik inflamasyon sürecinde ise Toll-benzeri reseptör (TLR) sinyalinin ATF4-CHOP aracılı apoptotik yolağı baskılayarak makrofajların fonksiyonunu etkilediği bilinmektedir [41,50,51].

ERS'nin ve UPR sensörlerinin hastalıkların patofizyolojik sürecine arttırıcı ya da düzenleyici çeşitli etkileri bulunmaktadır. Bu fonksiyonları sebebiyle hastalıkların tanısında ya da tedavisinde biyomarker ya da terapötik hedef olarak kullanılması için aday olmaktadırlar. Tablo 2'de farklı ülkelerde yapılan çeşitli hastalıklarda ERS'yi hedef alan klinik çalışmalar gösterilmiştir [4].

Tablo 2: Endoplazmik retikulum stres temelli klinik çalışmalar. Çeşitli klinik çalışmalarda endokrinoloji, onkoloji ve pediatri alanlarındaki hastalıkların araştırılması hedeflenmiştir. Bu tabloda, hedeflenen deneme, araştırılan girişimsel ajan ve araştırmanın yürütüldüğü ülke sunulmuştur.

Klinik çalışma	**Hastalık**	**Girişim**	**Ülke**
Tip 2 diyabetin patofizyolojisinde ER stresinin rolü	• Diabetes mellitus, tip 2	Girişim yok	Fransa
Ph-negatif miyeloproliferatif neoplazmlarda ER stresi ve tedaviye direnç	• Polisitemi vera • Esansiyel trombositemi	Biyolojik: Tedaviye başlamadan önce total lökositlerin RNA örneği	Fransa

Tablo 2 devamı

ER stresinin metabolik fonksiyon üzerindeki etkisi	• İnsülin direnci • Diyabet • Obezite	İlaç: TUDCA Diğer: plasebo İlaç: sodyum fenilbütirat	Amerika Birleşik Devletler
Kronik solunum yolu hastalıklarında ER stresi	• Kronik hava yolu hastalıkları • Akciğer kanseri	Gözlemsel	Güney Kore
Proteaz inhibitörü ile ilişkili insülin direnci için TUDCA	• HIV ile ilişkili insülin direnci • Proteaz inhibitörüne bağlı insülin direnci	İlaç: TUDCA Diğer: plasebo tablet	Amerika Birleşik Devletler
NAFLD'de ER stresi	• Obezite • NAFLD	İlaç: metil-D9-kolin	Amerika Birleşik Devletler
Yeni başlangıçlı tip 1 diyabette TUDCA	• Tip 1 diyabet	İlaç: TUDCA İlaç: Şeker Hapı (plasebo)	Amerika Birleşik Devletler
Liraglutide'in tip 2 diyabetli obez hastalarda ER stresi üzerindeki etkileri	• Tip 2 diyabet	İlaç: liraglutide	Amerika Birleşik Devletleri
Wolfram sendromlu çocuk ve yetişkin hastalarda dantrolen sodyumun klinik çalışması	• Wolfram sendromu • Diyabet • Optik sinir atrofisi • Ataksi	İlaç: dantrolen sodium	Amerika Birleşik Devletleri

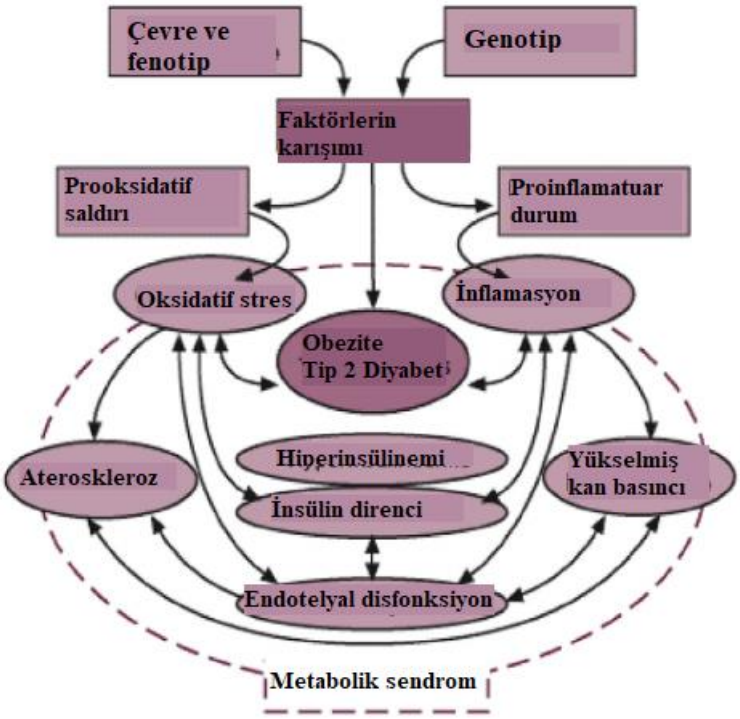
ER: Endoplazmik retikulum, TUDCA: Tauroursodeoksikolik asit, NAFLD: Alkol dışı yağlı karaciğer hastalığı, HIV: İnsan İmmünoyetmezlik Virüsü-1, RNA: ribonükleik asit.

Kaynak: *[4] kaynaktan Türkçeye çevrilmiştir.*

2.2.3.1. Metabolik Sendrom ve ERS

Sendrom X veya Reaven sendromu olarak da bilinen metabolik sendrom bir hastalık değil çeşitli patofizyolojik mekanizmaların bir arada bulunmasıyla oluşan kompleks bir bozukluktur. MetS tanısı için farklı zamanlarda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Uluslararası Diyabet Federasyonu ve Ulusal Kolesterol Eğitim Programı gibi kurumların yayınladığı parametreler bulunmaktadır. MetS tanısındaki kriterler bu kuruluşların kılavuzlarına göre farklılıklar içermekle beraber birbirine yakındır. Bu kriterler: Kan glukoz seviyesi/insülin direnci, HDL kolesterol seviyesi, kan trigliserid seviyesi/dislipidemi, kan basıncı/hipertansiyon ve bel ölçüsü, bel-kalça oranı/obezitedir. Küresel epidemi olarak bahsedilen MetS'nin çoğu ülkede farklı oranlardaki insidansı ve prevalansı Tip 2 diyabet (T2D) ve ya obeziteye paralel olarak artmaktadır [10–12]. Türk toplumunda farklı araştırmacılar tarafından MetS kapsamında çalışmalar yapılmıştır.

Bunların arasında Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri çalışması, 1990 yılında başlanan ve Türkiye'nin yedi farklı coğrafi bölgesinde saha çalışmaları ile yürütülen bir takip çalışması olması farklılık göstermektedir. TEKHARF çalışmasında 2015 yılı verilerine göre ülkemizde 9.2 milyon kişinin MetS tanısı aldığı ve bunlardan %53'ünün koroner arter hastası olduğu bildirilmiştir [13]. TEKHARF çalışmasında yürütülen genetik araştırmalarda MetS ve KVH'la ilişkili risk faktörlerinin tanımlanması amaçlanmış ve 2004-2007 yılları arasında çalışmaya katılan 2295 bireyi kapsayan bir DNA bankası oluşturulmuştur. ATP bağlayıcı kaset alt ailesi A üye 1 (*ABCA1),* kolesteril ester transfer proteini (*CETP), Il-6,* endotelyal nitrik oksit sentaz 3 *(eNOS),* lipoprotein lipaz *(LPL),* TATA kutusu bağlayıcı protein ilişkili faktör 8 *(TAF8),* apolipoproteinler *(APOD, APOA5, APOE, APOA4, APOC3),* rezistin *(RETN),* C-reaktif protein *(CRP),* ayrışmayan proteinler *(UCP2, UCP3),* peroksizom proliferatör aktive reseptör alfa ve gama *(PPARa, PPARg),* galanin ve GMAP prepropeptide *(GAL),* fibrinojen beta ve gama zinciri *(FGB, FGG),* transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2 (*TCF7L2),* FTO alfa-ketoglutarat bağımlı dioksijenaz *(FTO),* Prolin ve serin bakımından zengin sarmal bobin 1 *(PSRC1),* ADAM metalopeptidaz etki alanı 8 *(ADAM8),* sitokrom P450 aile 19 alt aile A üye 1 (*CYP19A1),* östrojen reseptörü 1 *(ESR1)* ve makrofaj inhibitör faktör *(MIF)* genlerinde genotipleme çalışmaları yapılmıştır ve Türk toplumunda *APOA5, LPL* ve *CETP* genlerindeki tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP), dislipidemi ve metabolik sendrom ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bunun yanısıra *MIF, TCF7L2* ve *LPA* genlerindeki SNP'lerin diyabet ve koroner arter hastalığı riskini arttırdığı bulunmuştur ve diğer bazı genlerdeki SNP'lerin hipertansiyon ve ya serum insülin düzeyleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [52]. MetS, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, uyku bozuklukları, üreme sistemi hastalıkları ve mikrovasküler hastalıklarla birlikte görülmekle beraber ilişkileri tam olarak tanımlanamamıştır. Makrofajlar, tiroid hormonları ve adipositler adiponektin enerji metabolizmasının işleyişinde ve düzenlenmesinde temel komponentleridir. Dolayısı ile bu üç bileşen MetS patofizyolojisinde önem taşımaktadır. Şekil 9'da MetS'nin patofizyolojisi şematik olarak gösterilmiştir. MetS ile ilişkili, patogenezinde aktif rol oynayan bir başka faktör ise ERS'dir [10–13,52]. MetS ile ilişkili aktif ERS yolaklarının tanımlanması ve mekanizmaların anlaşılması amacıyla çeşitli çalışmalar bulunmakla beraber kapsamlarının genişletilmesi gerekmektedir.



Şekil 9: Metabolik Sendromun patofizyolojisi *[53] numaralı kaynaktan Türkçeye çevrilmiştir.*

Diyabet ve Obezite: Diyabet, dünya çapında yaygın olarak gözlenen ve hızla artan bir hastalıktır. 2045 yılına kadar 693 milyon insanda bu hastalığın görüleceği tahmin edilmektedir. Patogenezinde genetik ve çevresel faktörlerin etkin olduğu multifaktöriyel bir yapısı olan diyabetin, kandaki yüksek glikoz seviyesi (hiperglisemi) ile tanısı konulmaktadır. Pankreatik β hücrelerinin disfonksiyonu nedeni ile kan dolaşımındaki glikozun hücrelere alınamaması sonucunda hipergliseminin tetiklediği, insülin direnci veya her ikisiyle ilişkili olarak sınıflandırılan farklı tipleri bulunmaktadır. Tip 1 diyabet (T1D) erken yaşlarda görünen β hücrelerinin kaybıyla ilişkili vücutta insülin üretiminin olmadığı otoimmün formdur. Tip 2 diyabet ise vücutta insülin üretiminin olduğu ama bu insülinin yetersiz olması veya fonksiyonunu yerine getirememesi ile yani insülin direnci ile ilişkili daha çok geç yaşlarda görünen otoimmün olmayan formdur. Diyabet hastalarının %90-95'ini T2D formu oluşturmaktadır. Gestastiyonel diyabet, neonatal diyabet gibi farklı alt tipleri de bulunmaktadır. Diyabet hastalarında sıklıkla hipertansiyon veya obezite de gözlenmektedir. Obezite, hücrelerde fazla enerjinin trigliserid olarak depolanması

sonucunda yağ doku kitlesinin artması ile oluşmaktadır ve insülin direncinin en sık nedenleri arasındadır. T2D hastaları arasında obezite yaklaşık %80 olarak görülmektedir [54,55].

Pankreas tarafından üretilen β hücreleri ER ağı ("network") açısından zengindir. Bununla beraber β hücrelerinin erken kaybı sonucu oluşan T1D, ERS ile ilişkilidir. ERS ile ilişkili inflamasyon ve otoimmünite T1D mekanizmasında muhtemel etkisi bulunmaktadır. β hücrelerinin fonksiyonu ve ERS ile ilişkisi üzerine hücre ve hayvan modellerinde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Farelerde farklı UPR sensörlerinin sessizleştirilmesi yöntemiyle yapılan çalışmalar sonucunda; PERK'in eksikliğinin pankreas fonksiyonunu azalttığı ve hiperglisemi gelişimine sebep olduğu, IRE1a eksikliğinin hiperinsülinemi ve hiperglisemide etkin olduğu ve inflamasyon ve oksidatif strese sebep olduğu, ATF6a'nın pankreatik β hücrelerini apoptozdan koruduğu ama aynı zamanda da insülin direnci oluşumuna dahil olduğu, ATF4'ün diyet bağımlı obeziteyi, glukoz homeostazisini ve metabolizmayı etkilediği, GRP78'in heterozigot eksikliğinde diyete bağlı obeziteye direnç ve insüline duyarlı olması gibi sonuçlar elde edilmiştir. İnsanlarda ise nadir bir hastalık olan Wolcott-Rallison sendromunda gözlenen neonatal diyabetin nedeni olarak *PERK* genindeki mutasyonlar gösterilmiştir [14].

Endoplazmik retikulum stresi, T2D ve insülin direnci ile de ilişkilidir. Yaşlanma ve obezite insülin direncine sebep olmaktadır ve β hücrelerinin fonksiyonu bozulmakta, proliferasyonu azalmaktadır. Bu süreçte ilk olarak β hücrelerinin kütlesi genişlemekte ve insülin biyosentezi yükseltilmektedir. Ancak, β hücrelerinin disfonksiyonu nedeniyle yetersiz olan insülin seviyesi T2D'ye sebep olmaktadır. ERS, T2D gelişiminde de β hücrelerinin disfonksiyonuyla ilişkilidir [6]. *BIP*'in sessizleştirildiği farelerde yüksek yağ içeren diyetle indüklenmiş obezite ve T2D gelişiminin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, ERS ve inflamasyon, kaslarda ve yağ dokusunda glikoz alımını sağlayan, diyabette glisemik kontrol belirteci olan insüline duyarlı glikoz taşıyıcının (*GLUT4*) ekspresyonunu azaltmaktadır. Bu durum, gestastiyonel diyabeti olan kadınlarda insülin direncinin oluşmasında da rol oynamaktadır [56]. Obezite varlığında ERS'in tetiklenmesi ve JNK aracılıklı yolağın aşırı uyarılması ile insülin sinyalizasyonunda sorun oluşturması diyabet ile ilişkisini göstermektedir [57]. Diyabetin indüklediği miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarında

da ERS'nin ATF4-CHOP yolağıyla ferroptoz oluşumunu desteklediği ve sonucunda miyokard hasarına neden olduğu da gösterilmiştir [42]. Bunların yanında, ERS'nin β hücrelerinin işlevi üzerine etkisinde UPR haricinde ERAD mekanizması, protein disülfür izomeraz ailesi A üye 6 (ERp5), Wolframin ER transmembran glikoprotein (WFS1) gibi çeşitli ERS ilişkili faktörlerin de katkısının olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [6]. Ek olarak, ER dishomeostazı sonucunda ekspresyonu olan transkripsiyon faktörlerinden CREB, yağ asidi oksidasyonu, lipofaji, glikoz metabolizması ve hepatik lipolizde yer alan enzimlerin ve metabolik düzenleyicilerin genlerinin ekspresyonunu etkilemektedir [41].

Kardiyovasküler Hastalıklar: Dünya genelinde en yüksek oranda ölüme sebep olan hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 2019 yılında Türkiye'deki ölümlerin %36,8'i KVH'dan kaynaklanmaktadır [58]. Vücut genelinde oksijen ve besin taşınmasını sağlayan, hematopoietik, vasküler ve kardiyak bileşenlerin oluşturduğu kardiyovasküler sistemde meydana gelen patolojik durumlar KVH'a neden olmaktadır [9]. Ateroskleroz, kalp yetmezliği, iskemik ve hipertrofik kardiyomiyopatiler kardiyovasküler hastalıklardır [7,9]. Kanda yüksek seviyedeki kolesterol, hipertansiyon, hiperglisemi ve yüksek homosistein (Hcy) seviyeleri KVH için önemli risk faktörleri arasındadır [9,59,60].

Protein ve lipid sentezinin, Ca^{+2} homeostazının, sinyalizasyonun, hücre homeostazisinin düzenlenmesinin temelinde yer alan ER'de hiperlipidemi, kalsiyum dengesizliği, oksidatif stres gibi çeşitli patolojik faktörler sonucunda stres meydana gelmektedir. ERS hem KVH sürecinde bazı patolojik mekanizmalar tarafından indüklenmekte hem de KVH'ın da oluşumu ve gelişiminde etkili olmaktadır. Bu etkisini inflamatuar tepki mekanizmaları ya da apoptotik sinyal yolağı üzerinden gösterebilmektedir [59].

Ateroskleroz, vasküler hücrelerin disfonksiyonu ile başlayan, damarlarda plak birikmesi sonucu kan akışının bozulmasına sebep olan bir KVH'dır. Vasküler endotel hücrelerinde atero bağımlı indükleyici olan, düz kas hücrelerinde lipid birikimini arttıran Hcy ve modifiye edilmiş düşük yoğunluklu lipoprotein, ERS'yi aktive edebilmektedir. Aktif hale geçen ERS, PERK/eIF2α/CHOP, IRE1α/TRAF2/ASK sinyal yolakları veya RIDD mekanizması ile aterosklerozda apoptozu indüklemektedir.

Aynı zamanda ERS, ateroskleroz sürecinde makrofaj apoptozunda da etkilidir. Ayrıca, UPR sinyalizasyonu sonucu sitokinlerin üretimi ve UPR sensörlerinin inflamasyon yolağındaki proteinlerle etkileşimiyle aterosklerozda inflamasyona katkısı bulunmaktadır [56]. Aterosklerozun gelişim sürecinde SREBP, lipid metabolizmasını ve kolesterol kontrolünde önemli protein ailesidir ve bu proteinler de ERS ile ilişkilidir. ERS'in tekiklenmesi sonucunda SREBP-2'nin artış yönünde düzenlenmesi ve vasküler düz kas hücrelerinde lipid birikiminde artış olmaktadır [7].

Hipertansiyon, KVH'ın temelinde yer alan ve kalp yetmezliğine yol açabilen önemli bir risk faktörüdür [61]. Hipertansiyonun ERS ile ilişkisini işaret eden birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda beyinde oluşan ERS'nin kronik hipertansiyonda etkisi, ERS'nin (NF)-κB aracılığıyla anjiyotensin II (Ang II) bağımlı hipertansiyonla beraber gözlemlenmesi ve şiddetli tansiyon durumunda nöronal ERS ve apoptoz aracılığıyla nöronal hasar oluşturması gösterilmiştir. Ayrıca hipertansiyonda endotel hücrelerinde ERS'nin oksidatif stresi tetiklediği de gözlenmiştir. ERS sonunda, vasküler plak oluşumu da tetiklenmektedir. Spontan hipertansif sıçanlarda PERK-eIF2α-ATF4 yolağıyla ERS'nin uyarıldığını gösteren çalışmada miyokard, arterler ve aortta *ATF4, ATF6, CHOP* gibi ERS ilişkili genlerin ekspresyonunun ve GRP78, kaspaz-3 gibi ERS ilişkili moleküllerin seviyesinin arttığı gösterilmiştir [7].

Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı: Alkolik olmayan karaciğer yağlanması, en yaygın görülen karaciğer hastalıklarından biridir. Aşırı alkol alımıyla veya diğer kronik karaciğer hastalıklarıyla ilişkisi olmayan NAFLD, obezite ve T2D gibi metabolik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Kesin bir tedavi yöntemi olmayan ve alkolik olmayan steatohepatitten siroza kadar ilerleyebilen NAFLD'de hepatositlerde %5'ten fazla steatoz bulunmaktadır. NAFLD'nin sebebi tam bilinmemekle beraber insilin direnci, inflamasyon, sinyal yolaklarındaki bozukluklar, oksidatif stres ve çevresel faktörlerin etkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, ER'nin inflamasyon, fibrozis ve steatozun oluşumunda aktif rol oynadığını göstermiştir. ERS sonucunda meydaha gelen inflamatuar yanıtlar sürecinde karaciğere sızan immün hücreler, hepatosit disfonksiyonunu arttıran immünomodülatör mediatörler ve proinflamatuar sitokinler salınmaktadır. Bunun sonucunda NAFLD/NASH'ye neden olan fibroz, hepatosit nekrozu ve hepatik steatoz oluşmaktadır [62].

UPR sensörlerinin sessizleştirilmesi üzerine yapılan farklı çalışmalarla lipid metabolizması ve hepatik steatoz ile ilişkileri gösterilmiştir. Örneğin, *ATF4* sessizleştirilmiş farelerde hepatik steatoz, hipertrigliseridemi ve diyete bağlı obeziteye karşı koruyucu etki gösterdiği, ATF6α sessizleştirilmiş farelerde SREBP1c ile ilişkili hepatik steatozun arttığı bildirilmiştir.

Lipid homeostazında IRE1α-XBP1 yolağı etkin haldedir [57]. Lipogenik diyetle beraber karaciğere özgü *XBP1* geninin delesyonu gerçekleşmiş farelerde lipid birikiminin inhibe edildiği ve hepatik lipogenezde azalma meydana geldiği gösterilmiştir [9].

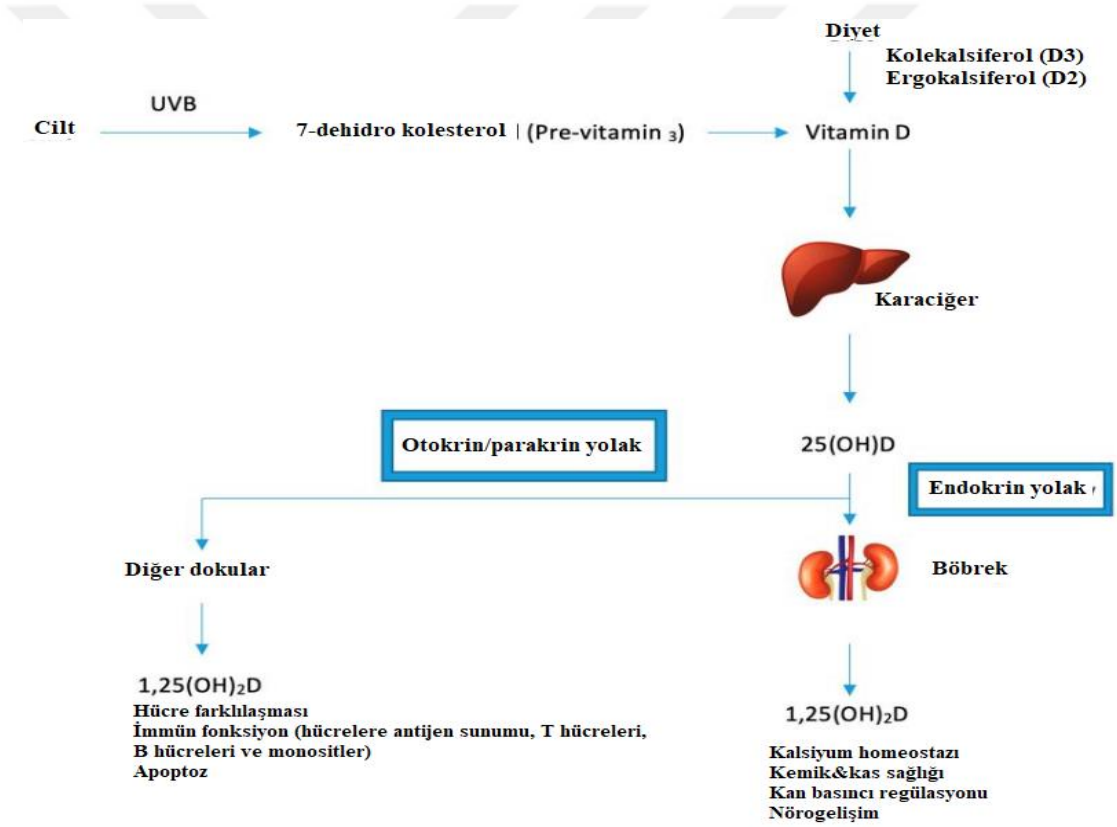
ERS'nin NAFLD ile ilişkisi hakkında yapılan klinik bir çalışmalarda NAFLD ve NASH hastalarında eIF-2α sinyalizasyonun indüklendiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise IRE1-JNK yolağının aktivasyonu ve aracılı apoptoz ile orantılı XBP1 aktivasyonunun azalmasının NASH gelişiminde etkisi olduğu bulunmuştur. Ayrıca, karaciğer biyopsilerinin normal, steatoz ve NASH olarak üç gruba ayrılan bir çalışmada işlenmiş *XBP1* ekspresyonunu ve NASH oluşumunu düzenleyen ERS aracılı otofaji ve apoptoz genlerinin uyarıldığı gösterilmiştir [9].

2.2.3.2. Metabolik Sendromda Vitamin D'nin Etkisi

Kardiyovasküler hastalıklara ve Tip 2 diyabete sebep olan metabolik sendrom dislipidemi, yüksek bel/kalça oranı, hipertansiyon gibi kompleks patolojik durumların birlikteliğidir. Artmış fiziksel aktiviteler, kilo kaybı MetS'den korunma ve iyileşme sürecinde önemlidir. Akdeniz diyetinin de MetS'ye karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır. Bununla beraber VitD'nin T2D ve MetS'de düzenleyici etkisi olduğu bilinmektedir [63].

Vitamin D yağda çözünebilen bir seko-steroid hormonudur [32]. Otokrin, parakrin ve endokrin gibi hormonal fonksiyonları olan VitD iskelet homeostazı, fosfor ve kalsiyum metabolizmasındaki aktivitesiyle kemik mineral metabolizmasının temelinde bulunmaktadır [30]. VitD, besinlerden alınabildiği gibi güneş ışığı (ultraviyole;UVB) etkisi ile melanositlerde sentezlenmekte ya da takviyelerden vitamin D2 (ergokalsiferol) ve vitamin D3 (kolekalsiferol) olarak pasif halde vücuda

alınmaktadır. Vitamin D3 hayvansal gıda kaynaklıdır veya melanositlerde sentezlenmektedir. Vitamin D2 ise bitkisel kaynaklıdır [31,32]. VitD, karaciğerde enzimatik olarak işlenmekte ve VitD bağlayıcı protein (DBP) aracılığıyla diğer dokulara taşınması gerçekleşmektedir. Böbrekte ise enzimatik tepkimeler sonucunda aktif hale geçmektedir [31]. Bu süreçte magnezyum varlığı önem taşımaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada magnezyum tedavisinin, VitD'nin karaciğerde oluşan 25(OH)D formunun konsantrasyonuna göre 25(OH)D3, 25(OH)D2, ve 24,25(OH)2D3 konsantrasyonlarını etkilediği gösterilmiştir [64]. Şekil 10'da VitD metabolizması gösterilmiştir.

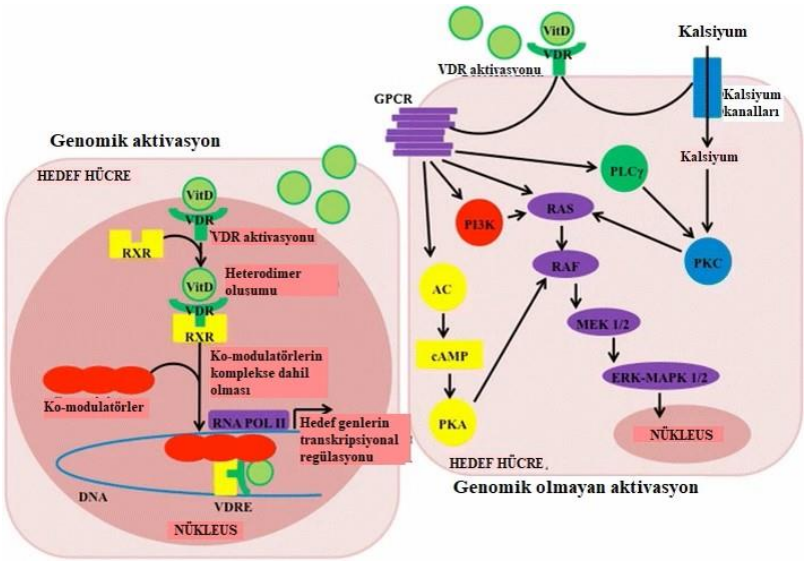


Şekil 10: Vitamin D metabolizması *[31] numaralı kaynaktan Türkçeye çevrilmiştir.*

Karaciğerde DBP ile bağlanan 25(OH)D, megalin-cubulin aracılı ya da serbest halde hücre membranından geçerek hücre içine alınabilmektedir. Hücre içindeki mekanizma henüz tam olarak kanıtlanamasa da mitokondrilerde metabolik olarak aktif

hale (1,25(OH)2D) gelmekte ve VitD reseptörü aracılığıyla nükleusa girmektedir. VDR, nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve çoğu doku ve hücrelerde değişken ekspresyon seviyesine sahiptir [32]. VitD, VDR aracılığı ile genomik ve genomik olmayan mekanizmaları tetikleyebilmektedir. Genomik aktivasyonunda VDR ile bağlanmış VitD, retinoid X reseptör (RXR) ile kompleks oluşturarak ve çeşitli ko-modulatörler aracılığıyla hedef genlerin promotör bölgesindeki VitD cevap elementinine (VDRE) bağlanmakta ve hedef genlerin transkripsiyonunu etkilemektedir. Genomik olmayan aktivasyonunda ise hücre yüzeyinde VitD varlığında aktifleşen VDR, çeşitli sinyal yolaklarını indüklemekte ve transkripsiyonel etki göstermektedir [33]. Aslında kalsiyum homeostazını içeren hücrelerde yüksek seviyede bulunan VDR'nin farklı hücre ve dokularda da farklı seviyelerde bulunması ilgili hücre ve dokuda VitD'nin çeşitli hücresel tepkilere ve kalsiyum homeostazına etkisini göstermektedir [32]. Şekil 11'de VitD'nin genomik ve genomik olmayan aktivasyonu gösterilmiştir.

VitD'nin antiapoptotik, antiinflamatuar, antifibrotik özellikte farklı işlevleri bulunmaktadır. Önemli aktiviteleri olan VitD'nin düşük seviyede bulunması dünya genelinde görünen ve klinik etkileri olan bir durumdur. 25(OH)D seviyesinin 21–29 ng/mL, 10–20 ng/mL, 9–5 ng/mL ve 5 ng/mL'nin altında olduğu zaman sırasıyla VitD yetersizliği, hafif eksikliği, orta eksikliği ve ciddi eksikliği olarak adlandırılmaktadır [30]. VitD eksikliği ve MetS arasındaki ilişki üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır.



Şekil 11: Vitamin D'nin aktivasyonu *[33] numaralı kaynaktan Türkçeye çevrilmiştir.*

VitD'nin etki mekanizmaları tam olarak tanımlanmamış olmakla birlikte obezite, insülin direnci, hipertansiyon, kan glikoz seviyesi, kolesterol ve trigliserid seviyeleri gibi MetS parametreleri üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir [30,34]. Örneğin, β hücrelerinde VDR eksprese olmaktadır ve VitD eksikliği durumunda insülini işleme kapasiteleri etkilenmektedir. Bu durum VitD'nin MetS'nin ana parametrelerinden biri olan insülin direnci üzerine etkisini göstermektedir [30]. 2012'de yayınlanan bir çalışmada, 43 diyabet hastasında VitD seviyesine göre ERS seviyesi analiz edilmiş ve VitD'nin ERS'yi azaltarak antiaterojenik makrofaj fenotipini arttırdığı bulunmuştur [65]. VitD seviyesi ile MetS arasındaki ilişki üzerine yapılan meta-analiz çalışmasında gelişmiş ülkelerde yüksek serum VitD seviyesinin düşük seviyeye göre MetS gelişme olasılığını %43 ve her 25 nmol/L artışın MetS ihtimalini %15 azalttığı bulunmuştur [63]. Yetişkinlerde kardiyometabolik risk faktörlerini inceleyen bir meta-analiz çalışmasında ise VitD'nin vücut kitle indeksiyle olmasa da iç organ yağlanması ve cilt altı yağ dokusunun artmasıyla ters yönde bir ilişkinin olduğunu saptanmıştır. VitD eksikliğinin kardiyovasküler risk faktörleri ve insülin direnci ile potansiyel ters ilişkisi olduğu gösterilmiştir [66]. Başka bir araştırmada, VDR'nin hepatik iskemi ve reperfüzyon hasarından karaciğeri koruyabildiği, ERS aracılı inflamasyonu inhibe ettiği ve otofaji aracılığıyla ERS'yi düzenleyebildiği gösterilmiştir [67]. Ayrıca VDR polimorfizmlerinin MetS ile ilişkisi üzerine yapılan bir meta-analiz çalışmasında, *BsmI* (rs1544410) polimorfizminin MetS'ye karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir [68]. Yapılan çalışmalar sonucunda, VitD eksikliğinin MetS için bir neden mi olduğu yoksa MetS sonucu mu geliştiği tam olarak kanıtlanmamıştır ve bu konuda daha çok çalışma yapılması gerekmektedir. Ancak, VitD takviyesinin MetS üzerindeki koruyucu ve düzenleyici etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3: D vitamini takviyesinin metabolik sendrom üzerindeki etkilerinin özeti.

Takviye Özellikleri	Bulgular
Vitamin D3 5000 IU günlük, 6 ay	Pre-diyabetik hastalarda, 6 ay boyunca D vitamini takviyesi periferik insülin duyarlılığını ve β-hücre fonksiyonunu önemli ölçüde artırmıştır.
	Prediyabet hastalarında, orta ila yüksek dozlarda (≥1000 IU/gün) D vitamini takviyesi, plasebo ile karşılaştırıldığında Tip 2 Diyabet insidans riskini önemli ölçüde azaltmıştır.
D vitamini, 50.000 IU/hafta (Zahravi Co® pearls), 8 hafta	D vitamini takviyesi, HbA1c'yi azaltarak ve SIRT1'i artırarak Tip 2 Diyabeti iyileştirmiştir.
2 haftada bir 50.000-IU D vitamini takviyesi, 6 ay	Plasebo ile karşılaştırıldığında, D vitamini takviyesi açlık plazma glukozu, serum insülini, insülin direncinin homeostaz modeli değerlendirmesi ve β hücre fonksiyonunda önemli azalmalarla sonuçlanmıştır.
2 haftada bir 50.000 IU D vitamini takviyesi + keten tohumu yağından 2 × 1000 mg/gün n-3 yağ asitleri, 6 ay	D vitamini ve n-3 yağ asitlerinin birlikte verilmesi, plaseboya kıyasla açlık plazma glikozu, insülin, insülin direnci ve LDL'de anlamlı bir azalmaya ve insülin duyarlılığı ve HDL'de anlamlı bir artışa yol açmıştır.
Günlük 3000 IU (75 µg) D3 vitamini, 26 hafta	Tedavi ve plasebo grubu arasında tüm vücut, periferik veya hepatik IR ölçümlerinde veya herhangi bir glisemik kontrol veya β-hücre fonksiyonu ölçümünde fark yoktu.
20.000 IU D3 vitamini/hafta, 12 hafta	Sağlıklı orta yaşlı erkeklerde, D vitamini tedavisinin insülin duyarlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmuştur.
2 haftada bir 50.000 IU D vitamini takviyesi, 12 hafta	D vitamini takviyesi alan hastalarda açlık plazma glikozu, serum insülin düzeyleri, homeostaz değerlendirme modeli-insülin direnci, serum trigliserid toplamı ve LDL plaseboya kıyasla önemli ölçüde azalmıştır.
2 haftada bir 50.000 IU D vitamini + günde iki kez 1000 mg omega-3 yağ asitleri, 6 hafta	Genel olarak, gestasyonel diyabet hastalarında 6 hafta boyunca D vitamini ve omega-3 yağ asitlerinin birlikte verilmesinin açlık plazma glukozu, serum insülin düzeyleri, insülin direnci için homeostatik değerlendirme modeli, kantitatif insülin duyarlılığı kontrol indeksi, serum trigliseritleri ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol düzeyleri üzerinde yararlı etkileri olmuştur.
3000 IU/gün idame dozunu takiben 8 hafta boyunca yükleme dozu olarak 100.000 IU/hafta	Hem aşırı kilolu hem de obez deneklerde takviyenin altıncı ayından sonra, HOMA-IR, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol ve paratiroid hormon seviyelerinde önemli bir düşüş tespit edilmiştir.

Tablo 3 devamı

D3 vitamini 4000 IU/gün 4 ay boyunca	Tedaviden önce ve sonra hastanın kendi serumunda kültürlenen monositlerde oksitlenmiş LDL alımının değerlendirilmesi, D vitamini grubunda >%50 azalma ile sonuçlanırken plasebo grubunda değişiklik olmamıştır. Monosit kolesterol alımındaki azalma, toplam monosit kolesterol içeriğinde %19'luk bir azalma olarak yansımıştır.
50.000 IU D3 vitamini kas içine, 6 ay boyunca aylık olarak	Erken diyabetik nefropatisi olan hastalarda altı aylık yüksek doz D vitamini tedavisi ile serum HDL seviyesinde anlamlı bir iyileşme görülmüştür.
	Bu meta-analiz, kardiyovasküler hastalıkları olan hastalarda D vitamini takviyesinin glisemik kontrol, HDL ve C reaktif protein düzeylerini iyileştirme üzerindeki yararlı etkilerini göstermiştir.
4 aylık bir süre boyunca 4000 IU/gün şeklinde VD3	4 aylık D vitamini takviyesinden sonra, LDL ve HbA1c'deki ortalama fark (0 ve 4. aylarda) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
12 hafta boyunca her 2 haftada bir 50.000 IU dozunda oral D3 vitamini takviyesi	D vitamini takviyesinin lipid profilleri ve diğer enflamasyon ve oksidatif stres biyobelirteçleri üzerinde plaseboya kıyasla anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.
D3 vitamini takviyesi, 25.000 ila 600.000 IU/ay kolekalsiferol. Tedavi süresi: 1 ila 12 ay arasında.	Kolekalsiferol takviyesi BMI'yi -0,32 kg/m2 ve bel çevresini -1,42 cm azaltmış ancak kilo kaybını istatistiksel olarak etkilememiştir -0,43 kg.
Günlük 400 ila 7000 IU kolekalsiferol takviyesi. Tedavi süresi: 3 ila 12 ay arasında değişmektedir.	Müdahaleden sonra bireylerde kolekalsiferol takviyesi artmıştır. Vücut yağ yüzdesinde bir azalma bulunmuştur (-%0,31, %95 CI: -1,07 ila 0,44), ancak bu anlamlı değildir.
Haftalık puşe doz 50.000 IU, D vitamini. Tedavi süresi: 12 hafta.	D vitamini uygulamasından sonra serum 25(OH)D seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Analizler, gruplar arasında karşılaştırma yapıldıktan sonra ağırlık ve vücut yağ yüzdesinde anlamlı bir düşüş olduğunu göstermiştir.

Tablo 3 devamı

Takviye, haftalık 50.000 IU dozunda D3 vitamini veya haftalık 50.000 IU D vitamini ve günlük 1.200 mg/dL kalsiyum dozunda D3 vitamini ile kalsiyum kombinasyonundan oluşmuştur. Tedavi süresi: 3 ay.	Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, D vitamini takviyesi yapılan kadınlar kilo kaybı veya obezite biyobelirteçlerinin iyileşmesiyle ilgili önemli değişiklikler göstermemiştir. Bununla birlikte, kalsiyum ve D vitamininin birlikte takviye edilmesinden sonra, kiloda bir azalmanın yanı sıra bazı kan metabolik profillerinde de bir iyileşme olduğu bildirilmiştir. illerinde de bir iyileşme olduğu bildirilmiştir.
Günlük D vitamini takviyesi dozları 100 ila 8571 UI arasındadır. Tedavi süresi: 1,5 ila 36 ay arasında değişmektedir.	Plasebo veya kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda, D vitamini uygulamasından sonra ne BMI ne de bel çevresinin önemli ölçüde azalmadığı belirlenmiştir.
Günlük D vitamini dozları 400 ila 4800 IU arasında değişmiştir. Tedavi süresi: 12 ay.	Serum D vitamini düzeyleri ile yağ kütlesi arasında ters bir ilişki bulunmasına rağmen, gruplar arası analizlerde takviyeden sonra BMI veya yağ kütlesinde önemli bir azalma bulunmamıştır.
	Plasebo ile karşılaştırıldığında, D vitamini takviyesinin BMI, kilo veya yağ kütlesi üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Benzer şekilde, D vitamini artı kalsiyum alan katılımcılarda, kalsiyum kontrolü alanlara kıyasla BMI, kilo veya yağ kütlesinde önemli bir azalma gözlenmemiştir.
Günlük 600, 1000 ve 2000 IU içeren oral D vitamini dozları. Tedavi süresi: 6 ay.	D vitamini takviyesi çocuklarda BMI, bel çevresi, bel-kalça oranı ve yağ dokusu yüzdesi üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Buna karşılık, günlük 1000 IU uygulamasından sonra SBP ve DBP düzeylerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.
Günlük 1200 IU D vitamini takviyesi. Tedavi süresi: 26 hafta.	Plasebo grubuna kıyasla obez çocukların ne BMI ne de kilolarında anlamlı bir azalma görülmemiştir.
Günde 2000 IU D vitamini, 3 ay	Sonuçlar, D vitamini takviyesi ile BMI, kan basıncı, lipidler, glikoz ve insülin seviyeleri arasında bir ilişki göstermemiştir.
D vitamini uygulama dozu günde 200 ila 12.000 IU arasında değişmekteydi. Ortalama tedavi süresi 5,6 ± 4,0 aydı.	Sonuçlar, 50 yaşın üzerindeki deneklerde 800 IU'dan daha yüksek dozlarda günlük D vitamini takviyesi uygulamasının hem SBP hem de DBP'yi önemli ölçüde azalttığını göstermiştir ($p < 0.001$). Ayrıca, hem sağlıklı denek grubunda hem de hipertansif denek grubunda hipotansif etkiler gözlenmiştir.

Tablo 3 devamı

Uygulanan günlük D vitamini dozu 2800 IU ila 5000 IU'den fazla olmuştur. Tedavi süresi: 8 ila 20 hafta arasındadır.	Sonuçlar, D vitamini eksikliği olan katılımcılarda D vitamini takviyesinin periferik DBP üzerinde önemli bir etkisi olduğunu, ancak periferik SBP ile aynı olmadığını göstermektedir. Alt grup analizi, Asya, 8 haftalık müdahale ve 5000 IU'dan fazla günlük D vitamini takviyesi alt gruplarında periferik SBP ve DBP'de anlamlı bir düşüş olduğunu göstermiştir.
Uygulanan D vitamini dozu günde 200 IU ile 400 UI arasında değişmiştir. Tedavi süresi: 5 ila 15 hafta arasındadır.	Analiz, D vitamini takviyesinin SBP'yi 2,44 mmHg azalttığı, ancak plasebo gruplarına kıyasla DBP üzerinde herhangi bir etki gözlenmediği sonucuna varmıştır.
Günlük D vitamini uygulama rejimi 1000 IU ile 5000 IU arasında değişmiştir. Tedavi süresi 4 ila 52 hafta arasında değişmiştir.	D vitamini takviyesinin etkileri endotel fonksiyonunda iyileşme göstermemiştir. Özellikle, kan basıncında, brakiyal arterde tıkanma sonrası vazodilatasyonda ve diğerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.
D vitamini takviyesi günlük 200 IU ile 7000 IU arasında değişmektedir. Tedavi süresi 8 hafta ile 1 yıl arasında değişmektedir.	Analiz edilen tüm çalışmalar serum D vitamini seviyelerinde anlamlı bir artış bulmuştur. Ancak, D vitamini takviyesinin SBP ve DBP üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır.
D vitamini uygulama rejimleri günlük 400 IU ile 43.000 IU arasında değişmekte ve 12 ile 24 hafta arasında sürmektedir.	Sonuçlar, D vitamini takviyesinin çocuk ve ergen popülasyonlarında SBP ve DBP'yi azaltmada etkisiz olduğunu göstermiştir.
D vitamini günlük 200 IU ile 7142 IU arasında uygulanmıştır. Kalsiyum dozu günlük 500 ila 1200 mg arasında değişmiştir. Tedavi süresi 6 hafta ile 7 yıl arasında değişmiştir.	D vitamini ve kalsiyum birlikte verildiğinde kontrol grubuna kıyasla SBP'de bir azalma görülmezken, DBP'de anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir.

Tablo 3 devamı

Vitamin D3	İki rejim eşdeğerdi; hastaların çoğu altı aylık tedaviden sonra kalsiyum seviyelerinde artış ve kemik döngüsünde azalma ile normal D vitamini aralığına ulaştı. Bel çevresi de azalmıştır. Serum 25(OH)D3 vitamini konsantrasyonu ile bel çevresi arasındaki ilişki, bel ölçüsünün kardiyovasküler ve metabolik hastalık riski ile doğrudan ilişkili olması nedeniyle D vitamininin mevcut durumda koruyucu bir rolü olduğunu desteklemektedir.
D3 vitamini, D vitamini takviyeli süt	Tüm gruplarda 25(OH)D seviyelerinde artış görülmüştür. Ayrıca trigliserit, glikoz ve sistolik kan basıncında klinik olarak anlamlı bir düşüş ve HDL'de zaman içinde Vit D grubu lehine klinik olarak anlamlı bir artış ortaya çıkmıştır. MetS insidansı sadece Vit D grubunda azalmıştır. Sonuç olarak, oral D vitamini takviyesi, D vitamini durumunu iyileştirmede D vitamini takviyeli sütten daha üstündür. D vitamini düzeltmesine bağlı olarak Arap ergen popülasyonunda MetS insidansındaki azalma doza bağlı olabilir.

IU: Uluslararası birim, HbA1c: Hemoglobin A1c, SIRT1: Sirtuin, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, HOMA-IR: İnsülin direncinin ölçütü, BMI: Beden kitle indeksi, CI: Güven aralığı, SBP: Sistolik kan basıncı, DBP: Diyastolik kan basıncı, mmHg: milimetre civa.

Kaynak: 30 numaralı kaynaktan Türkçeye değiştirilerek kullanılmıştır.

2.3. ERKEK İNFERTİLİTESİ

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 12 ay ve ilerleyen süreçte düzenli olarak korunmasız cinsel ilişki sonucunda hamilelik gerçekleşmemesi durumu olarak tanımlanmaktadır. DSÖ'nün 2023'te yayınladığı verilere göre dünya genelinde her 6 bireyden 1'inde infertilite gözlenmektedir [15]. Erkeklerin yaklaşık %7'sinin infertil olduğu ve infertil çiftlerin yaklaşık %20'sinde erkek infertilitesinin söz konusu olduğu bildirilmiştir [16,17].

Erkek infertilitesi spermatogenez hataları ya da fertilizasyon kusurları nedeniyle meydana gelebilmektedir. DSÖ'nün de erkek infertilitesi tanımına göre semenin hacmi, spermin hareketliliği, yapısı, sayısı, pH ve progresif hareketli sperm sayısı önem taşımaktadır [18]. Bu kriterleri temel alarak yapılan semen analizinde tespit edilebilen

sperm parametrelerine göre erkek infertilitesi farklı kategorilere ayrılmıştır: DSÖ'nün 5. Kılavuzuna göre, semende sperm gözlenmemesi azoospermi, sperm sayısı <15–20x10^6 ise oligozoospermi, normal morfoloji oranı <%30 ise teratozoospermi ve sperm hareketlilik oranı <%32 ise astenozoospermi olarak tanımlanmaktadır [69]. İnfertilite nedeninin açıklanamaması ise idiopatik infertilite olarak isimlendirilmektedir [20]. Semenin kalitesi bireyin beslenme şekli, uyku kalitesi, yaşı, hastalık veya genetik kaynaklı nedenlere göre çeşitli faktörlerden etkilenmektedir [18]. Erkek infertilitesinin yaklaşık %15'nin genetik kökenli olduğu bildirilmiştir [16]. Testisin seminifer tübüllerinde gerçekleşen spermatogenez ve sonrasında spermiyogenezin sağlıklı bir şekilde ilerlemesi bir çok genin sıkı bir şekilde düzenlenmesi ile gerçekleşmektedir. Bu genlerden birinde ya da bir kaçında oluşan düzensizlik infertiliteyle sonuçlanabilmektedir. Spermatoogenez ile ilişkili genlerdeki patojenik varyantlar, Y kromozomundaki mikrodelesyonlar ve kromozomal anomaliler erkek infertilitesinin genetik etyolojisine örnek olarak verilebilir [19,20].

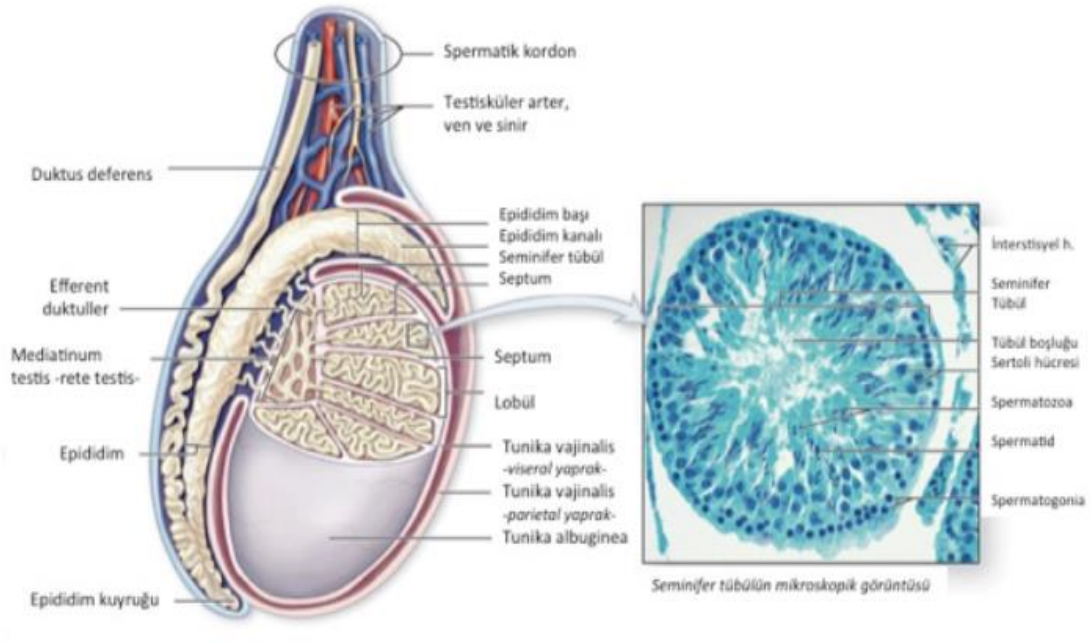
2.3.1. Testis Yapısı ve Fonksiyonu

Testisler endokrin ve ekzokrin işlevi olan erkek üreme sistemi bileşenidir. Skrotum kesesi içerisinde yer alan testis, dıştan içe doğru sırasıyla tunika vaginalis, fibröz bağ dokusundan oluşan tunika albuginea ve testisin vasküler tabakası teşkil eden tunika vaskulosadan oluşan kapsül ile çevrilidir. Kapsülün testisin medullasına doğru girintileri şeklindeki septalar testis lobunu yaklaşık 250 kompartmana ayrırarak testisin posterior bölgesinde mediastinumda kalınlaşarak birleşir. Septaların arasında spermatazoa üretiminin gerçekleştiği seminifer tübüller yer alır. Her seminifer tübül yaklaşık 30-70 cm uzunluğundadır. Seminifer tübüller mediastinumda anastomoz yapan kanalların oluşturduğu ağ yapısı olan rete testise açılır. Rete testiste seminifer tübüller 15-20 adet efferent duktus halinde epididim başına gelir. Bu yapılar sayesinde testiste üretilen spermler epididime geçiş yapar [21,22].

Testiste yaklaşık 600-1200 sayısındaki seminifer tübüllerin uzunluğu 450-650 metredir. Seminifer tübüllerde kompleks bir epitel katmanı bulunur. Bu epitel yapıda spermatogenik germ hücreleri ve yapısal ve besinsel destek sağlayan Sertoli hücreleri bulunmamaktadır. Sertoli hücreleri basal membrandan lümene doğru uzanan, yoğun

oranda granüllü endoplazmik retikulum içeren hücrelerdir [21,22]. Şekil 12'de testisin anatomik bileşenleri ve testiküler lümenin histolojik yapısı şematik olarak verilmiştir.

Leydig,ve Sertoli hücreleri, diğer peritübüler miyoid hücrelerle beraber testis mikroçevresini oluştururlar. Leydig hücreleri testosteron dahil diğer androjenleri, oksitosin gibi parakrin faktörleri salgılar. Aynı zamanda androjenlerin östrojene dönüşmesi için gerekli olan aromatazı, inhibin ve aktin dahil sitokinleri, ve bazı hormon ve sitokinler için gerekli olan reseptörleri içerir. Leydig hücreleri çeşitli fonksiyonlarıyla erkek germ hücrelerinin gelişimini, spermlerin hareketini, sayısını, morfolojisini etkilemektedir. Bu nedenle spermatogenezin düzenlenmesinde ve erkek seksüel farklılaşmasında ve davranışında önem taşır [70]. Fertilite ve spermatogenezin temelinde rol oynayan Sertoli hücreleri ise destekleyici hücreler olarak bilinmektedir. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin gelişiminde besin kaynağı sağlar. Ürettikleri sitokinler, parakrin faktörler ve F5, kolajen olmayan 1 (NC1), ve laminin (LG)3/4/5 peptidleri dahil çeşitli biyomoleküllerle spermatogenezi desteklemektedirler. F5, NC1 ve LG3/4/ Sertoli hücrelerinden seminifer epiteline geçişi sağlayan sıkı bir kan-testis bariyerinin yapısını modüle etmektedir ve spermatidlerinin adezyonunu destekleyerek moleküler anahtar olarak rol almaktadırlar [71]. Sertoli hücreleri, Leydig hücrelerinin ürettiği testosteron ile etkileşerek mayoz bölünme ile spermatogenezin devamlılığını da desteklemektedir [23].



Şekil 12: Testisin anatomik bileşenleri ve testiküler lümenin histolojik yapısı [72]

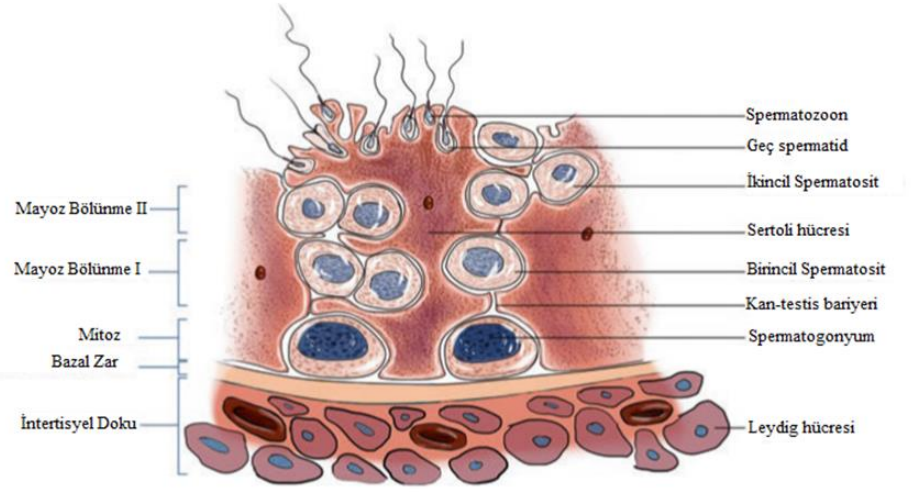
2.3.2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonial kök hücrelerden ovumu dölleyecek fonksiyona erişen spermlerin 74 günü bulan oluşum sürecidir [17]. Spermatogenez, seminifer tübüllerde gerçekleşmektedir ve günde 275 milyona kadar sperm üretilmektedir [22].

Çeşitli hücre tiplerinin (germ hücreleri, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve peritubular miyoid hücreler) dahil olduğu spermatogenez üç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar sırasıyla; sperm kök hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması, spermatositlerin mayozu ve spermiyogenezdir [22]. Germ hücreleri Sertoli hücrelerinin arasında seminifer tübülün bazal zarından adluminal bölgeye doğru olgunlaşma seviyelerine göre sıralı bir şekilde bulunurlar. Sperm kök hücresi spermatogonyumlar 3 alt tipe sınıflanmaktadır. İlk ikisi A tipi (koyu tip A;Ad ve soluk tip A:Ap) spermatogonialardır ve Ap üçüncü tip olan farklılaşmış B tipi spermatogonialarını üretmektedir. Ad'nin ise kendini yenileyebilen ve sadece kök hücre havuzunu koruyan ya da başka bir sınıflamaya göre ise hareketsiz ve yedek olarak bulundukları söylenebilmektedir [22,23].

B tipi spermatogonialar mitoz bölünme ile spermatogenezdeki son diploid hücreler olan spermatositlere farklılaşırlar. Birincil spermatositler mayoz I aşamasında seminifer tübülün bazal zarından ayrılarak bir sonraki aşamaya kadar Sertoli hücrelerine bağlanırlar. Mayoz I aşamasında kardeş olmayan iki homolog kromozom arasında 'krossing-over' meydana gelir ve en sonunda ikincil spermatositler oluşur. İkincil spermatositlerin mayoz II bölünmesi sonucu ile haploid kromozomlu spermatidler oluşur [17,23]. Üçüncü aşama ise spermiyogenezdir. Bu aşama morfogenezden oluşmaktadır ve hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidlerin sitoplazmaları kaybolur ve çoğu organel modifikasyona uğrar; çekirdek daha da yoğunlaşır ve eksantrik pozisyona geçer, Golgi aygıtı akrozoma dönüşür, sentriol ve çeşitli yapılardan sperm kuyruğu oluşur ve kuyruğun çevresinde hareketliliğini arttıran mitokondri sayısı artar. Kısaca spermiyogenez sonucunda spermatidlerden olgun, hareketli spermatozoalar oluşur. Bu süreçler önemli bir moleküler mekanizmayı gerektirir ve çok sayıda genlerin ekspresyonu söz konusudur [17,22].

Spermiasyon ise mekanizması tam olarak bilinmese de spermlerin artık Sertoli hücrelerinden ayrılıp ve tübül lümenlerine doğru harekete geçtiği bilinmektedir [22]. Spermatogenez şematik olarak Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 13: Spermatogenez *[22] numaralı kaynaktan Türkçeye çevrilmiştir.*

2.3.3. Testiste Endoplazmik Retikulum Stresi

Erkek üreme organı olan testis yoğun damarlı bir yapıdan oluşmaktadır. Sertoli hücrelerini, Leydig hücrelerini, peritubular miyoid hücrelerini ve germ hücrelerini içerir. Testiste, spermatogenez, testosteron ve diğer hormonların üretimi gerçekleşir. Testisteki bu işlevler farklı proteinlerin, moleküllerin etkileşimiyle ve sıkı bir kontrol mekanizmasıyla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada bir hata sonucunda bozulma ve başkalaşma olması testisin fonksiyonunda kusurlara yol açmaktadır. Testisin fonksiyonunda meydana gelen bozukluklar da infertiliteye neden olmaktadır.

Endoplazmik retikulum homeostazı birçok fizyolojik ve patolojik durumlardan kaynaklanan stres sonucunda olumsuz etkilenmektedir. Oluşan ERS sonucu UPR yolakları aktifleşmektedir. ERS'ye verilen cevap sonrası ise ya homeostaz dengelenmektedir ya da başka patolojik durumlara da yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır. ERS'nin testiküler fonksiyonla ilişkisinde bazı mekanizmalar tam olarak anlaşılmasa da çeşitli çalışmalarla ilişkileri araştırılmıştır. Kirli havaya maruz kalınması sonucu solunan kimyasallar, bazı toksinler, ilaçlar, ısı değişiklikleri, diyet, diyabet veya yaşlanma gibi çok çeşitli durumların ERS'yi indüklediği ve aynı zamanda testiküler disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir [24–27].

Erkek infertilitesinin nedenleri arasında kesin tanısı olan, en sık rastlanan durum, testiste vasküler dilatasyon ile gelişen varikoseldir. Varikosel modeli oluşturulan sıçan grubunda yapılan bir çalışmada varikoselli testiste ERS'nin aktif olduğu ve UPR yolaklarından IRE1/JNK/XBP1 yolağının rol oynadığı ve ERS ilişkili kaspaz-3 aracılı hücre ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir [73].

Tüketilen gıdaların, ilaçların ve, hava kaynaklı toksinlerin aşırı dozlarının ERS aracılı testiküler disfonksiyonla ilişkilerini araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, kanser tedavisinde kemoterapi ajanı olarak kullanılan busulfanın, testiküler hacmi azaltması ve azoospermiye neden olması gibi üreme sistemi üzerine toksik etkilerinin olduğu bilinmekle beraber moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. 2022'de yayımlanan bir çalışmada busulfana maruz bırakılan farelerde sperm sayısı, hareketlik ve normal morfoloji oranlarında düşüş olduğu, ve kan-testis bariyerinde hasarlanma olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte kan-testis bariyerindeki bozukluğun PERK-eIF2α yolağıyla indüklendiği gösterilmiştir [74].

Kadmiyum, bisfenol A, dietilstilbestrol ve kirli havadaki partiküllere maruz kalınması sonucu ile de testiste UPR yolaklarının özellikle IRE1a-XBP1 sinyalizasyonunun aktifleştiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir [24,25]. Spermatogenezin sürdürülebilmesi için testis sıcaklığının normal vücut sıcaklığından daha düşük olması gerekmektedir. Testis sıcaklığındaki artış, ERS'nin indüklenmesi ve spermatositlerin CHOP, kaspaz-3 ve fosforile edilmiş mitojenle aktive olan protein kinaz 9 (MAPK-9) aracılı apoptozuyla ilişkilendirilmiştir [24]. Yapılan bir başka çalışmada ise sıcaklık artışı ile gerçekleşen apoptozda ATF6 ve PERK proteinlerinin önemli rol aldığı ve bu durumu melatonin takviyesiyle önleyebildikleri gösterilmiştir [75]. 2019 ve 2021 yıllarında yayımlanan iki farklı fare modeli çalışmasında ise di-2-(etilheksil) ftalat (DEHP) maruziyeti durumunda ERS'nin N-kaderin ekspresyonunu azaltarak seminifer tübüllerin mesafesini arttırdığı, *IRE-1α, JNK* ve *CHOP* ekspresyonunun arttırdığı ve semifer tübüllerde germ hücre apoptozunu uyardığı gösterilmiştir [76,77]. Sitrinin ve mikrosistin-LR ise doğada bulunan ve üreme sistemini büyük ölçüde etkileyen toksinlerdir. Yapılan bir hücre kültürü çalışmasında mikrosistin-LR'nin ER fonksiyonunu bozarak Sertoli hücrelerinin apoptozuna sebep olduğu ve bir başka fare çalışmasında ise sitrinin maruziyetinin IRE1, ATF6, CHOP ve GRP78 proteinlerini arttırdığı ve kan-testis bariyerinin bozulmasıyla beraber androjen bozukluğuna, sperm kalitesinde azalma ve testiste histopatolojik hasara sebep olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, testis dokusunun karaciğerden sonra mikrosistin-LR'in ikin ikinci etki organı olduğu tespit edilmiştir [78,79].

2022'de yayımlanan fare modeli ve hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı bir araştırmada ise yaşlanmayla beraber ERS'nin arttığı ve Leydig hücrelerinde sirkadyen saat üzerine olumsuz etkisi yaptığı , steroidojenik genlerin ekspresyonunu ve testosteron sentezini baskıladığı elde edilmiştir [26].

B vitamini türevlerinden biri olan folik asit, her gün vücuda alınması gereken ve çeşitli hücresel aktivitelerde rol alan moleküldür. Kadınlarda hamilelik döneminde fetal nöral tüp gelişimde kritik önemiyle beraber erkek üreme sisteminde de etkilidir. Folik asit eksikliğinin erkeklerde fertiliteyi olumsuz olarak etkilediği birçok çalışmayla gösterilmiştir. 2021 yılında yayımlanan bir çalışmada in vivo ve in vitro olarak folik asit eksikliğinin Caveolin-1 (*Cav-1*) ekspresyonunu azaltarak ERS'ni indüklediği, PERK-eIF2α-ATF4-CHOP yolağı ile testiküler yapıya hasar verdiği ve sperm konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir [80].

Metabolik sendromun ERS ile ilişkisi daha önce gösterilmiştir. Metabolik sendrom patolojisinde bulunan parametrelerin testis fonksiyonuna etkisi ve ERS aracılı etki mekanizmaları üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Tip 2 diyabet, hiperkolesterolemi ve batı tarzı diyet, mekanizmaları tam olarak bilinmese de düşük testosteron seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir. 2018 yılında yayımlanan bir çalışmada yüksek kalorili beslenen sıçanlarda testosteron seviyeleri, testiküler yapısı, fonksiyonu, steroidojenik enzim ve ERS ilişkili genlerin seviyeleri analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda yüksek kalorili diyetin Leydig hücrelerinde kolesterol birikimine neden olduğu ve bununla beraber steroidojenik enzim ekspresyonunun çapraz ERS ve ATF6 yolağını indüklendiği, sonucunda da testosteron seviyesinde azalma olduğu saptanmıştır [27]. 2023'te yayımlanmış bir çalışmada ise yüksek yağlı diyet ile diyabetik model sıçanlar, glukoz seviyesini düzenleyen hormon olan glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) agonisti olan 'exenatide' (antidiyabetik ilaç) ile tedavi edilmiştir. Yapılan analizler sonucu GLP-1'in apoptoz, oksidatif stres ve ERS'ni düzenleyerek testiküler hücrelerde koruyucu etki sağlayabileceği gösterilmiştir [81]. Doymuş yağ asitlerinden biri olan palmitik asidin (PA) artmış seviyesi dislipidemi ile bağlantılıdır. PA'nın aynı zamanda mekanizması belirsiz olsa da testis için toksik etkisinin olduğu bilinmektedir. 2022'de yayımlanan bir çalışmada PA aracılı protein palmitoilasyonunun testis üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan insan serum örneklerinin, fare deneylerinin ve hücre kültürünün analizleri sonucunda PA'nın Sertoli hücrelerinde özellikle PERK yolağıyla ERS'ni indükleyerek yapısal bozukluğa ve kan-testis bariyerinde hasara sebep olduğunu ortaya koymuştur [82].

ERS sensörlerinin artmış seviyesinin her ne kadar testiküler disfonksiyona etkisi olsa da bu proteinlerden bazılarının susturulmuş ifadelerinin testis üzerinde negatif etkilerinin olduğu da gösterilmiştir. Örneğin farelerde *HSPA5 (GRP78)* geninin delesyonunda büyük ölçüde germ hücrelerinin kaybı ve seminifer tübüllerin dejenerasyonu gözlenmiştir. Bunun sonucunda ise spermatogenik arrest, testis atrofisi ve infertilite gelişmektedir [29]. 2021'de yayınlanan bir çalışmada ATF6'nın, spermatogenez için gerekli olan testis spesifik serin/treonin protein kinaz 4'ü (TSSK4) düzenlediği ve ATF6 eksikliğinde düşük *TSSK4* ekspresyonu sonucunada fertilitenin etkilenebileceği gösterilmiştir [28].

2.3.4. Erkek İnfertilitesinde Vitamin D'nin Etkisi

Güneş ışınlarının etkisi ile ve gıdalardan doğal olarak vücuda alınan VitD, özellikle karaciğer ve böbreklerde kalsiyum ve fosfor homeostazının önemli bir bileşenidir [33]. VitD'nin, karaciğer ve böbrek haricinde farklı dokuları da etkileyen Tip 1 diyabet, römatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlar üzerine etkisi farklı çalışmalarla gösterilmiştir [35]. Son zamanlarda ise VitD'nin erkek infertilisindeki rolü, testisteki fonksiyonu çeşitli in vitro, ex vivo, in vivo ve klinik çalışmalarla incelenmektedir. VDR'nin (özellikle spermatogonia, spermatosit ve Sertoli hücrelerinde) ve VitD'yi metabolize eden enzimlerin erkek üreme sisteminde ekspresyonunun saptanması VitD'nin önemini artırmakla beraber henüz tam olarak mekanizması anlaşılmamıştır [33,35]. VDR, insan sperminin post-akrozom bölgesi, boyun ve orta kısmında heterojen bir yapıda bulunmuştur. Sıçan testisinde ise RXR'nin alt tiplerinin ve diğer VitD metabolize eden enzimlerin Leydig hücrelerinde, Sertoli hücrelerinde ve germ hücrelerindeki ekspresyonu gösterilmiştir [35]. Yapılan çalışmalar sonucunda tartışmalı olmakla beraber VitD'nin testiste testosteron üretimiyle tutarsız bir ilişkisinin bulunduğu, estradiol üretimine etkisinin olmadığı ancak, sperm hareketliliğine, kapasitasyonuna ve akrozom reaksiyonuna etkisiyle semen kalitesine pozitif katkı sağladığı gösterilmiştir [33,35].

2015-2016 yılları arasında 117 Ürdünlü erkeğin katıldığı çalışmada VitD'nin etkisi üç grup altında incelenmiştir: kontrol, idiyopatik infertil ve sekonder infertil. Analizler sonucunda idiyopatik infertil bireylerde diğer iki gruba göre daha düşük VitD seviyesinin olduğu saptanmış ve bu hastalara VitD takviyesi uygulanmıştır. Tedavi sonucunda sperm hareketliliğinde artış gözlenmekle beraber konsantrasyonu ve morfolojisi ile anlamlı bir ilişki saptanmamıştır [83]. İran'da 2018-2019 arasında 119 infertil erkeğin katıldığı bir çalışmada VitD seviyesine göre üç farklı gruba ayırarak semen parametleri ve testosteron gibi hormonların seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda VitD seviyesinin semen hacmi, sperm morfolojisi, sayısı, hareketliliği ve testosteron parametreleri üzerine pozitif etkisinin olduğu gösterilmiştir [84]. 2023 yılında yayımlanan bir Mendeliyen randomizasyon çalışmasında hem Tip 2 diyabet, sigara, vücut kitle indeksi ve koroner arter hastalığı ilişkili SNP'ler hem de SNP'lerden bağımısız olarak VitD'nin erkek infertilitesi üzerine etkisi analiz edilmiştir.

Her iki sonuçta da artmış 25(OH)D seviyesinin erkek infertilitesindeki riskin azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [85].

Metabolik sendromun diyabet gibi parametrelerinin oluşturulduğu model hayvanlarda vitaminin D ve infertiliteyle olan ilişkisi de çalışılmıştır. Örneğin; 2016'da yayımlanan bir çalışmada diyabetik sıçan modelleri oluşturulmuş ve kontrol gruplarıyla beraber 12 haftalık süreçte iki farklı dozda vitamin D (1,25(OH)D3) takviyesi uygulanmıştır. Yapılan analizler sonucunda diyabet ile azalmış serumdaki testosteron oranı ile ilişkili olduğu ve spermatogenezin olumsuz etkilediği saptanmıştır. VitD'nin üreme ile ilişkili genleri ve testiküler androjenin sentezini yükselttiği ve hatta testiküler hücrelerde kaspaz yolağını inhibe ederek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [86]. 2019'da yayınlanan iki çalışmada ise diyabetik sıçanlarda VitD'nin artmış takviyesinin insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) aracılığıyla fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz/AKT serin/treonin kinaz (PI3K/AKT) yolağını aktive ederek testosteron seviyesini arttırdığı [87] ve PPAR-g / dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β) / NF-κB yolağı üzerinden testiküler patolojisinde düzeltici etkisinin olduğu bulunmuştur [88]. 2019'da yapılan bir başka çalışmada ise yüksek yağlı diyetin ve VitD eksikliğinin erkek infertilitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda yüksek yağlı diyetin adipoz dokuda ve sıçanların kilosunda artışa neden olduğu ve yüksek yağlı diyetle beslenen ve VitD negatif olan sıçanların sperm hareketliliğinde, mitokondriyal zar potansiyelinde ve fertilitesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir [89].

Kanser tedavisinde kullanılan sisplatine maruz kalan sıçanlarla yapılan bir çalışmada vitamin D3 takviyesiyle beraber antidiyabetik bir ilaç olan linagliptin tedavisi uygulanmıştır. İkili tedavi sonucunda sisplatin maruziyetinin testis dokusunda oluşturduğu ERS belirteçlerindeki, nükleer faktör kappa B alt birimi 1 (*NF-κB)* ve nitrik oksit sentazın indüklenebilir izoformu *(iNOS)* ekspresyonlarında artışı ve steroidojenik genlerin ekspresyonundaki düşüşü düzenlediği ve testosteron seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir [90]. 2021'de yayımlanan bir çalışmada ise oksidatif stres belirteçlerinden biri olan 4-hidroksinonenalin VitD eksikliği olan deneklerde daha yüksek bulunduğu ve sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisinde ters etkisi olduğu gösterilmiştir [91].

Vitamin D reseptörü geninin susturulması ("knock-out") ve silinmesi yöntemiyle de erkek infertilitesi üzerindeki etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, 2022'de yapılan bir çalışmada *VDR* knock-out erkek farelerde

lipid metabolizması ve androjen sentezine etkisi aracılığıyla sperm kalitesinde düşüşe ve testosteron sentezindeki genlerin ekspresyonunun azalmasına sonuç olarak erkek fertilitesinde ciddi bir hasara neden olduğu gösterilmiştir [92]. Bir başka çalışmada ise testiküler proteom analizinde *VDR* geni silinmiş farelerde androjen sentezi için gerekli ve önemli bir enzim olan hidroksi-delta-5-steroid dehidrojenaz, 3 beta- ve steroid delta-izomeraz 1 (*HSD3B1)* ekspresyonunun ciddi anlamda azaldığı bulunmuştur. Yapılan diğer deneyler sonucunda da *HSD3B1* geninin testis dokusunda yüksek seviyede ekspresyonunun olduğu, *HSD3B1*'in 5' bölgesinde bulunan VDRE'ye VDR'nin bağlanarak genin ekspresyonunu arttırdığını doğrulamışlar ve *VDR* ve *HSD3B1* artmış ekspresyonunun testosteron sentezini de arttırdığı gösterilmiştir [93].

VDR polimorfizmlerinin VitD seviyesine etkisi ve bununla beraber erkek infertilitesi üzerindeki etkilerini gösteren ve metabolik sendromla ilişkisini araştıran çalışmalar da bulunmaktadır [94,95].

2.4. TEZ ÇALIŞMASINDA ARAŞTIRILAN GENLER

2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ile İlişkili Genler

PERK, IRE1, ATF6, ATF4, GRP78 ve CHOP endoplazmik retikulum stresi meydana geldiğinde homeostazın dengelenmesi için aktifleşen UPR veya şiddetli durumda ise UPR bağımlı/bağımsız gerçekleşen hücre ölümü mekanizmalarında önemli proteinlerdir.

VDR ve ERp57, VitD aktivasyonu ile ilişkilendirilmiş önemli bir proteinlerdir.

GRP78: Kabul edilen ile *HSPA5*; ısı şok protein ailesi A (Hsp70) üyesi 5 *BIP*; *HEL-S-89n* olarak da bilinmektedir. Yapısal olarak iki bölgesi bulunmaktadır: ATP bağlayıcı bölge (ABD) ve substrat bağlayıcı bölge (SBD). Bu genin kodladığı protein moleküler şaperon olarak görev almaktadır ve normal şartlarda endoplazmik retikulumun lümeninde UPR sensörleri olan ATF6, IRE1 ve PERK proteinlerine bağlı, pasif şekilde bulunmaktadır. Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin arttığı

durumda yani stres oluştuğunda GRP78, UPR sensörlerinden ayrılır ve ERAD sistemi indüklenir. GRP78'in şaperon özelliği dışında başka fonksiyonları da bulunmaktadır. Örneğin, diğer ER proteinlerden az da olsa Ca^{+2} bağlama kapasitesiyle kalsiyum homeostazında aktif rol alır. Bunun yanı sıra çeşitli çalışmalarla bazı virüslerin konak hücreye girişinde ve enfeksiyonunda temel rol aldığı ve farelerle yapılan bir çalışmada ise embriyogenezde de rol aldığı gösterilmiştir. GRP78, ER lümeni harici hücre yüzeyinde (CS-GRP78) de konumlanmakta ve çeşitli hücre sinyalizasyonunda, proliferasyonunda, apoptoz ve inflamasyonda görev almaktadır. Aynı zamanda CS-GRP78 hücrelerde otoimmün yanıta sebep olmaktadır ve kanser gibi çeşitli patofizyolojik koşullarla ilişkilendirilmiştir [96,97]. GRP78, kalsiyum bağlayıcı proteinle ilişkili olarak insan ve sıçan spermlerinin plazma zarında, spermatositlerde, epididimal epitelyumda da saptanmıştır. *GRP78* polimorfizmleri ya da azalmış ekspresyon seviyeleri astenozoospermi (hareketli sperm oranında azalma) ile ilişkilendirilmiştir. Domuz spermleriyle yapılan bir çalışmada, *GRP78*'in inhibisyonu sonucunda PI3K/PDK1/AKT yolak ilişkili proteinlerin seviyelerinde değişime olduğu ve sperm hareketliliğini ve hücre canlılığını önemli oranda azalttığı gösterilmiştir [98]. Birçok fonksiyonu bulunan GRP78 proteininin embriyonik gelişimde, kanser hücrelerinin malignitesi ve metastaz üzerinde, kemoterapi ve ilaç dirençliliğindeki etkisiyle meme, akciğer gibi çeşitli kanser tiplerinde ve nörolojik hastalıklarda etkisi bulunmaktadır [99].

PERK: Ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 2 alfa kinaz 3 olarak adlandırılan (*EIF2AK3*) bu gen 21 ekzondan oluşmaktadır. 541 türde ortolog geni bulunmaktadır. *PERK* geninden kodlanan protein, translasyonun başlamasında ve baskılanmasında görev almaktadır. ER yüzeyinde bulunan PERK, üç UPR sensöründen biridir. UPR mekanizması ile ERS baskılanarak homeostazın dengelenmesi sağlanır ya da ERS sonucunda hücre ölümüne giden süreç başlatılmış olur. GRP78'in ayrılması sonucunda aktifleşen PERK, ökaryotik başlangıç faktörü 2'nin α alt-ünitesini (eIF2α) fosforile eder. Bu fosforilasyon ile aktifleşmiş olan yolağın devamında ATF4 gibi ilgili genleri translasyonel seviyede düzenler. ATF4 ise sonrasında *CHOP* gibi proapoptotik genlerin ekspresyonunu regüle eder. Nörodejeneratif hastalıklarda, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığında, farklı kanser tiplerinde *HIV-1* ekspresyonu üzerine etkileri gösterilmiştir. Bu gendeki mutasyonlar neonatal diyabet tanısıyla takibi yapılan Wolcott-Rallison sendromuyla da ilişkilidir [100,101].

IRE1: Transmembran bir protein kinaz olan inositol gerektiren enzim 1'i kodlayan bu gen kabul edilen adıyla *ERN1* (endoplazmik retikulumdan çekirdeğe sinyalleşme 1), *IRE1P; IRE1a; hIRE1p* olarak da bilinmektedir. IRE1 proteini, endoplazmik retikulum, mitokondri, nükleer iç zar ve sitoplazmada konumlanmıştır [102]. Ökaryotlarda bulunan en yüksek oranda korunmuş UPR sensörü olan IRE1, luminal ER stres algılama bölgesi ve kinaz ve RNA endonükleaz (RNaz) aktivitelerine sahip sitoplazmik bölgesi olmak üzere iki domainden oluşmaktadır. IRE1, ERS meydana geldiğinde stres şiddetine bağlı olarak üç farklı sinyal yolağı üzerinden aktif olur. GRP78'in ayrılmasıyla ilk olarak otofosforilasyon sonrası çeşitli biyolojik yolaklarda rol alan XBP1'in translasyonu sırasında 26 nükleotidlik farkla işler ve bu yolakla homeostazın düzenlenmesi için ilgili genlerin ekspresyonları regüle edilir. Diğer yolak ise IRE1 bağımlı bozunma mekanizmasının aktifleşmesidir. Bu mekanizma, stresin azaltılmasında ER'ye giren proteinlerin sayısının azaltarak destek olduğu gibi mRNA'ların ya da miRNA'ların rastgele yıkımını da indükleyebilmektedir. Aktif olduğu 3. mekanizmada ise TRAF2'ye bağlanarak JNK sinyali ile apoptoz indüklenmektedir [103]. IRE1-XBP1 yolağının obezite, metabolik sendrom, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar ilişkisi bulunmuştur. *XBP1* seviyesinin artması, azalması ya da XBP1'in indüklediği MAPK, JNK, JUN gibi yolakların aktivasyonu sonucu farklı bir çok hastalığın patogenezinde rol almaktadır aynı zamanda bu hastalıkların tedavisi için önemli bir faktör olmaktadır [101,103].

ATF6: Bir transmembran protein olan, aktive edici transkripsiyon faktörü 6'yı kodlayan bu gen *ACHM7; ATF6A; ATP6alfa* olarak da bilinmektedir ve bu genin kodladığı protein UPR sensörlerinden sonuncusudur. Endoplazmik retikulumda, golgi aygıtında, nükleusta ve sitozolde bulunur [104]. ATF6 diğer iki UPR sensöründen farklı olarak GRP78'in ayrılmasından sonra fosforilasyon gerçekleşmez. Yapısında bulunan disülfid bağları azalarak iki bölge şeklinde işlenmek üzere Golgi aygıtına doğru hareket eder. Burada parçalanarak bölünmüş ATF6 nükleusa gider ve daha çok ERS'yi baskılayacak genlerin ekspresyonunu indükler [101]. ATF6 bu fonksiyonlarıyla ilişkili olarak çeşitli hastalıklarda çalışılmıştır. Örneğin; ATF6, ERS ile ilişkili olarak miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarını da azalttığı gösterilmiştir [105]. *ATF6*'daki polimorfizmler diyabet ve artmış plazma kolesterol seviyesiyle ilişkilendirilmiştir [104].

ATF4: CREB benzeri proteinlerin de dahil olduğu DNA bağlayıcı protein ailesinden biri olan aktive edici transkripsiyon faktörü 4'ü kodlayan bu gen *CREB2; TXREB; CREB-2; TAXREB67* olarak da bilinmektedir. ATF4, lösin fermuar bölgesini bulundurur ve böylelikle DNA bağlanmasını gerçekleştirir [106]. Aktifleşen UPR mekanizmasında PERK'in aktivasyonu ile regüle olan ATF4 birçok farklı geni regüle ederek çeşitli biyolojik yolaklarda aktif olmaktadır. Temelde görevi ERS durumunda yanlış katlanmış proteinlerin giderilmesi için otofajiyi indüklemek olan ATF4 farklı patolojik durumlarla da ilişkilendirilmiştir. Örneğin: matriselüler glikoprotein ailesinden biri olan trombospondin 1 (Thbs1) aracılı PERK-ATF4 aktivasyonunu ile indüklenmiş otofajinin stresli bir kalpte kardiyak atrofi üzerindeki etkisiyle önemli bir düzenleyici olduğu gösterilmiştir [107]. Başka birbiriyle ilişkili yapılan çalışmalarda ise *ATF4*'ün knock-out durumunda alkolik steatozda, lipojenik genlerin ekspresyonunu inhibe ederek alkolik steatozu hafiflettiğini, mitokondriyal biyogenezi düzenlediği, alkole bağlı oksidatif stresi ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir [108].

CHOP: Kabul edilen sembolü ile *DDIT3* (DNA hasarı indükleyici transkript 3) *CEBPZ, CHOP10, CHOP-10, GADD153, AltDDIT3, C/EBPzeta* olarak da bilinmektedir. C/EBP ailesine üye olan bu transkript faktörü, CHOP (C/EBP homolog protein) nükleusta, sitoplazmada ve geç endozomlarda bulunmaktadır [109]. Bu genin kodladığı protein N-terminal transkripsiyonel aktivasyon ve C-terminal bazik-lösin fermuar bölgesi olmak üzere iki domainden oluşmaktadır ve bZIP bölgesi CHOP tarafından indüklenmiş apoptozda önemli rol oynamaktadır. Normal koşullarda düşük seviyede bulunan CHOP, ERS koşulları sırasında PERK/ATF4, IRE1 ve ATF6/XBP1 yolakları tarafından indüklenmektedir. Şiddetli ERS durumunda mitokondri bağımlı yolak, ölüm reseptörü yolağı, DNA hasar proteiniyle interaksiyonu, ER oksiredüktaz 1 alfa (*ERO1α*) ekspresyonunu arttırarak ROS tepkimelerini başlatılması üzerinden ve ya hücre döngüsünü durdurarak apoptoz ve otofajide farklı içsel ve dışsal yolaklarla hücre ölümüne sebep olmaktadır. CHOP birçok farklı fonksiyondaki genlerin ekspresyonunu regüle etmektedir. Anti-apoptotik genleri baskılarken pro-apoptotik genleri indükleyerek apoptozu başlatmaktadır. ERS kaynaklı apoptozda kilit bir protein olan CHOP klinik olarak da önem taşımaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda aktif olduğu yolakların tanımlanması ilgili durumun tedavisine katkı sağlayacaktır. Tam olarak işlevsel amacı bilinmese de mikrobiyal, bakteriyel ve virüs enfeksiyonlarında, bazı kanserlerde, nörolojik hastalıklarda ve metabolik bozukluklarda önemli fonksiyonları

gösterilmiştir [110]. 2019'da yayınlanan bir çalışmada yüksek glukoz seviyesinin *CHOP* ekspresyonunu arttırdığı ve *PGC-1α*'nın ekspresyonunu inhibe ettiğini ve *CHOP*'un susturulduğu durumda ise artan *PGC-1α* seviyesi ile pankreas β hücrelerinde apoptozun azaldığı gösterilmiştir [111].

2.4.2. Vitamin D ile İlişkili Genler

VDR: Vitamin D3 reseptör geni *NR1I1 ve PPP1R163* olarak da bilinmektedir ve ligand ile indüklenebilir transkripsiyon faktörlerinin nükleer hormon reseptör süper ailesinin üyesi olan bir proteini kodlamaktadır. İnce bağırsak, duodenum ve kolonda yüksek miktarda eksprese olmasının yanında 14 farklı dokuda da ekspresyonu gösterilmiştir [112]. Karaciğer ve böbrekteki mekanizmalardan sonra aktif formuna dönüşen VitD'nin, VDR ile interaksiyonu sonucu ilgili dokulardaki fonksiyonunu daha etkin gösterdiği bilinmektedir. Bağışıklık sistemleri, otoimmün hastalıklar ve çeşitli patofizyolojik durumlarda çeşitli genleri regüle ederek iyileştirici etkisi ortaya konulmuştur [113]. 2021'de yayınlanan bir çalışmada *VDR* knockout farelerde hepatik iskemi ve reperfüzyon (IR) hasarında VDR ve ERS ilişkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, VDR'nin ERS kaynaklı otofajiyi düzenleyerek karaciğer hasarının azalttığı inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [114]. 2023'de yayınlanan prostat kanseri üzerine olan bir çalışmada ise VDR'nin aktivitesine bakılmıştır. VDR'nin birçok kanser türünde ekspresyon seviyesinin azaldığının bilinmesinin üzere bu çalışmada VDR sinyalinin androjenik sinyali negatif olarak düzenlediği ve VitD'nin *PERK* ve *IRE1* ekspresyon seviyesini negatif olarak düzenlediğini bulmuşlardır [115].

ERp57: Endoplazmik retikulum yerleşik protein 57 kabul edilen sembolüyle *PDIA3, P58, ER60, ERp57, ERp60, ERp61, GRP57, GRP58, PI-PLC, HsT17083, HEL-S-269 ve HEL-S-93n* olarak da bilinmektedir. Protein disülfid izomerazlar ailesinden olan, disülfid bağlarıyla glikoproteinlerin katlanmasını sağlayan bu endoplazmik retikulum proteini şaperon olarak da görev yapmaktadır [116]. Sonrasında ise VitD'nin hızlı aktivasyonunda 1α,25(OH)2D3 için hücre yüzey reseptörü gibi işlev gördüğü bulunmuştur. Bunun yanı sıra beyinde *VDR* az eksprese olurken *ERp57*'nin *VDR*'den daha fazla eksprese olması VitD aktivasyonu için tek regülatör olacağını bile düşündürtmektedir [117]. ERp57 aynı zamanda kalsiyum, sodyum ve klorür alımını

düzenlemekte, apoptotik sinyalizasyona da katılmakta ve monosit/makrofaj farklılaşmasında rolü bulunmaktadır [118]. Nükleus, endoplazmik retikulum, mitokondri ve hücre yüzeyinde bulunan ERp57 çeşitli fizyolojik durumda aktiftir hatta ERp57, sperm başında da bulunmuştur ve döllenme için gerekli olacağı düşünülmektedir. Nörolojik hastalıklar, kanser ve bulaşıcı hastalıklar gibi patolojik durumların tanısında ve tedavisinde inhibitör yada aktivatör olarak önemli bir faktördür [117].

2.4.3. Testis Fonksiyonu ile İlgili Seçilen Gen

CYP19A1: Sitokrom P450 aile 19 alt aile A üye 1 adlı bu gen *ARO, ARO1, CPV1, CYAR, CYP19, CYPXIX ve P-450AROM* olarak da bilinmektedir ve aromataz adlı enzimi kodlamaktadır. Bu enzim androjenleri östrojene çevirmektedir (aromatizasyon). Aromatoz, endoplazmik retikulumda lokalizedir [119]. Genin promotör bölgesindeki farklılıklar sayesinde dokuya özgü transkriptleri bulunmaktadır ve aromataz, kadın ve erkekteki gonadların haricinde plasenta, beyin, karaciğer, kas, prostat, meme gibi bir çok dokuda bulunmaktadır. Östrojen, kadın üreme sisteminin temelinde ve regülasyonu için önemlidir ve oositlerin gelişiminde hücrelerde aromataz ekspresyonu gerçekleşmektedir. Erkeklerde Leydig hücrelerinde üretilen androjenler ise Sertoli hücrelerinde eksprese edilen aromataz aracılığıyla östrojene dönüştürülmektedir. Testisteki aromataz ekspresyonunun spermatogenezde önemli endokrin etkileri bulunmaktadır. Kemik homeostazı, immün homeostazı, apoptoza karşı antagonist özellik ve glukogenezdeki etkileri gibi farklı biyolojik mekanizmada etkili olan östrojen/aromataz ilişkisindeki dengesizlik, artmış veya azalmış seviyelerde infertilite, kanser, nörolojik hastalıklar ve metabolik hastalıklar gibi patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir [120].

Hipotalamus tarafından üretilen luteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) testiste geri dönüşümlü bir mekanizmaya katılmaktadırlar. FSH Sertoli hücreleri için gereklidir, LH ise Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretimini sağlar ve testosteron aromataz aracılığıyla östrojenin predominant formu olan estradiole dönüştürülür. Artmış testosteron ve östrojen ise FSH ve LH hormonlarının üretimini azaltmaktadır [121]. Erektil fonksiyon, libido ve spermatogenez için önemli olan östrojen ve testosteronun bu dönüşümlü mekanizmasının dengesinin bozulması

infertiliteyle sonuçlanabilmektedir [122]. Tıkanıklığa bağlı olmayan (non-obstrüktif) azoospermi ve oligozospermide artmış aromataz seviyesi sebebiyle düşük testosteron:östrojen seviyesi görülmüştür. Yağlı dokudaki artmış aromataz seviyesi ise testosteron seviyesinin azalıp östrojen seviyesinin artmasına sebep olması dolayısıyla obezite ve erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi de kuvvetlendirmektedir. Bu nedenlerle ve de yaşlanmayla beraber azalmış testosteron seviyesinin varlığında tedavi olarak ya da tedaviye ek olarak aromataz inhibitörleri kullanılmaktadır [121]. Ancak, tedavi olarak kullanılsa da aromatazın kemik homeostazında etkin olması, osteoporozu tetiklemesi gibi dezavantajları olabileceği düşünülmektedir.

Aromataz inhibitörlerinin çoğunlukla kullanıldığı patolojik durum ise meme kanseridir. 2021'de yayınlanan bir çalışmada iyonize radyasyon tedavisi ile meme kanser hücrelerinde endoplazmik retikulum stresinin indüklenerek *CYP19A1* geninin ekspresyonunu azalttığı böylelikle de estradiol üretimininin azalmasıyla kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini göstermişlerdir [123].

2.4.2 Kontrol Geni

ACTB: Aktin beta geni yüksek seviyede korunmuş aktin proteinlerinden birini kodlamaktadır. Bu protein hücre yapısı, hareketi ve hücre içi sinyalizasyonda önemlidir [124]. Bir türün tüm doku ve hücrelerinde stabil ekspresyon seviyesi olan ve bu nedenle "housekeeping" gen olarak adlandırılan genler kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) veya diğer farklı yöntemlerde endojen kontrol olarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşım ile gen ekspresyon deneylerinde araştırılan genlerin ekspresyon seviyelerinin normalizasyonu yapılmakta ve relatif kantitasyon değerleri hesaplanabilmektedir [125]. Bu tez çalışması kapsamında *ACTB* gen ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yönteminde normalizasyon amacı ile kullanıldı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Tez çalışmasında kullanılan testis dokuları daha önce yürütülmüş olan "Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Vitamin D'nin Aterogenezle İlişkili Aday Genlerin İfade Düzeyine Etkisi" başlıklı projeye ait arşiv dokulardır [126]. Belirtilen proje için deney hayvanlarının temini ve MetS sıçan modelinin oluşturulması İstanbul Mehmet Akif Ersoy Deneysel Araştırma Geliştirme ve Eğitim Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Testis dokuları belirtilen çalışma kapsamında sakrifiye edilen sıçanlardan diseksiyon sonrasında sıvı azotta şok dondurulmuş ve genetik analizlere kadar -80°C'de uygun koşullarda saklanmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan testis dokuları için İstanbul Mehmet Akif Ersoy Deneysel Araştırma Geliştirme ve Eğitim Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2022/2 sayılı kararla HADYEK iznine gerek olmadığı belirtilmiştir.

3.2. Gereçler

3.2.1. Cihazlar

+4°C soğutucu (Arçelik)

-20°C soğutucu (Arçelik)

-80°C soğutucu (Thermo, Haier Biomedical)

Homojenitör (IKA, T 10 Ultra-Turrax)

Soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific)

Masa üstü santrifüj (Eppendorf)

Vorteks (Elektro-Mag M16)

Spin cihazı (Biosan, Combi-Spin, FVL-2400N)

Spektrofotometre – NanoDrop (Thermo Scientific)

Laminar akışlı güvenlik kabini (RATEK A.Ş.)

Isı döngü cihazı (T100, BioRad)

Gerçek zamanlı PCR cihazı (LightCycler 480, Roche)

3.2.2. Kitler

iScript tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentez Kiti (Bio-Rad)

5x iScript Reaksiyon Çözeltisi

iScript Revers Transkriptaz

Nükleazsız su (Qiagen)

iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)

2x iTaq Univer SYBR Green Supermix (antikor aracılı hot-start iTaq DNA polimeraz, deoksinükleotitfosfatlar (dNTP), magnezyum klorür (MgCl2), SYBR Green I boya, enhancer, stabilizatör, pasif referans boyalar (ROX ve floresans içeren))

Primer 50nM, 500baz

3.2.3. Kimyasallar

Trizol (Thermo Fisher)

Kloroform (Merck)

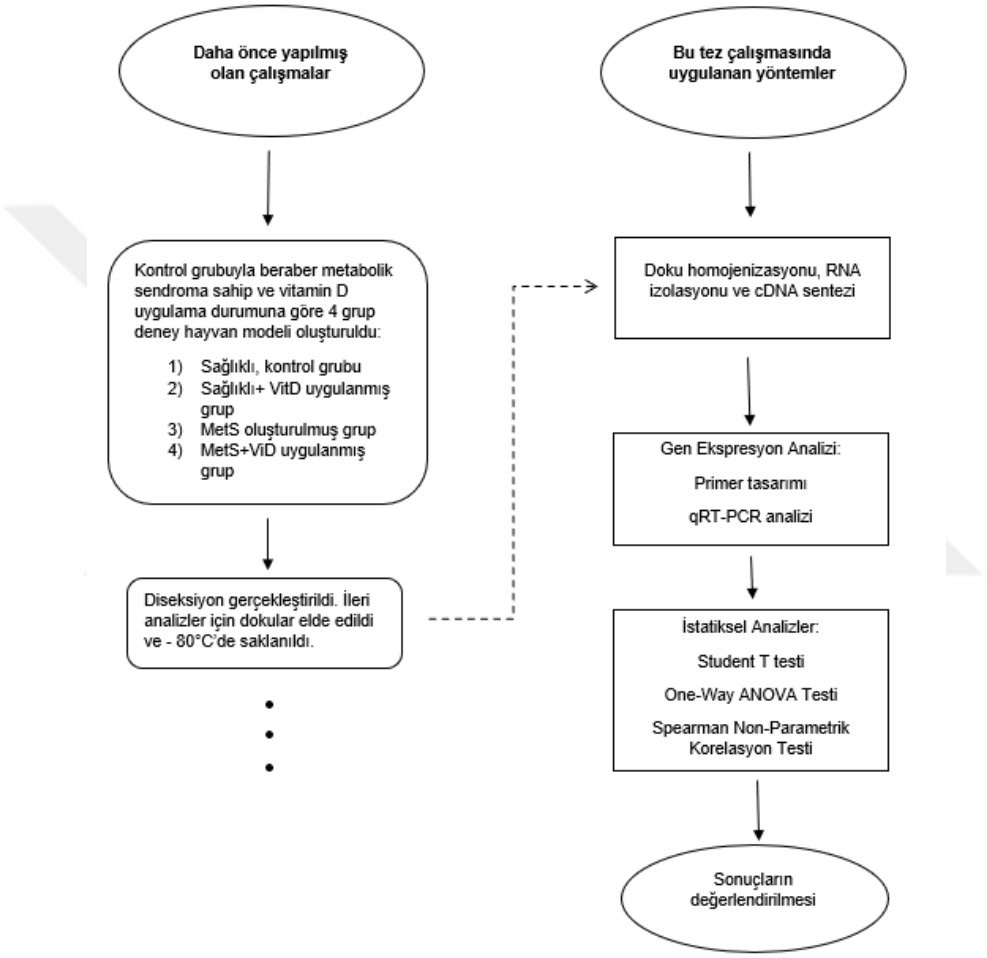
%100 İsopropanol (Sigma)

%75 Etanol (Merck)

GTC- Guanidinyum tiyosiyanat (4 M)

3.3. Yöntemler

Tez çalışmasındaki deneysel süreçler İ.Ü. İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan yöntem akış şeması Şekil 14'te özetlenmiştir.

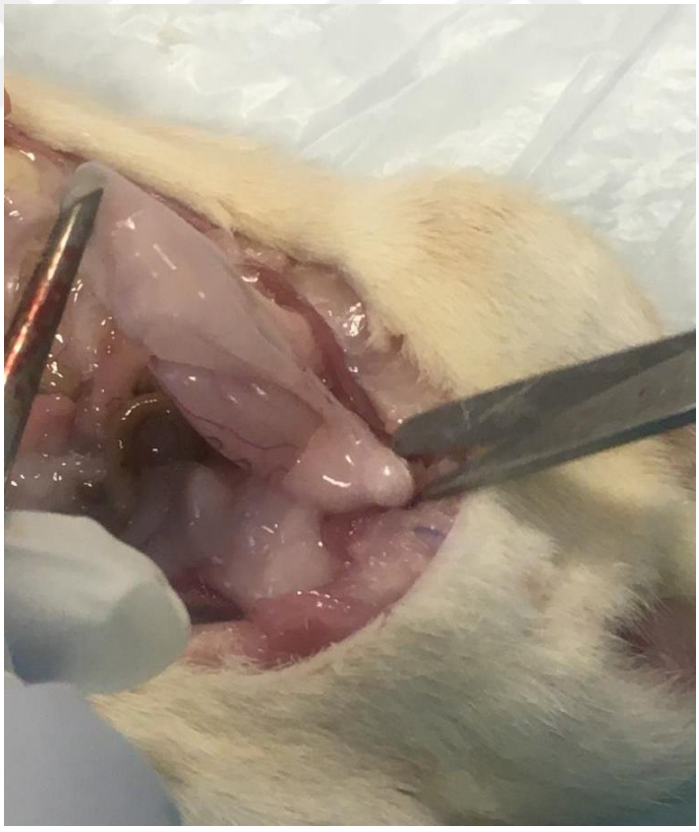


Şekil 14: Tez çalışmasında kullanılan yöntem akış şeması

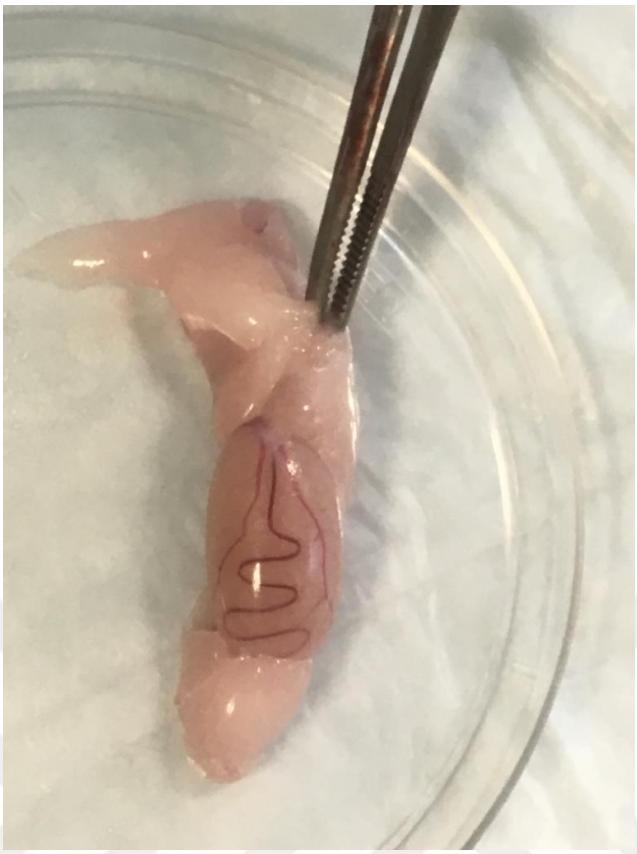
3.3.1. Örneklerin eldesi

Daha önceki çalışma [126] kapsamında MetS deney hayvanı modelinin oluşturulması amacı ile 32 adet 12 haftalık 300-350 gr ağırlığında Sprague-Dawley ırkı erkek sıçanlar

kullanılmıştır. MetS sıçan modeli, özel diyet ile indüklenerek (15 hafta boyunca %10'luk fruktozlu su ve %17 yağ ve %17 fruktoz içeren yem ile beslenme) oluşturulmuştur. Sıçanlar dört gruba ayrılmıştır ve her gruba sekiz sıçan dahil edilmiştir: 1) metabolik sendrom oluşturulan sıçan grubu (MS), 2) metabolik sendrom oluşturulduktan sonra VitD uygulanan grup (MSD), 3) sadece VitD uygulanan grup (SKD) ve 4) uygulama yapılmayan kontrol grubu (SK). Deney, 15 haftalık takip sonrasında sonlandırılmıştır. Vitamin D ilgili gruplardaki sıçanlara 3. haftadan itibaren (170 IU/ hafta, oral) 12 hafta boyunca uygulanmıştır. Sıçanların haftalık bel ve deri kalınlıkları ve diseksiyon öncesi kulaktan açlık kan glukozu ölçümleri yapılmıştır. Uygulanan özel diyet ve yapılan ölçümler sonucunda modelin oluştuğu gösterilmiştir. Diseksiyonu gerçekleştirilen sıçanların dokuları alınarak sıvı azot ile şok dondurulmuştur ve genetik analizler yapılana kadar -80°C'de uygun koşullarda saklanmıştır.



Şekil 15: Sıçanlardan testis dokusunun diseksiyonu



Şekil 16: Disekte edilen testis dokusu

3.3.2. RNA'ların elde edilmesi

Eppendorf tüpler içerinde -80°C'de saklanmış olan testis dokuları buz üzerinde çözüldükten sonra her örneğe 1 ml trizol eklendi. Homojenizatör kullanılarak buz üzerinde homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.

- Her bir örneğin homojenizasyonu sonrasında kontaminasyonu önlemek amacıyla homojenizatör ucu sırasıyla GTC solüsyonu, sodyum hidroksit (NaOH) ve DEPC'li temiz su ile yıkandı.

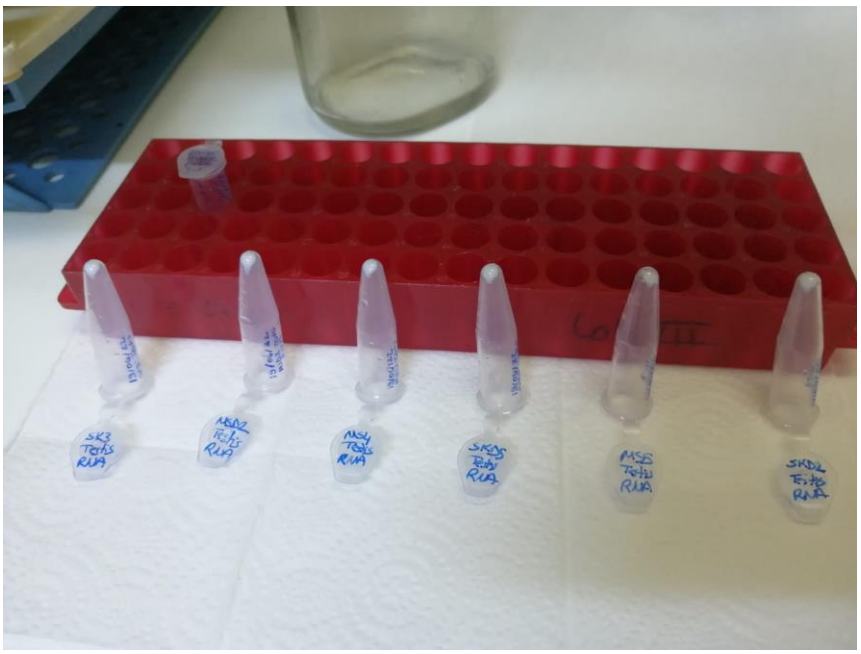
Homojenize edilmiş dokulardan total RNA izolasyonu aşağıdaki gibi yapıldı:

- Trizol ile muamele edilmiş olan homojenatlara 200 µl kloroform eklenip 15 saniye vorteks yapıldı.

- 12.000 g'de 20 dakika +4°C'de santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı faz yeni tüplere alındı ve üzerlerine 550 µl +4°C'de soğutulmuş %100 isopropanol eklenerek pipetlenerek karıştırıldı.
- -20 °C'de 2-18 saat inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonunda 12.000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı.
- Üst sıvı faz atıldı ve 1 ml +4°C'de bulunan soğuk %75 etanol eklendi.

9.000 g'de 5 dakika 4°C'de santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı faz atıldı ve %75'lik etanol ile pipetlenerek yıkama yapıldı.

- Tüpler ters çevrilerek pellet oda ısısında kurumaya bırakıldı. Ardından, pelletler 100 µl, RNaz-içermeyen su ile sulandırılarak buz üzerine alındı.
- İzole edilen total RNA örneklerinin yoğunlukları ve kaliteleri NanoDrop cihazı kullanılarak 260 nm ve 280 nm ultraviyole dalga boylarındaki absorbsiyon değerleri ölçülerek belirlendi.
- Örnekler, gen ekspresyon analizi yapılana kadar -80°C'de saklandı.



Şekil 17: Total RNA izolasyonu sırasında pelletlerin kurutulması aşaması

3.3.3. cDNA Sentezi

Tez projesinin bütçesinden temin edilen iScript cDNA (Bio-Rad) sentez kitinin protokolü uygulanarak ve 1 µg total RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı.

- 4 µl 5X reaksiyon karışımı, 1 µl iScript ters (reverse) transkriptaz ve hesaplanan hacimlerde nükleazsız su ve total RNA'lar toplam hacim 20 µl olacak şekilde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tüplerine eklendi (Tablo 4).

Tablo 4: cDNA sentezi reaksiyon içeriği

Malzemeler	Hacim
5X reaksiyon karışımı	4 µl
iScript ters (reverse) transkriptaz	1 µl
Nükleazsız su	15-x µl
Total RNA	1 µg (x µl)
Toplam	20 µl

- Reaksiyon karışımı termal döngü cihazında inkübe edildi. Reaksiyon koşulları aşağıdaki Tablo 5'teki gibidir:

Tablo 5: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Süre	Isı
5 dakika	25 ℃
20 dakika	46 ℃
1 dakika	95 ℃
∞	4 ℃

- Elde edilen cDNA'lar bir qRT-PCR analizine kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 18: cDNA örnekleri

3.3.4. Primer Tasarımı

Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi yapılacak olan *Vdr* geni ve ERS yolağında bulunan 7 gen (*ERp57, Grp78, Chop, Perk, Ire1, Atf6, Atf4*), testiküler fonksiyon ile ilgili *Cyp19a1* geni ve kontrol geni olarak beta aktin (*Actb*) için genlere özgü primer tasarımları manuel olarak gerçekleştirildi. Primer tasarımında sırasıyla aşağıdaki internet erişimli araçlar kullanıldı:

- Her bir genin gen dizisi bilgisi gen bankası, nükleotid veritabanları ve çeşitli analiz ve karşılaştırma araçları içeren National Center for Biotechnology Information (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) ve ENSEMBL (https://www.ensembl.org/index.html) veritabanları kullanılarak araştırıldı.

- Araştırılan genin dizisine özgü primer çiftleri manuel olarak tasarlandı. Primer tasarımlarında mümkün olduğu koşulda ekzon-ekzon birleşimini içermesi gözetildi. Primer dizilerinin özgüllüğü Blast programı (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) aracılığıyla ile kontrol edildi.
- Tasarlanan primerlerin GC içeriği (%50-55) ve çözülme sıcaklıkları ("Temperature of melting";Tm=57-58°C) Oligoanalyzer 3.0 programı (https://eu.idtdna.com/calc/analyzer) ile kontrol edildi. Aynı programın algoritması kullanılarak olası saç ilmeği (hairpin), palindrom yapıları ve primer dimer oluşumları kontrol edildi.
- ENSEMBL veritabanı kullanılarak primerlerin tasarlandığı bölgedeki olası SNP'lerin varlığı araştırıldı.

3.3.5. qRT-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Analizi

Bu tez çalışmasında araştırılan, *Perk, Grp78, Atf6, Atf4, Ire1, Chop, Erp57, Vdr, Cyp19a1* ve kontrol geni olarak *Actb* genlerine özel tasarlanan primerlerle iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) kitinin protokolüne uygun olarak gen ekspresyon analizi yapıldı.

- Her bir gen için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

iTaq Universal SYBR Green Supermix	5 ul
Primer çifti (500nM/ul)	1 ul
Nükleazsız su	3 ul

- Her örnek için 1 µl cDNA (1:10) kullanıldı ve triplike çalışıldı.

- Mikroplate tasarım örneği:

	1/Actb	2/Perk	3/Chop	4/Ire	5/Atf6	6/Atf4	7/Actb	8/Perk	9/Chop	10/Ire	11/Atf6	12/Atf4
A	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2
B	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2
C	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2	Örnek 2
D	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4
E	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4
F	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4	Örnek 4
G	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5
H	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Örnek 5	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

Şekil 19: Mikroplate tasarım örneği

- 9000 g'de 1,5 dakika santrifüj yaptıktan sonra Light Cycler 480 (Roche) cihazına yerleştirilip program başlatıldı.
- PCR Koşulları:

  Preinkübasyon: 2 dakika > 95 ℃

  Amplifikasyon: 10 saniye > 95 ℃
  40 saniye > 60 ℃
  5 saniye > 60 ℃
  } 45 döngü

  Çözülme eğrisi: 5 saniye > 95 ℃
  1 dakika > 65 ℃

  Soğuma: 10 saniye > 40 ℃

- PCR progamı bittikten sonra çözülme eğrileri ("melting curve, MC") ve çözülme sıcaklığı (TM) ve eşik döngüsü ('Threshold cycle", Ct değerleri) analiz edildi ve kaydedildi.

3.3.6. Gen Ekspresyon Datasının Analizi ve İstatiksel Analizler

qRT-PCR sonucunda elde edilen Ct değerleri ve kontrol genin Ct değerlerinin ortalamaları alındı. Her genin ortCt değerinden kontrol genin ortCt değeri çıkarılarak ΔCt değerleri hesaplandı. MS ve MSD gruplarında bakılan her genin ΔCt değerlerinden SK grubundaki bakılan genlerin ΔCt değerleri çıkarılarak ΔΔCt değerleri hesaplandı

(normalizasyon). Ardından, çalışma grupları normal kontrol ve VitD kontrol grupları ile karşılaştırılarak (kalibrasyon) relatif kantitasyon (RQ) değerleri hesaplandı.

ΔCt = OrtCt(gen(x)) – OrtCt(kontrol gen(actb))

ΔΔCt = ΔCt (MS(gen(x))) - ΔCt (SK(gen(x)))

Relatif Kantitasyon = 2 üzeri -ΔΔCT

İstatistiksel analiz SPSS programı ver.29 (IBM Corp., AMAOK, NY) kullanılarak gerçekleştirildi ve gruplar arası karşılaştırmalar T testi, one-way ANOVA ve Spearman non-parametrik korelasyon analizi ile yapıldı. Analizler sonucunda $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

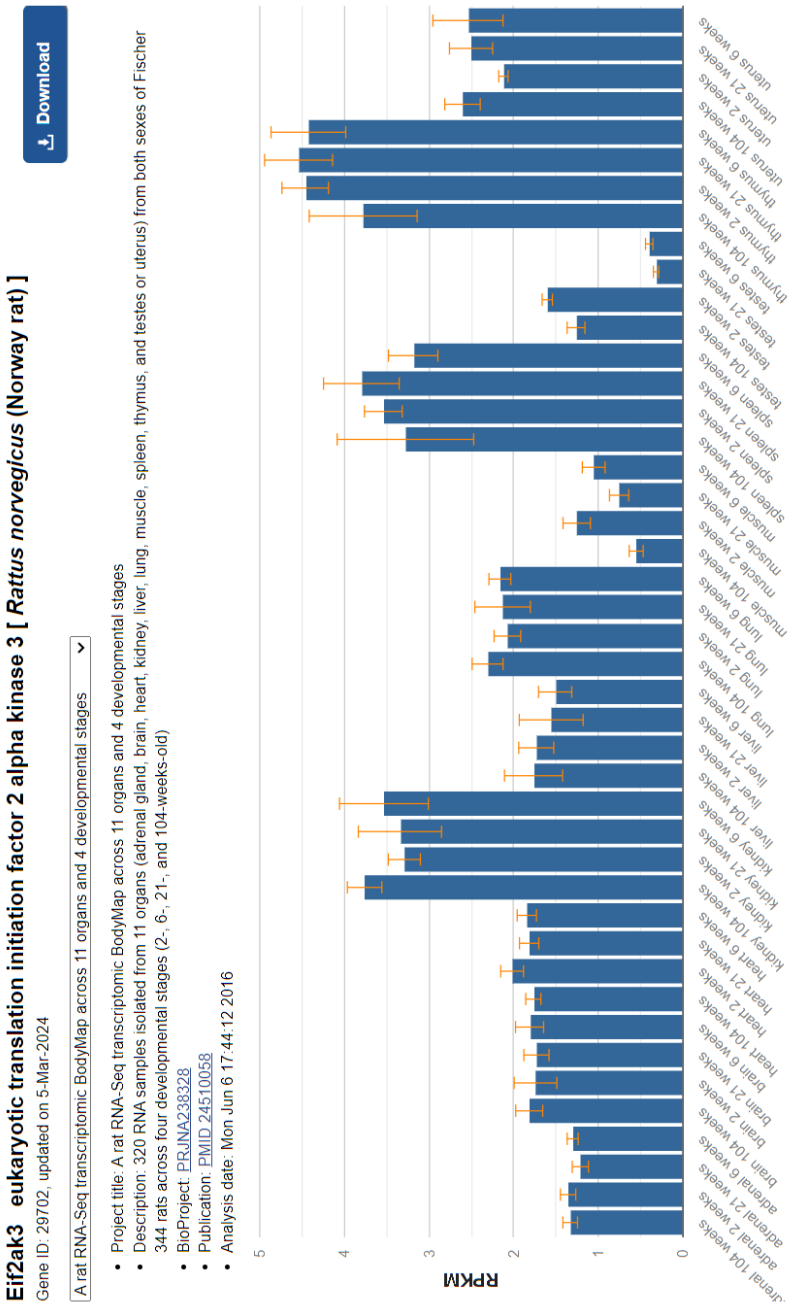
4. BULGULAR

Daha önceki çalışmalar kapsamında [126] MetS sıçan modeli oluşturulmuş ve bu tez çalışmasında ise sıçan testiküler dokularında MetS ile indüklenen ERS hasarında VitD'nin etksinin incelenmesi amacı ile seçilen genlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Çalışma grupları: SK, SKD, MS ve MSD. Endoplazmik retikulum stresi yolağında yer alan *Perk, Ire1, Atf6, Atf4* ve *Chop;* VitD ile ilişki olan *Vdr ve Erp57;* testis fonksiyonunun yorumlanabilmesi amacı ile *Cyp19a1* genlerinin ekspresyon analizi yapıldı.

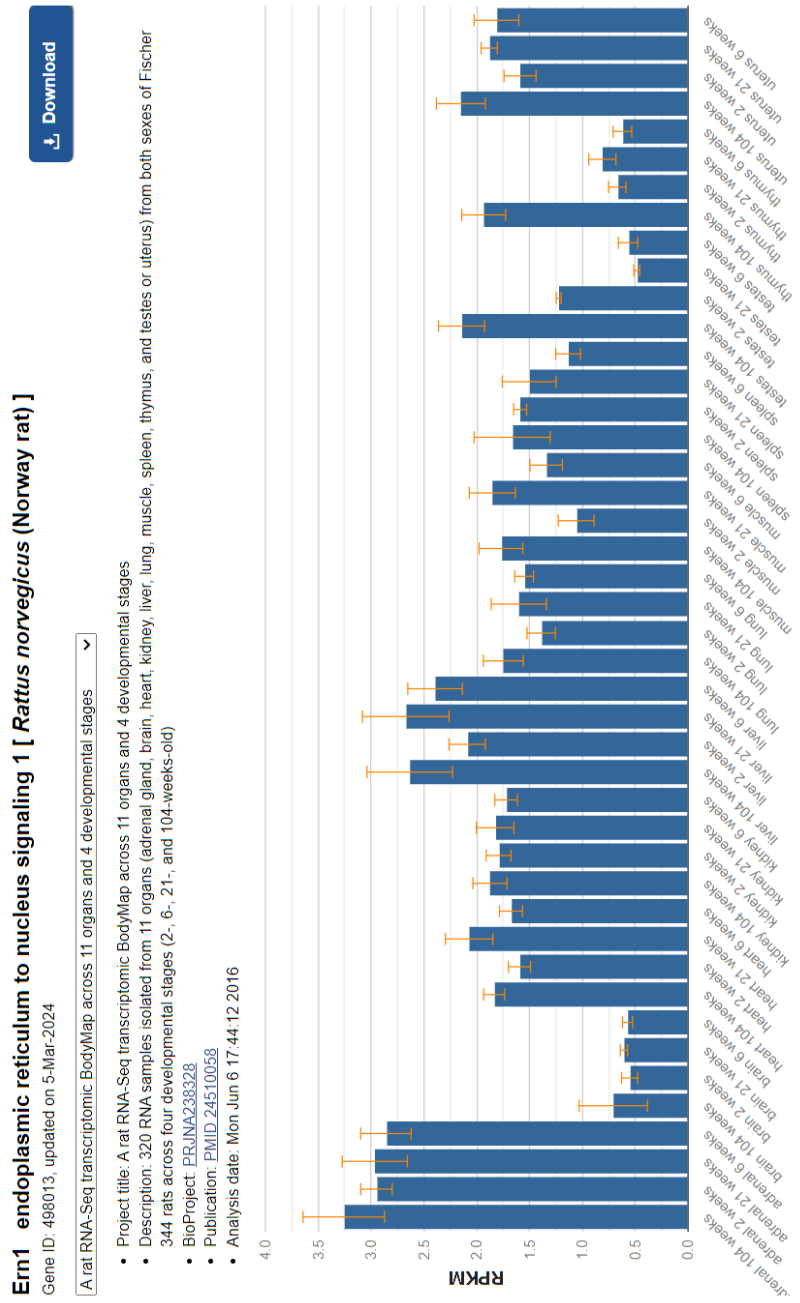
-Tez çalışmasında, 32 örnekten total RNA izole edildi. Dokulardan elde edilen total RNA miktarı ortalama 4800 ng'dır (3088,3-6061,4 ng).

4.1. Genlerin Testis Dokusunda Ekspresyonlarını Gösteren Biyoinformatik Analizi

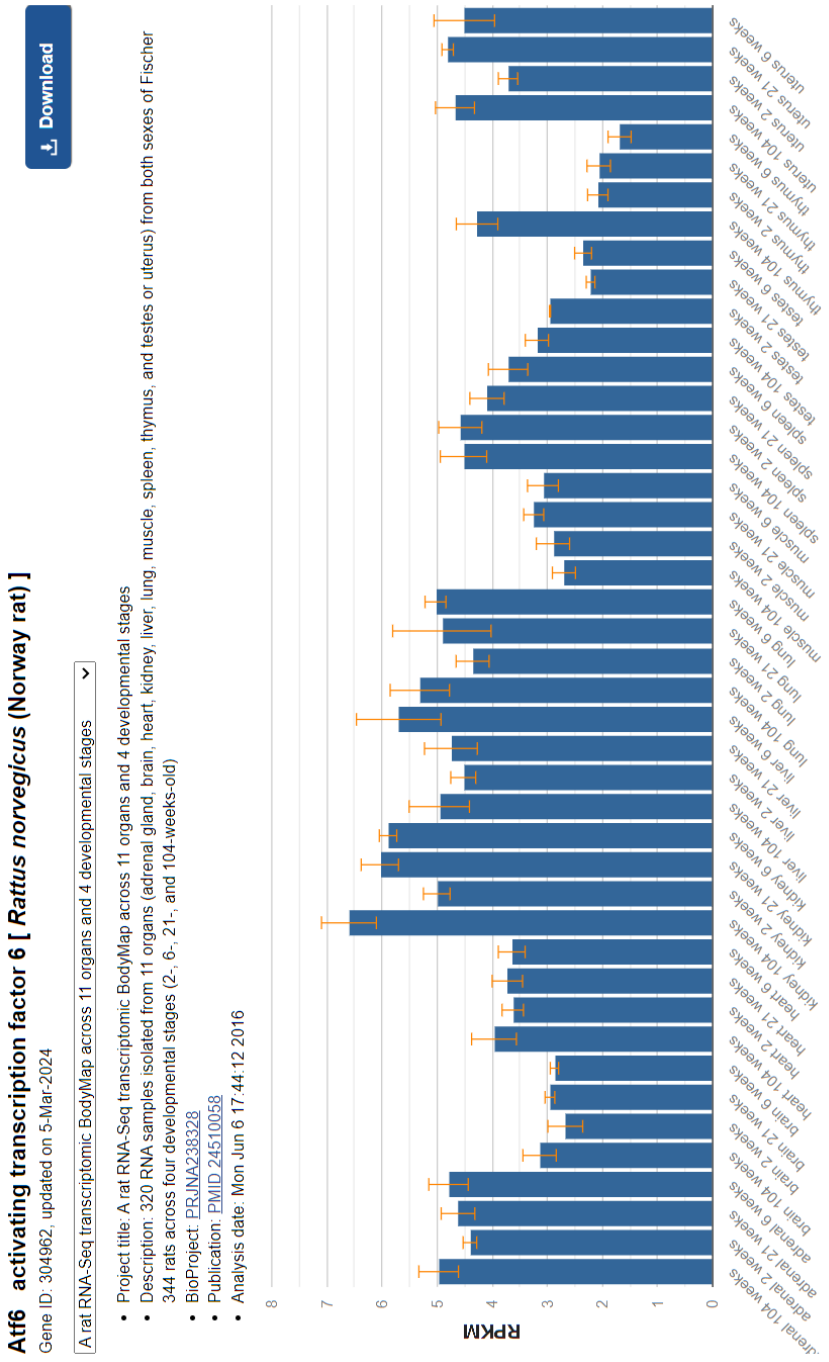
Araştırılan genlerin dokulara özgü gen ekspresyonları ve testis dokusundaki ekspresyon seviyeleri NCBI gene veritabanında (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) araştırıldı. Bu araştırmaların sonuçları Şekil 20-28'da sunulmuştur. Bu grafikler yapılan çalışmalarda normal dokulardan elde edilen değerleri yansıtmaktadır.



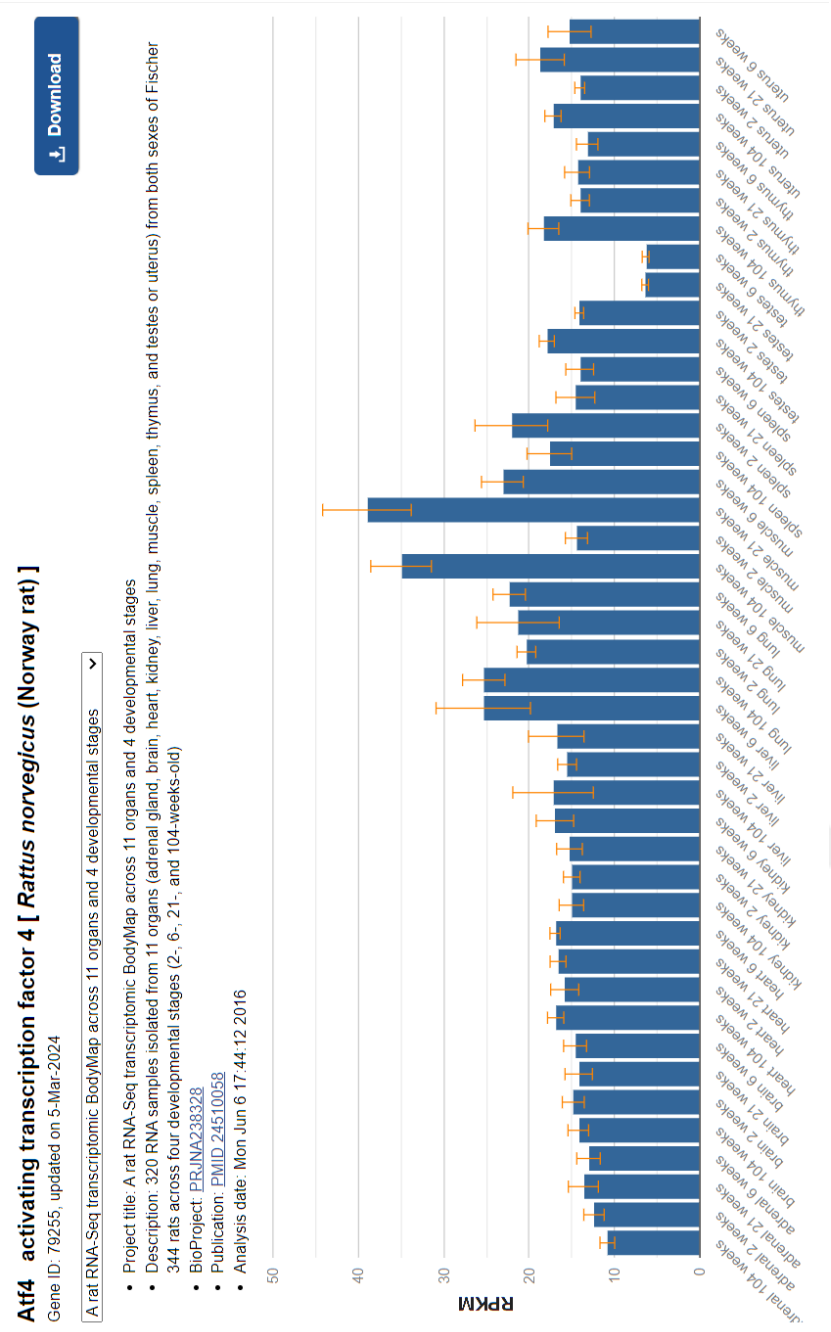
Şekil 20: Sıçanlarda *Perk* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29702#gene-expression



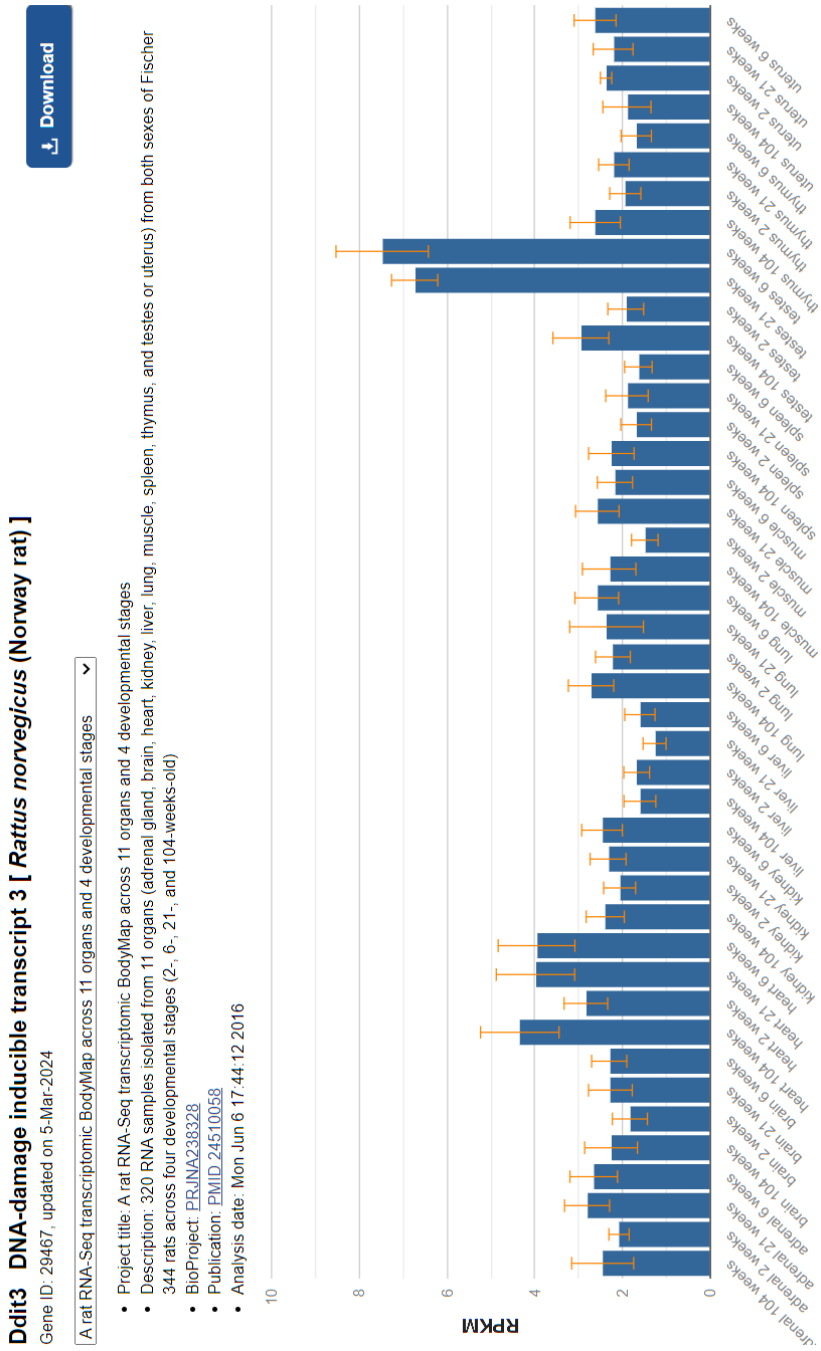
Şekil 21: Sıçanlarda *Ire1* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/498013#gene-expression



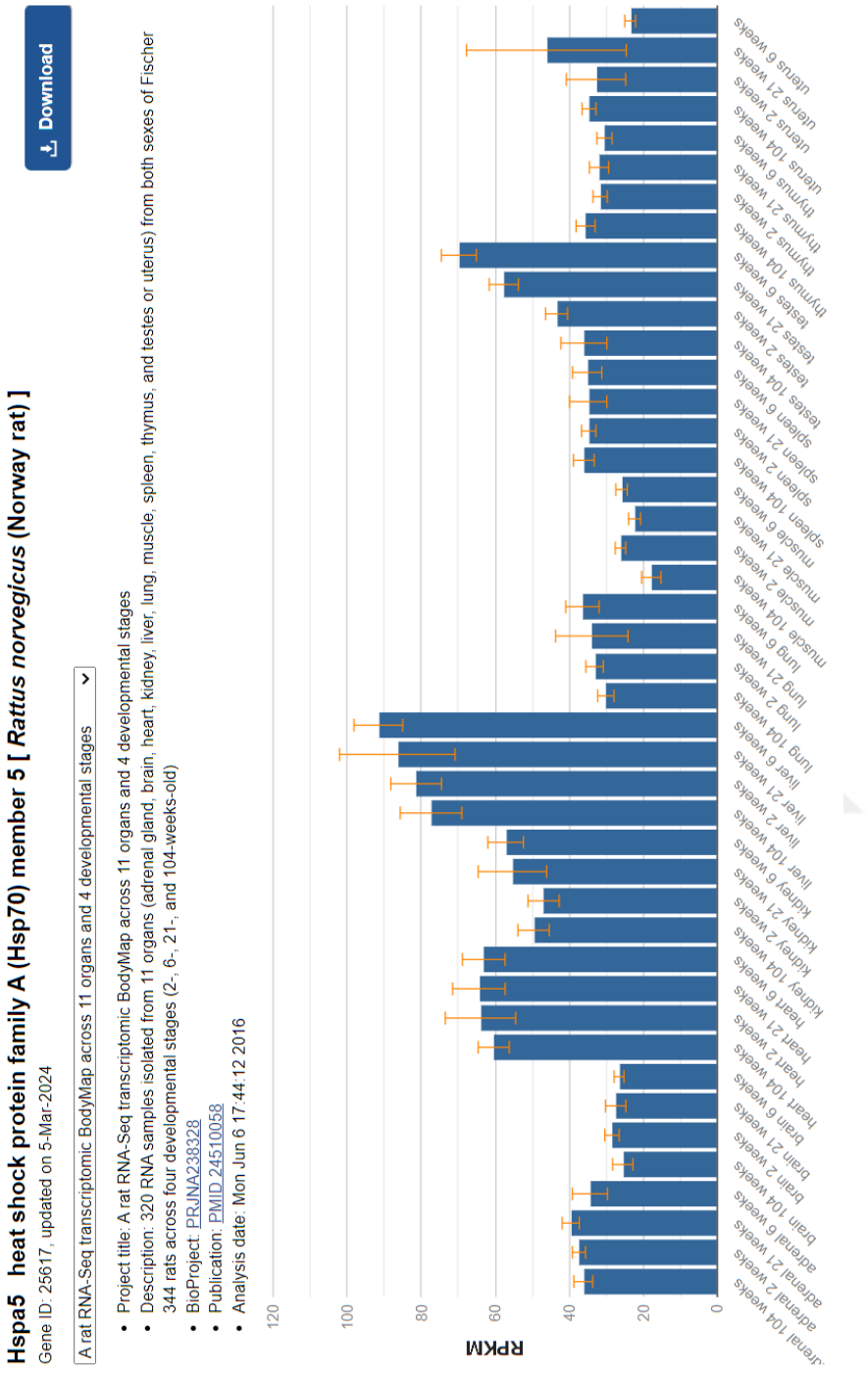
Şekil 22: Sıçanlarda *Atf6* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/304962#gene-expression



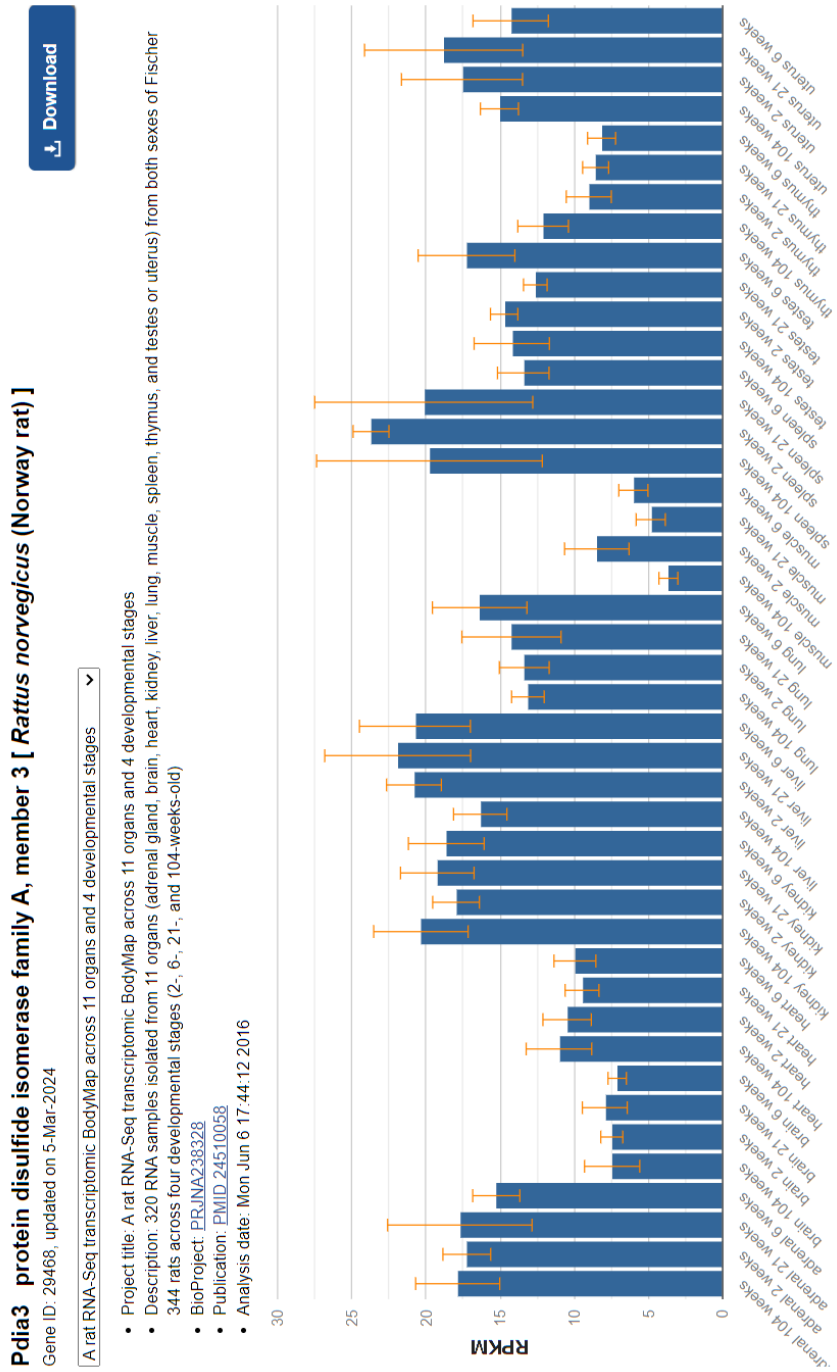
Şekil 23: Sıçanlarda *Atf4* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79255#gene-expression



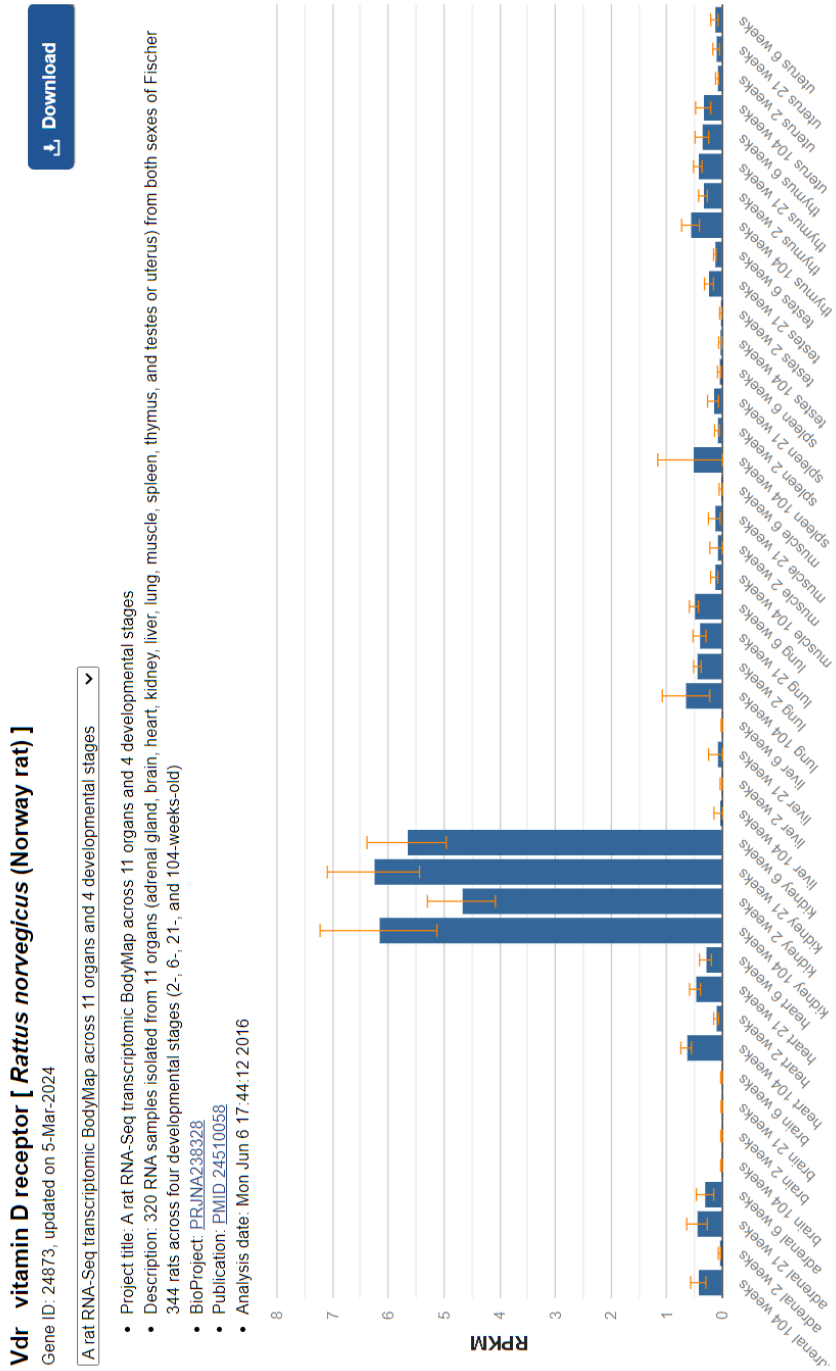
Şekil 24: Sıçanlarda *Chop* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29467#gene-expression



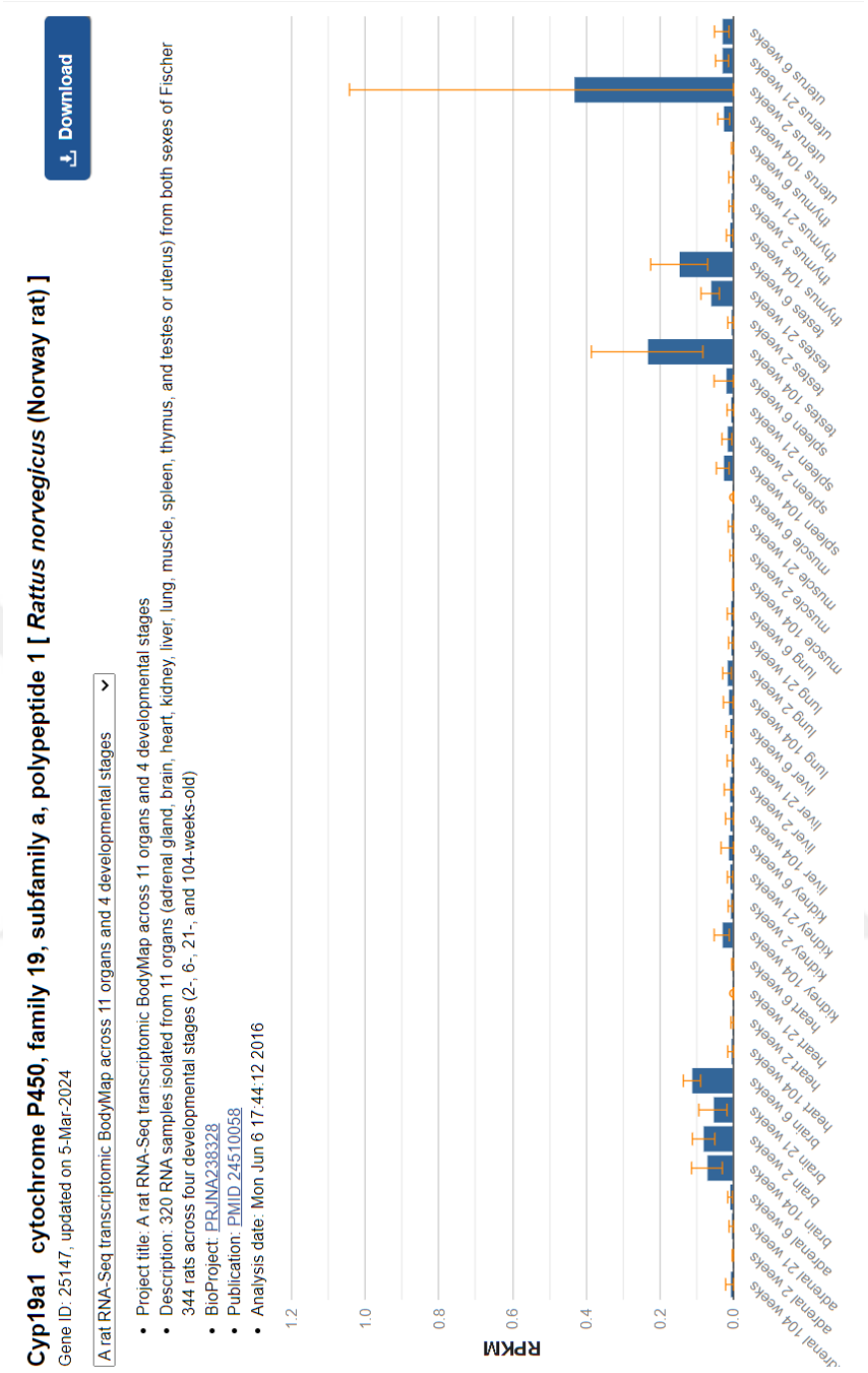
Şekil 25: Sıçanlarda *Grp78* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25617#gene-expression



Şekil 26: Sıçanlarda *Erp57* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29468#gene-expression



Şekil 27: Sıçanlarda *Vdr* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24873#gene-expression



Şekil 28: Sıçanlarda *Cyp19a1* geninin 11 organda ekspresyon seviyesinin gösterimi, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25147#gene-expression

4.2. Gene özgü Primer Tasarımı

Araştırılan genlerin NCBI ve ENSEMBL veritabanlarında yer alan sıçan (Rattus Norvegicus referans genomu, mRatBN7.2) gen dizisi bilgileri kullanılarak tasarlanan primerler dizileri Tablo 6'da belirtilmiştir.

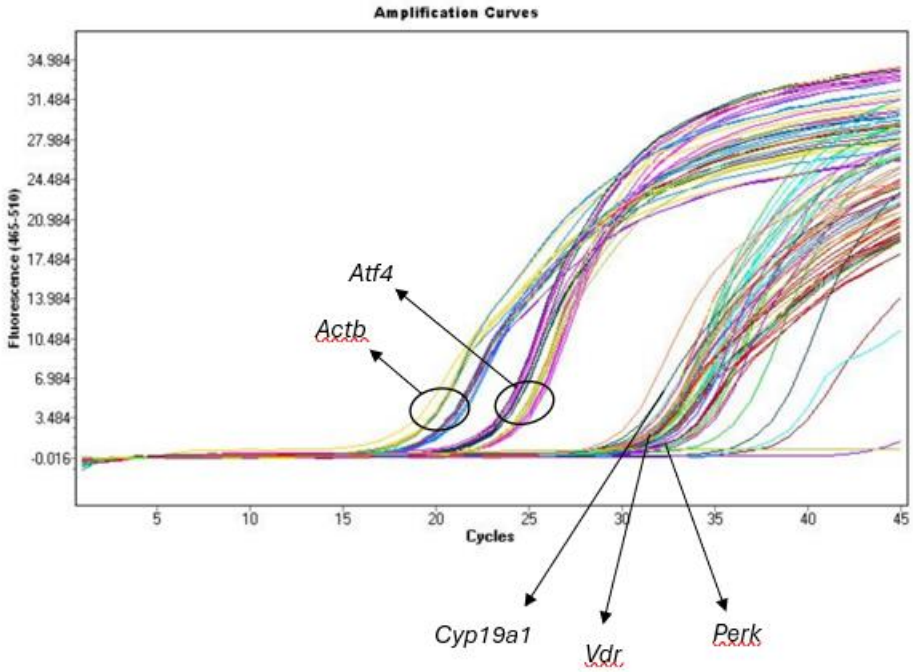
Tablo 6: Tez çalışmasında kullanılan primer çiftlerine ait diziler

Genler	Forward primer	Reverse primer
Perk	5'-CACAGGCAACGGAAGGAG-3'	5'-TCTGTTAGGTATCGGGACACG-3
Ire1	5'-ACCCTACCTACACAGTGGAC-3'	5'-GAGCAATGACGTCCTCGTG–3'
Atf6	5'-TCAGCACGTTCCTGAGGA–3'	5'-GGAGTCAGTCCATGTTCCGT-3'
Atf4	5'-CTGGCTATGGATGGGTTGG-3'	5'-GCATGGTTTCCAGGTCATCC-3'
Chop	5'-ACTACTCTTGACCCTGCATCC-3'	5'-GACCACTCTGTTTCCGTTTCC-3'
Grp78	5'-AAGGTCACCCATGCAGTTGT–3'	5'-AGCTGCTGTTGGCTCATTGA–3'
Erp57	5'-TGCCGATGGAATTGTCAGC-3'	5'-TCTCAAGTTGCTGGCTGC-3'
Vdr	5'-GATTCAGGGATCTCACCTCCG-3'	5'-CCAGCTTTGGAGACATCGG-3'
Cyp19a1	5'-TGAGAGACGTGGAGACCTG-3'	5'-GTACAGAGTGACGGACATGGT-3'
Actb	5'-CCTTCCTTCCTGGGTATGGA-3'	5'-TGATCTTCATGGTGCTAGGAGC-3'

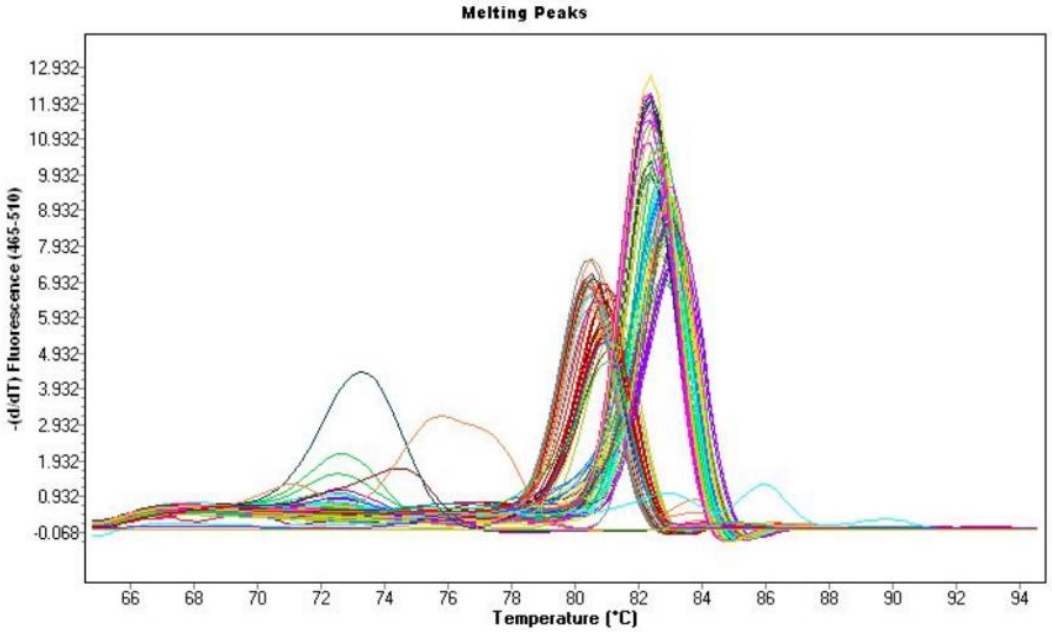
4.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile Gen Ekspresyon Analizi

Araştırılan genlerin çalışma gruplarındaki tüm örneklerde testis dokusuna özgü ekspresyon analizi yapıldı. Şekil 29-38'da amplifikasyon eğrileri ve analiz edilen çözülme eğrilerine örnekler sunulmuştur. Bu grafiklerde de triplike olarak çalışılan örneklerin Ct değerlerinin tutarlılık gösterdiği ve standart sapmalarının normal sınırlar

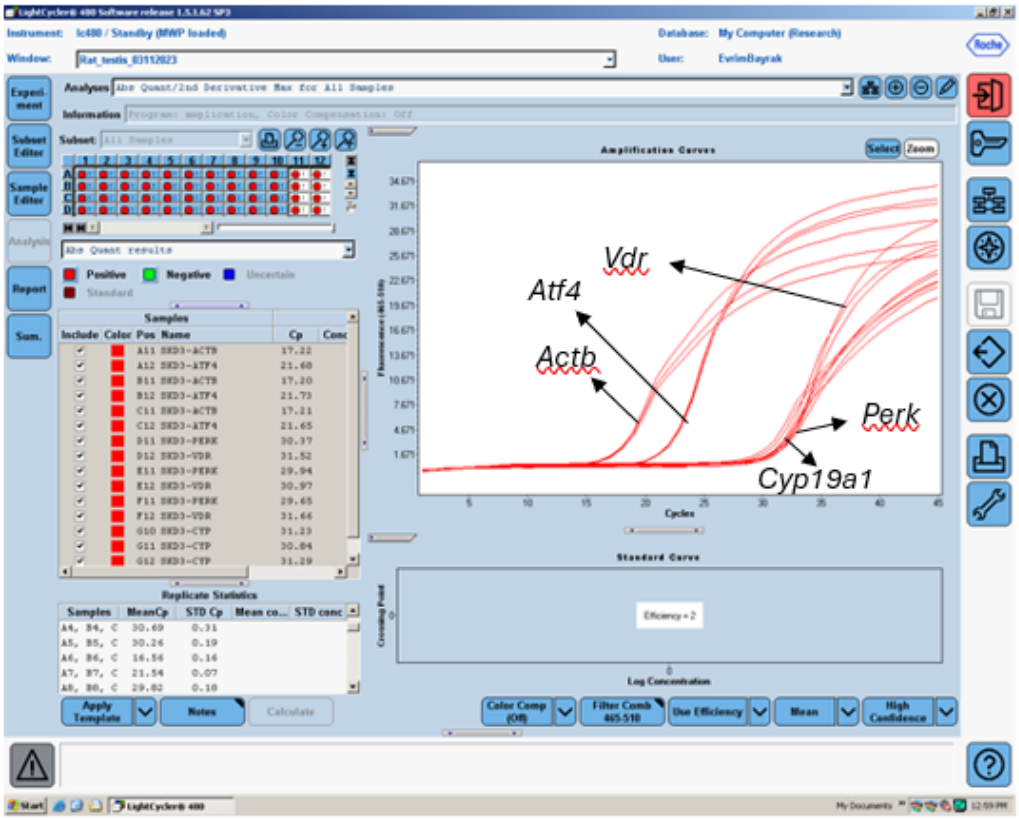
içinde olduğu gözlendi (Şekil 29 ve Şekil 32). Triplike örnekler arasında standart sapma dışında kalan amplifikasyon değeri olduğu durumda analiz dışında bırakıldı. Çözülme eğrisi analizlerinde her gen için tüm çalışma grubu içerisinde aynı sıcaklıkta stabil eğrilerin elde edilmesi spesifik ürünün amplifiye edildiğini göstermiştir (Şekil 30, Şekil 33-38).



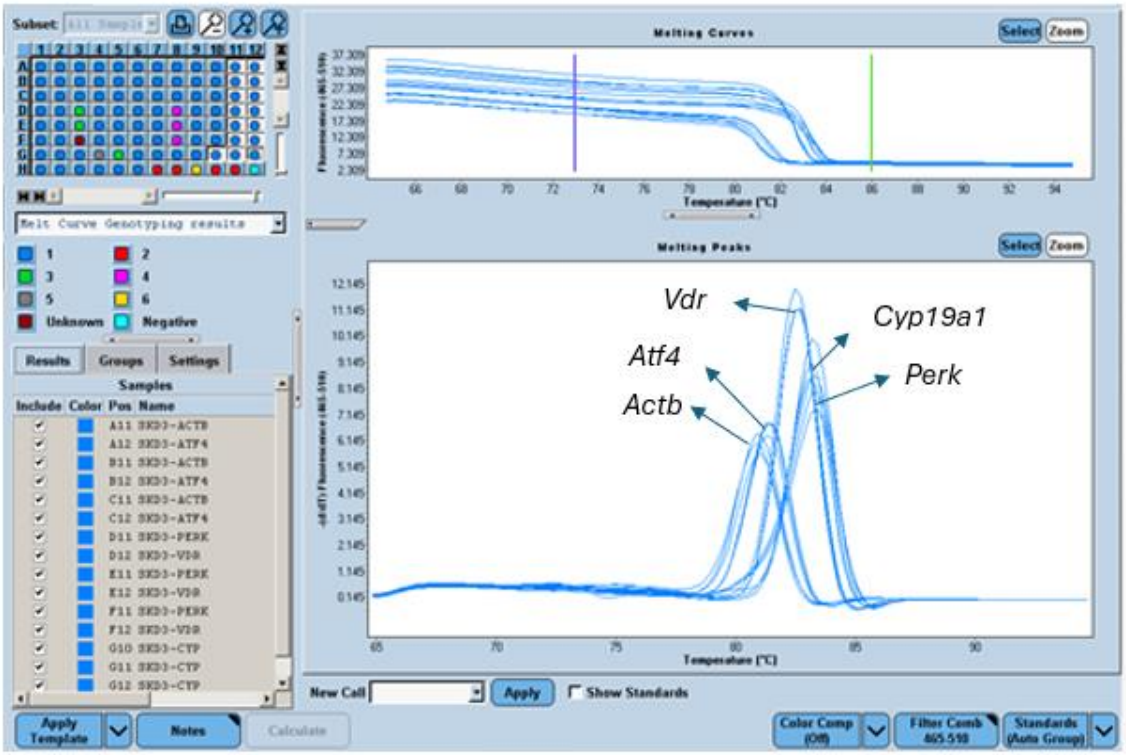
Şekil 29: SK grubunda *Actb, Perk, Vdr, Atf4* ve *Cyp19a1* genlerinin amplifikasyon eğrileri



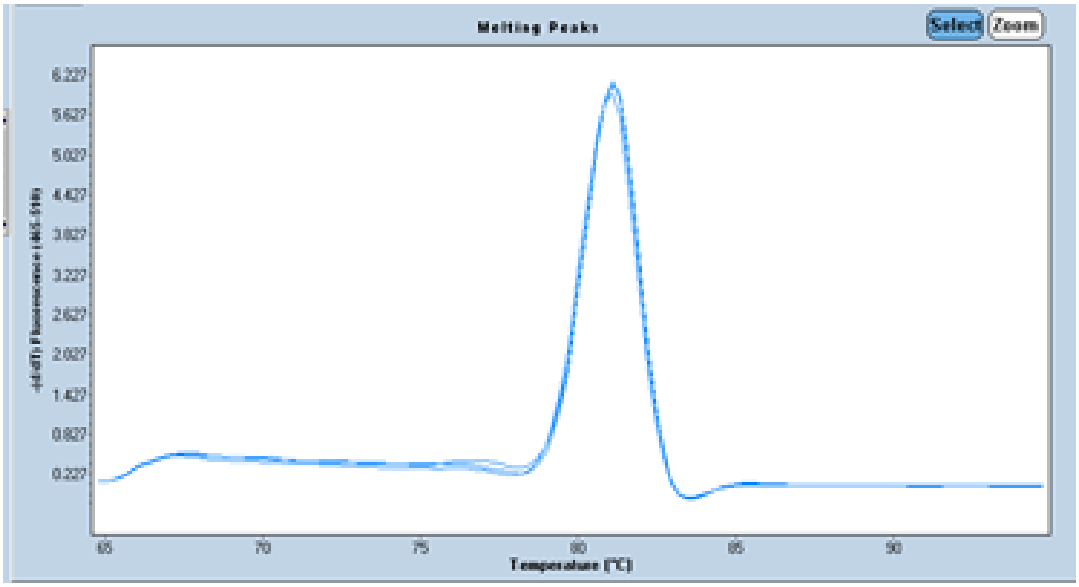
Şekil 30: SK grubunda *Actb*, *Perk*, *Vdr*, *Atf4* ve *Cyp19a1* genlerinin çözülme eğrileri



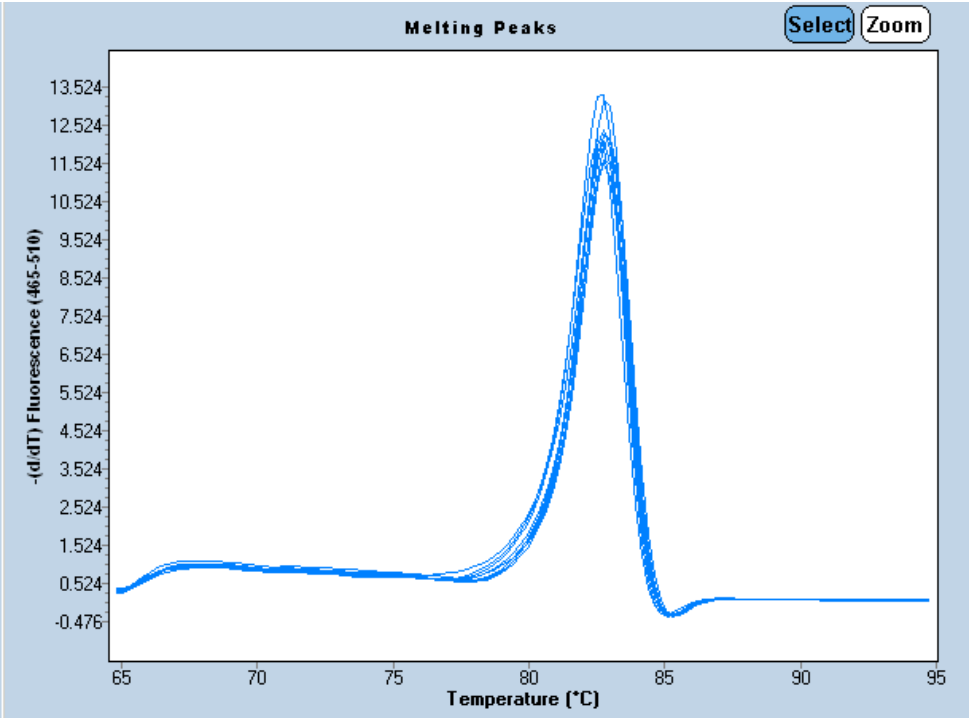
Şekil 31: qRT-PCR analizinde SKD3 örneğine ait gen amplifikasyon eğrileri



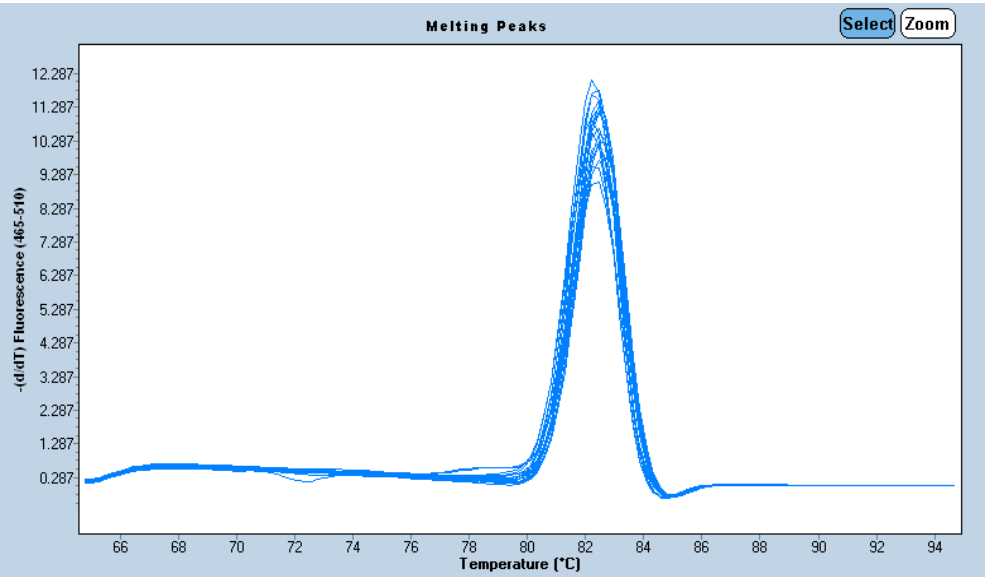
Şekil 32: SKD3'ün *Actb, Atf4, Perk, Vdr* ve *Cyp19a1* genlerinin çözülme eğrileri ve pikleri



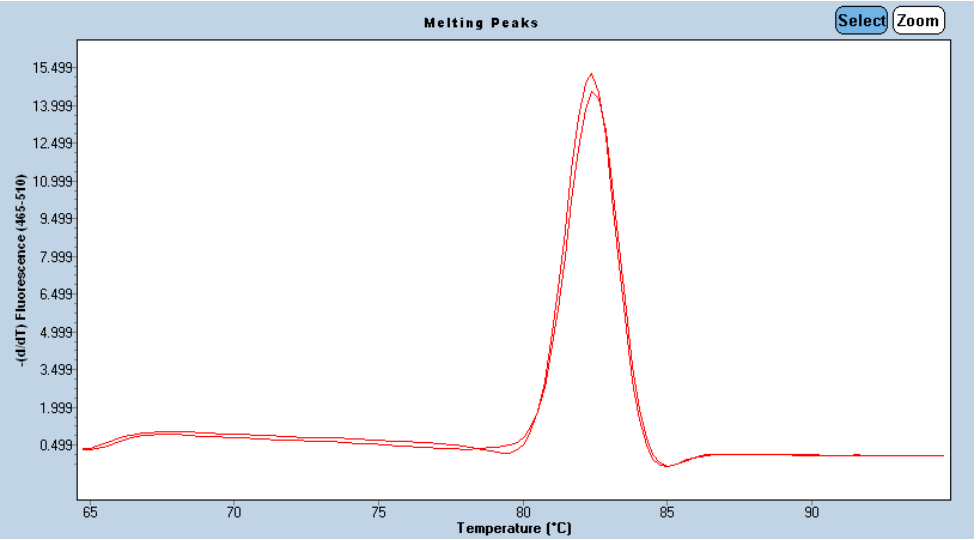
Şekil 33: MS4'te *Perk* geninin çözülme eğrileri



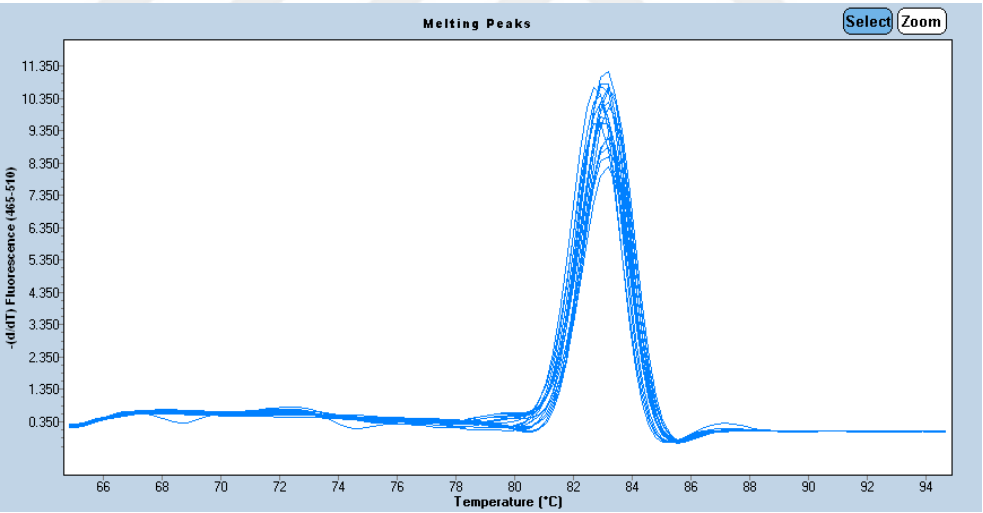
Şekil 34: SK1, MS1 ve MSD1 örneklerinde *Atf6* geninin çözülme eğrileri



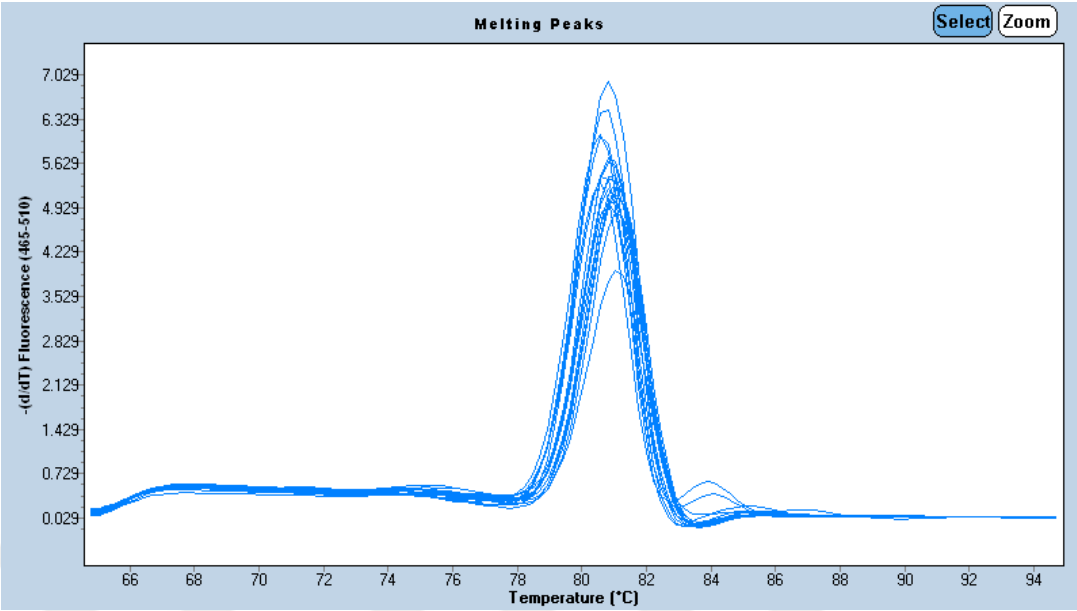
Şekil 35: MSD1-2-3-4-5 örneklerinde *Atf4* geninin çözülme eğrileri



Şekil 36: *Grp78* geninin çözülme eğrileri



Şekil 37: SKD1-2-3-4-5 örneklerinde *Vdr* geninin çözülme eğrileri



Şekil 38: SK7, SK9, MS9, MSD7 ve MSD8 örneklerinde *Cyp19a1* geninin çözülme eğrileri

4.4. Gen Ekspresyon Verilerinin Analizi

VitD uygulamasının sağlıklı dokulardaki gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisinin araştırılması amacı ile SK ve SKD dokuları arasındaki ΔCt değerleri Student T testi ile analiz edildi. Araştırılan genler arasında, *Perk* ve *Atf4*'ün ekspresyonlarının SKD grubunda *Cyp19a1*'in ise SK grubunda daha yüksek olduğu görüldü. Ancak, bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 7).

Tablo 7: Testis dokusunda VitD uygulamasının kontrol gruplarında karşılaştırılması. Değerler mean Ct (±SD) değerlerini verilmiştir. SK, sağlıklı kontrol; SKD, VitD uygulanmış kontrol. P değeri Student T testi ile elde edilmiştir.

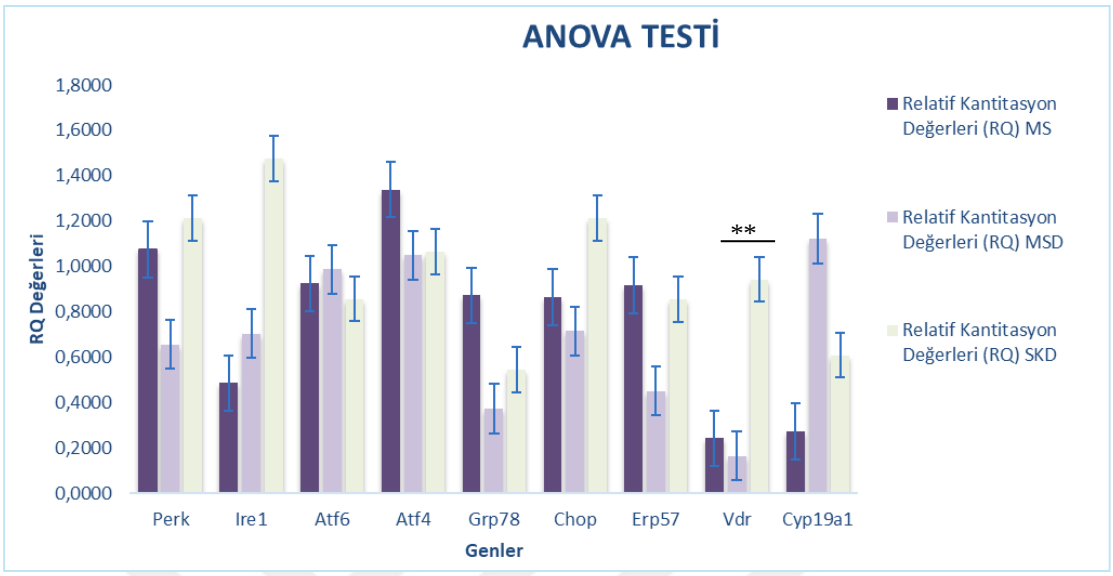
Genler/Gruplar	SK	SKD	p Değeri
Grp78	3,80 (±0.50)	4,87 (±0.85)	NS
Atf6	-0,26 (±0.11)	-0,03 (±0.15)	NS
Perk	12,49 (±0.73)	11,89 (±1.85)	0,094
Ire1	11,01 (±0.51)	11,04 (±1.23)	NS
Chop	5,23 (±0.39)	4,89 (±0.31)	NS
Atf4	4,16 (±0.25)	4,10 (±0.72)	0,077
Vdr	13,33 (±1.15)	12,47 (±2.49)	NS
Erp57	3,57 (±0.57)	3,89 (±0.68)	NS
Cyp19a1	11,86 (±0.75)	12,41 (±1.31)	0,096

MetS ile indüklenen ERS varlığında (MetS) ve ek olarak VitD uygulaması sonrasında araştırılan genlerin testiküler ekspresyonlarındaki (RQ) değişimler Student T testi ile araştırıldı (Tablo 8). MetS grubunda *Grp78* ve özellikle *Erp57*'in (1.55 kat) daha fazla ekpresyonunun olduğu belirlendi. *Cyp19a1* geninin ekspresyonunun MSD grubunda MetS grubuna kıyasla 5,58 kat daha yüksek olduğu saptandı.

Tablo 8: Testis dokusunda VitD uygulamasının MetS gruplarında karşılaştırılması. Değerler RQ değerleri verilmiştir. MS, MetS'li grup; MSD, VitD uygulanmış MetS. P değeri Student T testi ile elde edilmiştir.

Genler/Gruplar	MS	MSD	p Değeri
Grp78	0,87 (±1.13)	0,80 (±0.31)	0,022
Atf6	0,92 (±0.11)	1,16 (±0.17)	NS
Perk	1,07 (±1.89)	1,66 (±2.79)	NS
Ire1	0,48 (±0.28)	0,90 (±0.66)	NS
Chop	0,73 (±0.34)	0,71 (±0.32)	NS
Atf4	1,34 (±0.83)	1,23 (±0.79)	NS
Vdr	0,24 (±0.31)	0,22 (±0.22)	NS
Erp57	0,92 (±0.76)	0,59 (±0.25)	0,016
Cyp19a1	0,27 (±0.24)	1,52 (±1.91)	0,003

Kontrol grubu (SK) ile kalibre edilen SKD, MS ve MSD gruplarında ERS genlerindeki ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılık (RQ) One-way ANOVA testi ile araştırıldı. Bu üç grup içerisinde *Vdr* geninin farklı ekspresyonunun olduğu ve SKD grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlendi (p=0.014; posthoc Tukey testinde SKD vs. MS (p=0.027) ve SKD vs. MSD (p=0.028)). *Atf6* geninde ise MSD grubunda diğer gruplara kıyasla (özellikle SKD'ye göre) daha yüksek ekspresyonunun olduğu gözlenmesine rağmen istatistiksel anlamlılık elde edilemedi (p=0.096; posthoc Tukey testinde SKD vs. MS (p=0,478) ve SKD vs. MSD (p=0,079), Şekil 39).



Şekil 39: MS, MSD ve SKD gruplarında relatif kantitasyon değerlerinin ANOVA testi ile karşılaştırılması

Gruplar arasındaki korelasyonlar Spearman non-parametrik korelasyon testi ile araştırıldı. SK ve SKD grupları arasında delta Ct değerleri karşılaştırıldığında SKD ve *Atf6 ve Grp78* genlerinin ekspresyonu arasında negatif korelasyon olduğu saptandı. MetS ve MSD grupları ve araştırılan genlerin RQ değerleri arasındaki korelasyon araştırıldığında MSD ve *Atf6* gen ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğu (r= 0,759, p=0,001) belirlendi.

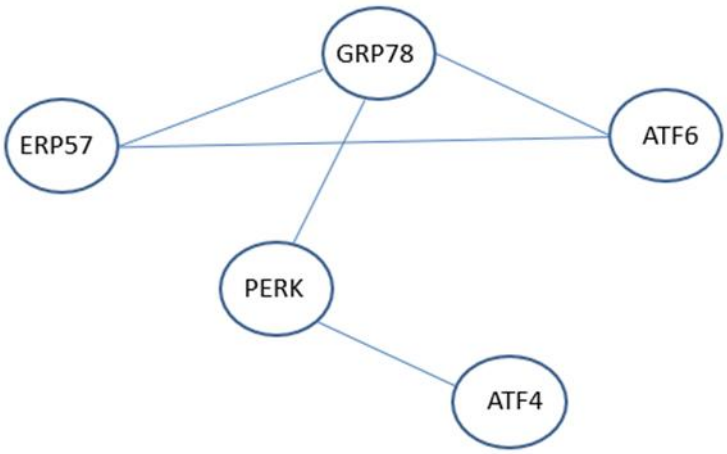
Araştırılan genlerin RQ değerleri arasındaki korelasyon ilişkisi tüm grup içerisinde incelendiğinde *Grp78* geninin ekspresyonu *Atf6* (r=0,544, p=0,029), *Ire1* (r=0,552, p=0.041) ve *Erp57* (r=0,758, p=0,001) genleri ile pozitif korelasyon gösterdiği saptandı. *Perk* geninin ise *Vdr* (r=0.752, p=0.008), *Ire1* (r=0,624, p=0.023) ve *Cyp19a1* (r=0,732, p=0,004) genleri ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlendi. *Vdr* ve *Cyp19a1* arasında ise yüksek derecede istatistiksel anlamlı korelasyon saptandı (r=0,995, p<0,0001). İlginç olarak *Chop* ekspresyonu ve diğer genler arasında bir korelasyona rastlanmadı.

Çalışma grubu MS ve MSD olarak katmanlanarak daha detaylı incelendiğinde, bu ilişkilerin farklılık gösterdiği belirlendi. MS grubunda *Grp78* genin ekspresyonu sadece

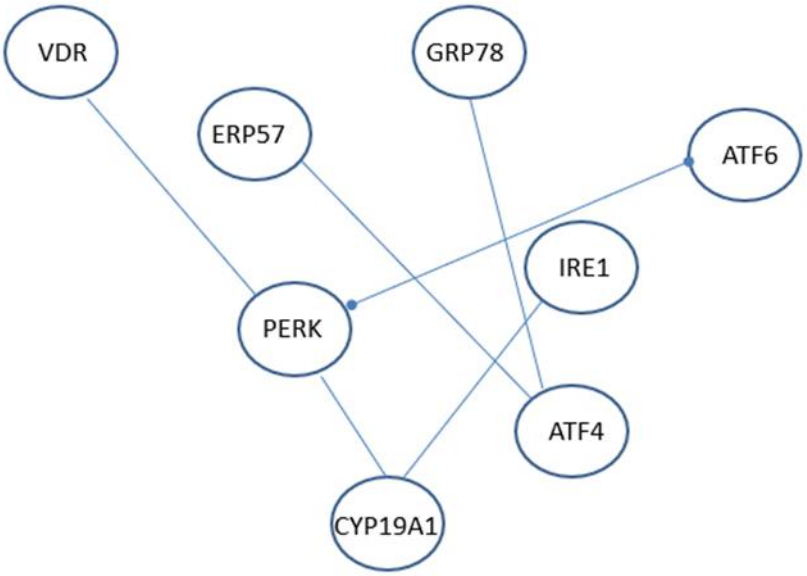
Atf6 (r=0,714, p=0,047) ve *Erp57* (r=0,762, p<0,001) ile ilişkisini korudu. MS grubunda farklı olarak *Atf6* ve *Erp57* genlerinin de pozitif korelasyonun olduğu saptandı (r=0,762, p=0,028). *Perk* geni MetS'da *Atf4* (r=0,793, p=0,033) geni ile pozitif korelasyon gösterdi (Şekil 40).

MSD grubunda, *Grp78* geninin araştırılan diğer ERS ve VitD ilişkili genlerle *Atf4* (r=0,690, p=0,058) ile sınır seviyedeki bir ilişkinin haricinde korelasyon göstermediği saptandı. VitD varlığında *Erp57* geninin ekspresyonu *Atf4* geni ile korelasyon gösterdi (r=0,714, p=0,047). *Perk* geninin ekspresyonun *Atf6* geni ile ters yönde (-0,857, p=0,014), *Vdr* (r=0,900, p=0,037) ve *Cyp19a1* (r=0,893, p=0,007) ile pozitif yönde korelasyonunun belirlendi. Ek olarak, *Cyp19a1* geninin *Ire1* geni ile de korelasyonunun olduğu saptandı (r=0,893, p=0,007, Şekil 41).

Korelasyon analizinin sonuçları Ham Veriler bölümünde verilmiştir.



Şekil 40: Testis dokusunda MetS tarafından indüklenmiş ERS yolağı



Şekil 41: MSD grubunda VitD takviyesi sonrası genlerin korelasyon ilişkisi (PERK ve ATF6 arasında negatif korelasyon bulunmaktadır.)

5. TARTIŞMA

Metabolik sendrom, insülin direnci, dislipidemi, hipertansiyon ve bazı diğer parametrelerin bir arada bulunduğu ve dünya çapında gözlenen kompleks bir durumdur. Türkiye'deki yetişkin nüfus üzerinde yürütülen TEKHARF çalışmasının 2015 yılı verilerine göre ülkemizde 9,2 milyon kişinin ve koroner arter hastalarının %53'ünün MetS tanısı bulunmaktadır [10–12,13]. MetS, Tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür ve farklı patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. MetS'un etki mekanizmalarından birisi de endoplazmik retikulum stresidir. MetS'un uyarısı ile ER homeostazı bozulur ve ERS gelişir [4,6]. ERS varlığında aktifleşen UPR yolakları (PERK, IRE1 ve ATF6) stresin şiddetine göre ya homeostaz sağlanıp normal hücresel işlevlere devam edilmekte ya da apoptoz gözlenmektedir [7,8].

İnfertil çiftlerin yaklaşık %30'unda erkek faktörü mevcuttur. Non-obstrüktif erkek infertilitesi spermatogenezdeki hatalar ya da döllenme aşamasında kusurlar sonucunda oluşmaktadır [16,17,18]. Erkek infertilitesinin büyük oranında net patogenez açıklanamadan kalmakla beraber yaklaşık %15'nin genetik nedenli olduğu bilinmektedir [16]. Çeşitli sebeplerle indüklenen ERS ve MetS, testisin patofizyolojisini ve spermatogenez sürecini etkilemektedir. Bu durumun erkek infertilitesiyle olan ilişkilerini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [19,20,24–27]. Bir çok biyolojik yolakta aktif olan D vitaminin ise hem MetS hem de ERS ve erkek infertilitesi üzerindeki etkileri bağımsız çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir ancak, etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında, daha önce üniversitemizde yürütülen "Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Vitamin D'nin Aterogenezle İlişkili Aday Genlerin İfade Düzeyine Etkisi" başlıklı proje kapsamında metabolik sendrom modeli oluşturulmuş sıçanlardan elde edilen testis dokuları kullanıldı. Testis dokularında MetS'un indüklemesi ile gelişen endoplazmik retikulum stresi ve beraberinde D vitaminin testiküler fonksiyon üzerine etkileri gen ekspresyonu seviyesinde analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda ERS belirteçlerinin ve steroidojenik enzimin ekspresyonlarında gruplar arası farklılıklar araştırıldı.

Kullanılan ilaçlar, maruz kalınan kimyasallar, pestisit, herbisitler gibi çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlerden kaynaklı erkek infertilitesinde rol oynadıkları ve bu durumun testis dokusunda ERS yolağının aktivitesiyle ilişkili olduğu bir çok çalışmayla gösterilmiştir. Örneğin; bibütil ftalat (DBP), sitrinin, metotreksat, sipermetrin ('cypermethrin'), flurokloridin ('flurochlorione') ve busulfan uygulanarak yapılmış çalışmalarda testiküler dokuda, Sertoli hücrelerinde *GRP78, PERK, ATF6, ATF4, CHOP, GRP78, IRE1* ve *fosforillenmiş-EIF2α,* ERS belirteçlerinin ekspresyonlarının ve protein seviyelerinin arttığı, dolayısıyla kan-testis bariyerinde, spermatogenezde bozulmaya sebep olduğu, apoptozu indüklediği gösterilmiştir [74,79,127–130]. 1-Nitropren ve bisfenol-A maruziyetiyle yapılan çalışmalarda ise PERK yolağının aktivasyonuyla steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR), CYP19A1 gibi steroidojenik enzimlerin negatif yönde regüle oldukları gösterilmiştir [131,132]. TSH, LH gibi bir hormon olan insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulanmış Leydig hücrelerinde ERS'nin indüklendiği, ATF6, yolağının aktif olduğu ve CYP17 gibi steroidojenik enzimlerin azaldığı bulunmuştur [133]. Yüksek kolesterollü diyet ile beslenen sıçanlarda ise hiperkolesterolemi oluşturulmuştur ve bunun sonucunda Leydig hücrelerinde StAR gibi steroidojenik enzimlerdeki azalma ile testosteron seviyesinde azalma olduğu ve testis dokusunda ERS'nin ATF6 yolağı üzerinden aktif olduğu elde edilmiştir [27]. Bir başka çalışmada ise yüksek kolesterollü diyet uygulanarak oluşturulmuş model tavşanların testis dokusunda IRE1, PERK ve CHOP, ERS belirteçlerinin indüklendiği ve seminifer tübüllerde apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra E vitamini bileşeni olan alfa-tokoferol uygulamasının da ERS'yi azalttığı gösterilmiştir [134]. Diyabetik sıçanlar ve farelerde yapılan çalışmalar sonucunda melatonin, sitagliptin, fukoidan, kuersetin ve adiponektin uygulamalarının Leydig hücrelerinde, testiküler dokuda meydana gelen patolojik durumlara, testosteron seviyesinin azalmasına sebep olan ERS'nin; *GRP78, CHOP*, Kaspaz12 gibi belirteçlerin artmış ekspresyon seviyesi ve protein seviyelerini azalttığı ve ERS'yi inhibe ederek semen kalitesini arttırdığı, testosteron seviyesini düzenlediği bulunmuştur [135–138]. Bu çalışmada ise istatistiksel olarak anlamlılık elde edilemese de *Atf6* geninin ekspresyonunda MS grubunda azalma görüldü. Bu sonuçlar haricinde yine de *Atf6* geninin ekspresyonunun gerekli olduğu söylenmelidir. Çünkü 2022'de yayımlanan bir çalışma sonucunda infertil hastaların spermlerinde *ATF6* ekspresyonunun azaldığı,

ATF6 eksikliğinin spermatogenez sürecinde gerekli olan *TSSK4* ekspresyonu üzerindeki etkisi ile erkek infertilitesinde sebep olduğu gösterilmiştir [28].

ERS belirteci olan ve ERS durumunda seviyesinde artış gözlemlenen GRP78'in aynı zamanda erkek üreme sisteminde de mekanizması tam olarak belli olmasa da rolü bulunmaktadır. Pakiten spermatositlerde hatta ejaküle spermlerin boyun bölgesinde bulunması ve astenozoosperm ve normal spermdeki GRP78 fosforilasyon farklılıkları hem spermatogenez hem de döllenme aşamasında önemli faktörü olabileceğini göstermektedir [139–141]. 2021'de yayımlanan bir çalışmada GRP78 ile etkileşimde olan TSGA10 proteinin spermlerin mitokondriyal kılıf oluşumunu düzenlediği dolayısıyla sperm hareketliliğini etkilediği gösterilmiştir [142]. 2022'de yayımlanan domuzlarla yapılan bir çalışmada ise HA15 ile GRP78 inhibisyonu yapılmıştır. Bunun sonucunda ise PI3K/PDK1/AKT yolak ilişkili proteinlerin seviyesinde azalma ve sperm hareketliliği, sperm sayısı ve canlılığı önemli ölçüde azalmıştır [143]. Bu çalışmalarla beraber ve yaptığımız analiz sonucunda *Grp78* ve *Erp57*'nin MS grubunda MSD grubuna göre artmış seviyelerinin olması, MetS'da UPR ve stres yolaklarının daha etkin olduğunu, ER kontrol mekanizmalarının uyarıldığını işaret etmektedir. MSD'de SKD'ye göre halen yüksek seviyesinin olması (*Grp78* RQ=0,7 ve *Erp57* RQ=0,5), ancak MetS varlığına göre daha düşük seviyede bulunmaları VitD'nin ERS üzerine düzeltici etkisini işaret etmektedir. *Grp78* ekspresyonunun MS grubunda *Atf6* ve *Ire1* ile korele olması ve MSD grubunda bu korelasyonunun görülmemesi MetS ile tetiklenen ERS varlığında *Grp78*'in artan seviyelerine ve dolayısı ile ERS'i baskılamaya yönelik gen ekspresyonuna VitD varlığında artık ihtiyaç duyulmadığını işaret etmektedir.

ERP57 aynı zamanda VitD metabolizması ve erkek infertilitesinde de rol oynamaktadır. *ERp57* geni pleiotropik özellik göstermektedir. Genelde ER'de bulunan bu protein aynı zamanda nükleusta, hücre yüzeyinde ve mitokondride bulunmaktadır ve farklı biyolojik yolaklarda aktiftir. ERp57, ERS durumunda PERK proteinin redoks aktivasyonuna katılmaktadır [117]. Ama ERp57'nin spermatogenez sürecinin her aşamasında görülmesi, Leydig hücrelerinde ve az da olsa Sertoli hücrelerinde görülmesi, olgun spermde akrozom ve kuyruk kısmında görülmesi, sperm kapasitasyonunda aktif olması ve infertil erkek olgularında *ERp57* seviyesinde azalma görülmesi, gamet füzyonunda önemli olduğunu ve erkek üremesinde koruyucu bir

protein olduğunu göstermektedir [144]. Ayrıca hücre yüzeyinde bulunan ERp57, VitD'nin hızlı ve genomik olmayan tepkisi için reseptör olarak görev almaktadır [145]. Bizim çalışmamızda ise MS grubunda MSD grubuna göre *Erp57* geninde artış görüldü.

D vitamininin erkek infertilitesindeki rolü üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin yaşlanmaya beraber semen kalitesinde bir azalma olduğu bilinmektedir ve testiküler yaşlanma oluşturulmuş erkek sıçanlarda D3 vitamini uygulanması sonucu *CYP19A1* geninin ekspresyonunda artış ve semen parametrelerinde düzelmeler görülmüştür [146]. Erkek üreme sisteminde farklı faktörlerle indüklenmiş ERS üzerine de VitD'nin etkileri çalışılmaya başlanmıştır. 2023'te yayımlanan bir çalışmada prostat kanseri hücrelerinde 1,25(OH)2D3 uygulaması ile indüklenmiş VDR sinyalizasyonunun ERS belirteçlerinden *PERK* ve *IRE1α* genlerinin ekspresyonunu negatif olarak düzenlediğini ve androjen reseptörü sinyalizasyonunda inhibitör özelliği göstererek tümör ilerlemesini baskıladığı gösterilmiştir [115]. 2022'de yayımlanmış bir çalışmada ise testis dokusunda sisplatin indüklenmiş ERS üzerinde VitD ve linagliptin uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada erkek albino sıçanlarda 5 farklı grup (kontrol grubu; sisplatin uygulanan grup; sisplatin+D3 vitamin uygulanan grup; Sisplatin+linagliptin uygulanan grup; sisplatin+D3 vitamini+linagliptin uygulanan grup) oluşturulmuş ve 4 haftalık süre sonunda ERS belirteçleri ve steroidojenik enzimlerin seviyeleri analiz edilmiştir. Bunun sonucunda sisplatinden kaynaklı oluşan testiküler disfonksiyon, ERS belirteçlerindeki artış ve StAR, sitokrom P450 aile 11 alt aile A üye 1 (CYP11A1), hidroksi-delta-5-steroid dehidrojenaz, 3 beta- ve steroid delta-izomeraz kümesi (HSD3b ve HSD17b) gibi steroidojenik enzimlerin seviyesindeki azalış VitD veya linagliptin uygulaması ile düzelmiştir. Sonuç olarak, VitD takviyesinin *PERK* ve *CHOP* ekspresyonunu azaltarak, ERS'yi baskıladığı ve linagliptin ve D3 vitamininin steroidogenezi ve spermatogenezi pozitif olarak düzenlediği gösterilmiştir [89].

Bu tez çalışmasının sonucunda ise *Cyp19a1* geninin MSD grubunda anlamlı derecede yüksek ekspresyonunun olması MetS'de VitD varlığında testiste ER'da aromataz aktivitesinin yükseldiğini ve androjenlerden östrajen yönünde üretimin artmış olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmanın kesin olarak gösterilebilmesi için östrajen reseptörlerinin gen ve protein ekspresyon seviyelerinin da araştırılması gerekmektedir.

Kontrol grupları (SK ve SKD) karşılaştırıldığında, SK grubunda *Cyp19a1*'in ekspresyonunda artma eğilimi saptanmıştır. MSD grubunda *Cyp19a1* ve *Vdr* genleri

arasındaki korelasyon, MetS'da oluşan ERS sonrasında VitD'nin etkisi ile *Cyp19a1* geninin ekspresyonunun artış yönünde düzenlendiğini işaret etmektedir. Bu bulgu, VitD'nin düzeltici etkisini işaret etmektedir. Buna ek olarak, MSD grubunda *Perk* geninin hem *Vdr* hem *Cyp19a1* ile korelasyonunun olması ERS mekanizmasında özellikle *Perk*'in erkek infertilitesi ile ilişkisi olduğunu önermektedir. UPR yolaklarından biri olan *PERK* ise aynı zamanda M2 makrofajların immünobaskılayıcı mekanizmasını pozitif yönde etkilemektedir [147]. Bağışıklık sistemindeki bir başka fonksiyonu ise doğal öldürücü ('natural killer hücreleri') hücrelerde VitD'nin yaşlılıkla ilgili belirteçleri tersine çevirmesi ve inflamasyon ilişkili sitokinleri baskılamasında VitD ile artan *VDR* ekspresyonu ve onunla ilişkili olarak sirtuin 1- protein/kinaz R benzeri endoplazmik retikulum kinaz (SIRT1/PERK) yolağının aktivasyonunun arttığı in vitro olarak bulunmuştur [148]. Bu tez çalışmasında MS ve MSD grupları arasındaki yapılan korelasyon analizi sonucunda her iki grupta da *Grp78, Erp57* ve *ATF6* arasında pozitif ilişkisi olduğu; *Perk*'in MS grubunda *Atf4* ile pozitif ilişkisinin MSD grubunda yok olduğu ve MSD grubunda *Vdr* ve *Cyp19a1* ile pozitif bir ilişkisi olduğu; *Vdr*'nin ise her iki grupta da *Cyp19a1* ile ilişkisi olduğu elde edilmiştir.

Sonuç olarak, metabolik sendromlu sıçanların testis dokusunda indüklenen ERS durumunda D vitamininin, *Ire1* ve *Atf6* yolağı üzerinden ERS'yi baskıladığı gösterilmiş oldu. *Perk* ve *Cyp19a1* genlerinin ekspresyonundaki değişim ve iki gen arasındaki korelasyon ve D vitaminin testis dokusundaki düzenleyici etkisi gösterildi. Bu sonuçlar, metabolik sendrom ilişkili erkek infertilitesinde D vitamini takviyesinin önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Literatür taramasına göre ve bilgimiz dahilinde bu tez çalışması erkek infertilitesinde MetS, ERS ve VitD ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

[1] Gubas A, Dikic I. ER remodeling via ER-phagy. Mol Cell 2022;82:1492–500. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.02.018.

[2] Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. Cellular and Molecular Life Sciences 2016;73:79. https://doi.org/10.1007/S00018-015-2052-6.

[3] Ren J, Bi Y, Sowers JR, Hetz C, Zhang Y. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. Nat Rev Cardiol 2021;18:499–521. https://doi.org/10.1038/S41569-021-00511-W.

[4] Almanza A, Carlesso A, Chintha C, Creedican S, Doultsinos D, Leuzzi B, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. FEBS J 2019;286:241. https://doi.org/10.1111/FEBS.14608.

[5] Cui X, Zhang Y, Lu Y, Xiang M. ROS and Endoplasmic Reticulum Stress in Pulmonary Disease. Front Pharmacol 2022;13. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.879204.

[6] Lee JH, Lee J. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Its Role in Pancreatic β-Cell Dysfunction and Senescence in Type 2 Diabetes. Int J Mol Sci 2022;23:23. https://doi.org/10.3390/IJMS23094843.

[7] Liu MQ, Chen Z, Chen LX. Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. Acta Pharmacol Sin 2016;37:425. https://doi.org/10.1038/APS.2015.145.

[8] Review D/, Düzgün A, Alaçam H, Okuyucu B A Tirebolu A, Hastanesi D. Journal of Experimental and Clinical Medicine Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response 2012. https://doi.org/10.5835/jecm.omu.29.02.003.

[9] Sozen E, Ozer NK. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. Redox Biol 2017;12:456. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.02.025.

[10] Fahed G, Aoun L, Zerdan MB, Allam S, Zerdan MB, Bouferraa Y, et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. Int J Mol Sci 2022;23. https://doi.org/10.3390/IJMS23020786.

[11] Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. Curr Hypertens Rep 2018;20. https://doi.org/10.1007/S11906-018-0812-Z.

[12] Balkan F, Hastanesi AD, Ve Metabolizma E, Kliniği H. Metabolik Sendrom Metabolic Syndrome Derleme. vol. 13. 2013.

[13] Ünaltuna N, Kömürcü-Bayrak E, Çoban N, Güçlü-Geyik F, Poda M, Özsait B, et al. "TEKHARF Genetik Kanadı Koroner Kalp Hastalığı ve Metabolik Sendrom Genetik Risk Faktörleri", TEKHARF 2015 Yetişkinlerimizin Sağlığı ve Kronik Hastalıklara Tıbbın Yaklaşımına Öncülük. 2015.

[14] Cao ZH, Wu Z, Hu C, Zhang M, Wang WZ, Hu XB. Endoplasmic reticulum stress and destruction of pancreatic β cells in type 1 diabetes. Chin Med J (Engl) 2020;133:68. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000583.

[15] Infertility n.d. https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1 (accessed April 2, 2023).

[16] Alhathal N, Maddirevula S, Coskun S, Alali H, Assoum M, Morris T, et al. A genomics approach to male infertility. Genetics in Medicine 2020;22:1967–75. https://doi.org/10.1038/S41436-020-0916-0.

[17] Cannarella R, Condorelli RA, Mongioì LM, La Vignera S, Calogero AE. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. Int J Mol Sci 2020;21. https://doi.org/10.3390/IJMS21051728.

[18] Zańko A, Siewko K, Krętowski AJ, Milewski R. Lifestyle, Insulin Resistance and Semen Quality as Co-Dependent Factors of Male Infertility. Int J Environ Res Public Health 2023;20. https://doi.org/10.3390/IJERPH20010732.

[19] Sarrate Z, Solé M, Vidal F, Anton E, Blanco J. Chromosome positioning and male infertility: it comes with the territory. J Assist Reprod Genet 2018;35:1929. https://doi.org/10.1007/S10815-018-1313-3.

[20] Pfeifer S, Butts S, Dumesic D, Fossum G, Gracia C, La Barbera A, et al. Diagnostic evaluation of the infertile male: A committee opinion. Fertil Steril 2015;103:e18–25. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.103.

[21] Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, De Kretser DM. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 2006:827–947. https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50023-3.

[22] Neto FTL, Flannigan R, Goldstein M. Regulation of Human Spermatogenesis. Adv Exp Med Biol 2021;1288:255–86. https://doi.org/10.1007/978-3-030-77779-1_13.

[23] Shalet SM. Normal testicular function and spermatogenesis. Pediatr Blood Cancer 2009;53:285–8. https://doi.org/10.1002/PBC.22000.

[24] Santiago J, Santos MAS, Fardilha M, Silva J V. Stress response pathways in the male germ cells and gametes. Mol Hum Reprod 2020;26:1–13. https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAZ063.

[25] Guzel E, Arlier S, Guzeloglu-Kayisli O, Tabak MS, Ekiz T, Semerci N, et al. Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology. Int J Mol Sci 2017;18. https://doi.org/10.3390/ijms18040792.

[26] Gao L, Gao D, Zhang J, Li C, Wu M, Xiao Y, et al. Age-related endoplasmic reticulum stress represses testosterone synthesis via attenuation of the circadian clock in Leydig cells. Theriogenology 2022;189:137–49. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2022.06.010.

[27] Yu C, Jiang F, Zhang M, Luo D, Shao S, Zhao J, et al. HC diet inhibited testosterone synthesis by activating endoplasmic reticulum stress in testicular Leydig cells. J Cell Mol Med 2019;23:3140. https://doi.org/10.1111/JCMM.14143.

[28] Yu R, Chen X, Zhu X, He B, Lu C, Liu Y, et al. ATF6 deficiency damages the development of spermatogenesis in male Atf6 knockout mice. Andrologia 2022;54:e14350. https://doi.org/10.1111/AND.14350.

[29] Wen Z, Zhu H, Wang J, Wu B, Zhang A, Zhao H, et al. Conditional deletion of Hspa5 leads to spermatogenesis failure and male infertility in mice. Life Sci 2023;314:121319. https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.121319.

[30] Melguizo-Rodríguez L, Costela-Ruiz VJ, García-Recio E, Luna-Bertos E De, Ruiz C, Illescas-Montes R. Role of Vitamin D in the Metabolic Syndrome. Nutrients 2021;13:1–17. https://doi.org/10.3390/NU13030830.

[31] El-Sharkawy A, Malki A. Vitamin D Signaling in Inflammation and Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. Molecules 2020;25. https://doi.org/10.3390/MOLECULES25143219.

[32] Bikle D, Christakos S. New aspects of vitamin D metabolism and action - addressing the skin as source and target. Nat Rev Endocrinol 2020;16:234–52. https://doi.org/10.1038/S41574-019-0312-5.

[33] de Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, Garifalos F, Menafra D, Cariati F, et al. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders 2017 18:3 2017;18:285–305. https://doi.org/10.1007/S11154-017-9425-0.

[34] Contreras-Bolívar V, García-Fontana B, García-Fontana C, Muñoz-Torres M. Mechanisms Involved in the Relationship between Vitamin D and Insulin Resistance: Impact on Clinical Practice. Nutrients 2021;13. https://doi.org/10.3390/NU13103491.

[35] Cito G, Cocci A, Micelli E, Gabutti A, Russo GI, Coccia ME, et al. Vitamin D and Male Fertility: An Updated Review. World J Mens Health 2020;38:164. https://doi.org/10.5534/WJMH.190057.

[36] Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). The cell: a molecular approach. 4th ed. Washington, D.C. : Sunderland, Mass., ASM Press.

[37] English AR, Voeltz GK. Endoplasmic Reticulum Structure and Interconnections with Other Organelles. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5:1–16. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A013227.

[38] Alberts Bruce, Johnson Alexander , Lewis Julian , Walter Peter , Raff Martin RK. Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition. Garland Science 2002:7823–30.

[39] Wiseman RL, Mesgarzadeh JS, Hendershot LM. Reshaping Endoplasmic Reticulum Quality Control Through the Unfolded Protein Response. Mol Cell 2022;82:1477. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2022.03.025.

[40] Orchard S, Ammari M, Aranda B, Breuza L, Briganti L, Broackes-Carter F, et al. The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. Nucleic Acids Res 2013;42:D358-63. https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1115.

[41] Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanism, regulation and functions of the unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol 2020;21:421. https://doi.org/10.1038/S41580-020-0250-Z.

[42] Li W, Li W, Leng Y, Xiong Y, Xia Z. Ferroptosis Is Involved in Diabetes Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Through Endoplasmic Reticulum Stress. DNA Cell Biol 2020;39:210–25. https://doi.org/10.1089/DNA.2019.5097.

[43] Lemmer IL, Willemsen N, Hilal N, Bartelt A. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. Mol Metab 2021;47:101169. https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2021.101169.

[44] Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. Nucleic Acids Res 2020;48:D498–503. https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ1031.

[45] Sci-Hub | Autophagy: Biology and Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology | 10.1007/978-981-15-0602-4 n.d. https://sci-hub.ru/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31776985/ (accessed October 5, 2022).

[46] Oakes SA, Papa FR. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. Annu Rev Pathol 2015;10:173. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PATHOL-012513-104649.

[47] Eugene SP, Reddy VS, Trinath J. Endoplasmic Reticulum Stress and Intestinal Inflammation: A Perilous Union. Front Immunol 2020;11:3061. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.543022/BIBTEX.

[48] Sims SG, Cisney RN, Lipscomb MM, Meares GP. The role of endoplasmic reticulum stress in astrocytes. Glia 2022;70:5–19. https://doi.org/10.1002/GLIA.24082.

[49] Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment HHS Public Access. Nat Rev Cancer 2021;21:71–88. https://doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2.

[50] Jeong JS, Kim SR, Cho SH, Lee YC. Endoplasmic Reticulum Stress and Allergic Diseases 2017. https://doi.org/10.1007/s11882-017-0751-9.

[51] Savic S, Anaya J-M, Kim H-R, Kr; HA, Chae H-J, Patil Junjappa R, et al. iRe1α implications in endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Development and Pathogenesis of Autoimmune Diseases 2018;9:1. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01289.

[52] BAYRAK AE, ERGİNEL-ÜNALTUNA N, PODA M, HUMPHERIES SE, CAN G, ONAT A, et al. CETP TaqIB polymorphism in Turkish adults: Association with dyslipidemia and metabolic syndrome. Anadolu Kardiyoloji Dergisi 2008;8:324–30.

[53] Kumari R, Kumar S, Kant R. An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews 2019;13:2409–17. https://doi.org/10.1016/J.DSX.2019.06.005.

[54] Hasan *, Savaş B, Gültekin F, Alaaddin A, Üniversitesi K, Fakültesi T, et al. İnsülin Direnci ve Klinik Önemi Insulin Resistance and Clinical Significance n.d. https://doi.org/10.17343/sdutfd.264358.

[55] Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes and diabetes complications. Nat Rev Nephrol 2020;16:377. https://doi.org/10.1038/S41581-020-0278-5.

[56] Passarelli M, Machado UF. AGEs-Induced and Endoplasmic Reticulum Stress/Inflammation-Mediated Regulation of GLUT4 Expression and Atherogenesis in Diabetes Mellitus. Cells 2022;11. https://doi.org/10.3390/CELLS11010104.

[57] Jung TW, Choi KM. Pharmacological Modulators of Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Diseases. Int J Mol Sci 2016;17. https://doi.org/10.3390/IJMS17020192.

[58] Cardiovascular diseases n.d. https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/topic-details/MDB/cardiovascular-diseases (accessed April 2, 2023).

[59] Yang S, Wu M, Li X, Zhao R, Zhao Y, Liu L, et al. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Atherosclerosis and Its Potential as a Therapeutic Target. Oxid Med Cell Longev 2020;2020. https://doi.org/10.1155/2020/9270107.

[60] Cardiovascular diseases n.d. https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/topic-details/MDB/cardiovascular-diseases (accessed January 9, 2023).

[61] di Palo KE, Barone NJ. Hypertension and Heart Failure: Prevention, Targets, and Treatment. Cardiol Clin 2022;40:237–44. https://doi.org/10.1016/J.CCL.2021.12.011.

[62] Zhou L, Shen H, Li X, Wang H. Endoplasmic reticulum stress in innate immune cells - a significant contribution to non-alcoholic fatty liver disease. Front Immunol 2022;13. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.951406.

[63] Hajhashemy Z, Shahdadian F, Moslemi E, Mirenayat FS, Saneei P. Serum vitamin D levels in relation to metabolic syndrome: A systematic review and dose–response meta-analysis of epidemiologic studies. Obesity Reviews 2021;22:e13223. https://doi.org/10.1111/OBR.13223.

[64] Dai Q, Zhu X, Manson JE, Song Y, Li X, Franke AA, et al. Magnesium status and supplementation influence vitamin D status and metabolism: results from a randomized trial. Am J Clin Nutr 2018;108:1249–58. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy274.

[65] Riek AE, Oh J, Sprague JE, Timpson A, De Las Fuentes L, Bernal-Mizrachi L, et al. Vitamin D suppression of endoplasmic reticulum stress promotes an antiatherogenic monocyte/macrophage phenotype in type 2 diabetic patients. Journal of Biological Chemistry 2012;287:38482–94. https://doi.org/10.1074/JBC.M112.386912.

[66] Valer-Martinez A, Martinez JA, Sayon-Orea C, Galvano F, Grosso G, Bes-Rastrollo M. Vitamin D and Cardio-Metabolic Risk Factors in Overweight Adults: An Overview of the Evidence. Curr Pharm Des 2019;25:2407–20. https://doi.org/10.2174/1381612825666190722103919.

[67] Fang MM, Xu J, Wu DM, Zhong C. Vitamin D receptor alleviates hepatic ischemia and reperfucion injury by mediating endoplasmic reticulum stress through autophagy. J Physiol Pharmacol 2021;72:777–84. https://doi.org/10.26402/JPP.2021.5.12.

[68] Totonchi H, Rezaei R, Noori S, Azarpira N, Mokarram P, Imani D. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and the Risk of Metabolic Syndrome (MetS): A Meta-Analysis. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2021;21:943–55. https://doi.org/10.2174/1871530320666200805101302.

[69] Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. Reprod Biol Endocrinol 2018;16. https://doi.org/10.1186/S12958-018-0330-5.

[70] Zhou R, Wu J, Liu B, Jiang Y, Chen W, Li J, et al. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. Cell Mol Life Sci 2019;76:2681–95. https://doi.org/10.1007/S00018-019-03101-9.

[71] Wu S, Yan M, Ge R, Cheng CY. Crosstalk between Sertoli and Germ Cells in Male Fertility. Trends Mol Med 2020;26:215–31. https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2019.09.006.

[72] Erkek Üreme Sistemi n.d. https://www.uroklinik.com.tr/uzmanlik-alanlarimiz/erkek-ureme-sistemi/ (accessed April 5, 2023).

[73] Hosseini M, Shaygannia E, Rahmani M, Eskandari A, Golsefid AA, Tavalaee M, et al. Endoplasmic Reticulum Stress (ER Stress) and Unfolded Protein Response (UPR) Occur in a Rat Varicocele Testis Model. Oxid Med Cell Longev 2020;2020. https://doi.org/10.1155/2020/5909306.

[74] Zhao J, Wang M, Wang Y, Xu J, Ma C, Tang Y, et al. Endoplasmic reticulum stress promotes blood-testis barrier impairment in mice with busulfan-induced oligospermia through PERK-eIF2α signaling pathway. Toxicology 2022;473. https://doi.org/10.1016/J.TOX.2022.153193.

[75] Qin DZ, Cai H, He C, Yang DH, Sun J, He WL, et al. Melatonin relieves heat-induced spermatocyte apoptosis in mouse testes by inhibition of ATF6 and PERK signaling pathways. Zool Res 2021;42:514. https://doi.org/10.24272/J.ISSN.2095-8137.2021.041.

[76] Pan J, Yao YY, Guo X, Kong F, Zhou J, Meng X. Endoplasmic reticulum stress, a novel significant mechanism responsible for DEHP-induced increased distance between seminiferous tubule of mouse testis. J Cell Physiol 2019;234:19807–23. https://doi.org/10.1002/JCP.28580.

[77] Zhu B Bin, Zhang ZC, Li J, Gao XX, Chen YH, Wang H, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces testicular endoplasmic reticulum stress and germ cell apoptosis in adolescent mice. Environ Sci Pollut Res Int 2021;28:21696–705. https://doi.org/10.1007/S11356-020-12210-Z.

[78] Zhao S, Yuan C, Tuo X, Zhou C, Zhao Q, Shen T. MCLR induces dysregulation of calcium homeostasis and endoplasmic reticulum stress resulting in apoptosis in Sertoli cells. Chemosphere 2021;263:127868. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127868.

[79] Wu J, Wu Y, Fan H, Yang C, Yang M, Kong X, et al. Citrinin Exposure Induced Testicular Damage and Spermatogenesis Disorder by Triggering Endoplasmic Reticulum Stress. Foods 2023;12. https://doi.org/10.3390/FOODS12081616.

[80] Zhang Y, Yuan H, Peng M, Hu Z, Fan Z, Xu J, et al. Folic acid deficiency damages male reproduction via endoplasmic reticulum stress-associated PERK pathway induced by Caveolin-1 in mice. Syst Biol Reprod Med 2021;67:383–94. https://doi.org/10.1080/19396368.2021.1954724.

[81] Abdel-Hakeem EA, Zenhom NM, Mokhemer SA. Testicular cytoprotective effect of glucagon like peptide-1 in diabetic rats involves inhibition of apoptosis, endoplasmic reticulum stress and activation of autophagy. Physiol Biophys 2023;42:135–48. https://doi.org/10.4149/gpb_2022064.

[82] Ge X, He Z, Cao C, Xue T, Jing J, Ma R, et al. Protein palmitoylation-mediated palmitic acid sensing causes blood-testis barrier damage via inducing ER stress. Redox Biol 2022;54. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2022.102380.

[83] Alzoubi A, Mahdi H, Bashir S Al, Halalsheh O, Ebbini M Al, Alzarir M, et al. NORMALIZATION OF SERUM VITAMIN D IMPROVES SEMEN MOTILITY PARAMETERS IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC MALE INFERTILITY. Acta Endocrinologica (Bucharest) 2017;13:180. https://doi.org/10.4183/AEB.2017.180.

[84] Maghsoumi-Norouzabad L, Labibzadeh M, Javid AZ, Hosseini SA, Kaydani GA, Dastoorpur M. The association of vitamin D, semen parameters, and reproductive hormones with male infertility: A cross-sectional study. Int J Reprod Biomed 2022;20:331. https://doi.org/10.18502/IJRM.V20I4.10905.

[85] Yuan C, Xiang L, Jian Z, Liao B. Vitamin D Levels and Risk of Male Factor Infertility: A Mendelian Randomization Study. World J Mens Health 2023;41:640. https://doi.org/10.5534/WJMH.220109.

[86] Ding C, Wang Q, Hao Y, Ma X, Wu L, Du M, et al. Vitamin D supplement improved testicular function in diabetic rats. Biochem Biophys Res Commun 2016;473:161–7. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.03.072.

[87] He Y, Liu Y, Wang QZ, Guo F, Huang F, Ji L, et al. Vitamin D3 Activates Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protein Kinase B via Insulin-Like Growth Factor-1 to Improve Testicular Function in Diabetic Rats. J Diabetes Res 2019;2019. https://doi.org/10.1155/2019/7894950.

[88] Liu Y, He Y, Wang Q, Guo F, Huang F, Ji L, et al. Vitamin D3 supplementation improves testicular function in diabetic rats through peroxisome proliferator-activated receptor-γ/transforming growth factor-beta 1/nuclear factor-kappa B. J Diabetes Investig 2019;10:261. https://doi.org/10.1111/JDI.12886.

[89] Merino O, Sánchez R, Gregorio MB, Sampaio F, Risopatrón J. Effect of high-fat and vitamin D deficient diet on rat sperm quality and fertility. Theriogenology 2019;125:6–11. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.09.030.

[90] Elrashidy RA, Zakaria EM, Elmaghraby AM, Abd El Aziz REM, Abdelgalil RM, Megahed RM, et al. Linagliptin and Vitamin D3 Synergistically Rescue Testicular Steroidogenesis and Spermatogenesis in Cisplatin-Exposed Rats: The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum Stress with NF-κB/iNOS Activation. Molecules 2022;27. https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217299.

[91] Shahid M, Khan S, Ashraf M, Akram Mudassir H, Rehman R. Male infertility: Role of vitamin D and oxidative stress markers. Andrologia 2021;53. https://doi.org/10.1111/AND.14147.

[92] Wang L, Lu H, Wang S, Liu H, Guo M, Bai H, et al. Vitamin D Receptor affects male mouse fertility via regulation of lipid metabolism and testosterone biosynthesis in testis. Gene 2022;834:146589. https://doi.org/10.1016/J.GENE.2022.146589.

[93] Xue Z, Zhuang J, Bai H, Wang L, Lu H, Wang S, et al. VDR mediated HSD3B1 to regulate lipid metabolism and promoted testosterone synthesis in mouse Leydig cells. Genes Genomics 2022;44:583–92. https://doi.org/10.1007/S13258-022-01232-1.

[94] Bhakat R, Chandra L, Saxena A, Sarda AK, Krishnamurthy K, Yadav P. Evaluation of Metabolic Syndrome and Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in Male Factor Infertility. Indian Journal of Clinical Biochemistry 2017;32:468. https://doi.org/10.1007/S12291-017-0632-Y.

[95] Vladoiu S, Botezatu A, Anton G, Manda D, Paun DL, Oros S, et al. THE INVOLVEMENT OF VDR PROMOTER METHYLATION, CDX-2 VDR POLYMORPHISM AND VITAMIN D LEVELS IN MALE INFERTILITY. Acta Endocrinologica (Bucharest) 2017;13:294. https://doi.org/10.4183/AEB.2017.294.

[96] Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress 2019. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.022.

[97] HSPA5 heat shock protein family A (Hsp70) member 5 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3309 (accessed October 3, 2023).

[98] Lee WJ, Jung EJ, Hwang JM, Bae JW, Kwon WS. GRP78 plays a key role in sperm function via the PI3K/PDK1/AKT pathway. Reproductive Toxicology 2022;113:103–9. https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2022.08.008.

[99] Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. Antioxid Redox Signal 2009;11:2307. https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2485.

[100] EIF2AK3 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9451#homology (accessed September 19, 2023).

[101] Xu W, Wang C, Hua J. X-box binding protein 1 (XBP1) function in diseases. Cell Biol Int 2021;45:731–9. https://doi.org/10.1002/CBIN.11533.

[102] ERN1 endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2081#general-protein-info (accessed October 3, 2023).

[103] Madhavan A, Kok BP, Rius B, Grandjean JMD, Alabi A, Albert V, et al. Pharmacologic IRE1/XBP1s activation promotes systemic adaptive remodeling in obesity. Nat Commun 2022;13. https://doi.org/10.1038/S41467-022-28271-2.

[104] ATF6 activating transcription factor 6 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22926 (accessed October 3, 2023).

[105] Jin JK, Blackwood EA, Azizi K, Thuerauf DJ, Fahem AG, Hofmann C, et al. ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and

Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart. Circ Res 2017;120:862. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310266.

[106] ATF4 activating transcription factor 4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/468 (accessed October 3, 2023).

[107] Vanhoutte D, Schips TG, Vo A, Grimes KM, Baldwin TA, Brody MJ, et al. Thbs1 induces lethal cardiac atrophy through PERK-ATF4 regulated autophagy. Nat Commun 2021;12. https://doi.org/10.1038/S41467-021-24215-4.

[108] Hao L, Zhong W, Dong H, Guo W, Sun X, Zhang W, et al. ATF4 activation promotes hepatic mitochondrial dysfunction by repressing NRF1-TFAM signaling in alcoholic steatohepatitis. Gut 2021;70:1933. https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2020-321548.

[109] DDIT3 DNA damage inducible transcript 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1649 (accessed October 5, 2023).

[110] Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. Front Immunol 2018;9:3083. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.03083.

[111] Hu H, Peng L, Jiang H, Shen H, Zhou P, Gao Y. Silenced CHOP protects pancreatic B-cell function by targeting peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α through nuclear factor-κB signaling pathway in diabetes mellitus. J Cell Biochem 2019;120:12595–603. https://doi.org/10.1002/JCB.28526.

[112] VDR vitamin D receptor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7421 (accessed October 5, 2023).

[113] Sassi F, Tamone C, D'amelio P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. Nutrients 2018;10. https://doi.org/10.3390/NU10111656.

[114] Fang MM, Xu J, Wu DM, Zhong C. Vitamin D receptor alleviates hepatic ischemia and reperfucion injury by mediating endoplasmic reticulum stress through autophagy. J Physiol Pharmacol 2021;72:777–84. https://doi.org/10.26402/JPP.2021.5.12.

[115] Erzurumlu Y, Aydogdu E, Dogan HK, Catakli D, Muhammed MT, Buyuksandic B. 1,25(OH)2 D3 induced vitamin D receptor signaling negatively regulates endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) and androgen receptor signaling in human prostate cancer cells. Cell Signal 2023;103:110577. https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2022.110577.

[116] PDIA3 protein disulfide isomerase family A member 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2923 (accessed October 5, 2023).

[117] Chichiarelli S, Altieri F, Paglia G, Rubini E, Minacori M, Eufemi M. ERp57/PDIA3: new insight. Cell Mol Biol Lett 2022;27. https://doi.org/10.1186/S11658-022-00315-X.

[118] Hettinghouse A, Liu R, Liu C ju. Multifunctional Molecule ERp57: From Cancer To Neurodegenerative Diseases. Pharmacol Ther 2018;181:34. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2017.07.011.

[119] CYP19A1 cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1588 (accessed December 2, 2023).

[120] Blakemore J, Naftolin F. Aromatase: Contributions to Physiology and Disease in Women and Men. Physiology (Bethesda) 2016;31:258–69. https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00054.2015.

[121] Yang C, Li P, Li Z. Clinical application of aromatase inhibitors to treat male infertility. Hum Reprod Update 2021;28:30–50. https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMAB036.

[122] Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function. Asian J Androl 2016;18:435. https://doi.org/10.4103/1008-682X.173932.

[123] Yang P, Feng X, Li J, Zhang T, Sheng C, Zhang L, et al. Ionizing radiation downregulates estradiol synthesis via endoplasmic reticulum stress and inhibits the proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. Cell Death Dis 2021;12. https://doi.org/10.1038/S41419-021-04328-W.

[124] ACTB actin beta [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/60 (accessed October 5, 2023).

[125] Schwarz AP, Malygina DA, Kovalenko AA, Trofimov AN, Zaitsev A V. Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. Mol Cell Probes 2020;53. https://doi.org/10.1016/J.MCP.2020.101611.

[126] Zorkaya, B. (2022). Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Vitamin D'nin Aterogenezle İlişkili Aday Genlerin İfade Düzeyine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

[127] Zhang G, Liu K, Ling X, Wang Z, Zou P, Wang X, et al. DBP-induced endoplasmic reticulum stress in male germ cells causes autophagy, which has a cytoprotective role against apoptosis in vitro and in vivo. Toxicol Lett 2016;245:86–98. https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2016.01.016.

[128] Varışlı B, Caglayan C, Kandemir FM, Gür C, Bayav İ, Genç A. The impact of Nrf2/HO-1, caspase-3/Bax/Bcl2 and ATF6/IRE1/PERK/GRP78 signaling pathways in the ameliorative effects of morin against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. Mol Biol Rep 2022;49:9641–9. https://doi.org/10.1007/S11033-022-07873-5.

[129] Shen J, Wang L, Wang X, Xie J, Yao T, Yu Y, et al. Cypermethrin induces apoptosis of Sertoli cells through the endoplasmic reticulum pathway. Toxicol Ind Health 2022;38:399–407. https://doi.org/10.1177/07482337221104905.

[130] Zhang F, Ni Z, Zhao S, Wang Y, Chang X, Zhou Z. Flurochloridone Induced Cell Apoptosis via ER Stress and eIF2α-ATF4/ATF6-CHOP-Bim/Bax Signaling Pathways in Mouse TM4 Sertoli Cells. Int J Environ Res Public Health 2022;19:4564. https://doi.org/10.3390/IJERPH19084564.

[131] Li Z, Chen C, Ying P, Ji-jun G, Lian-jie D, Dan H, et al. Bisphenol A and its analogue bisphenol S exposure reduce estradiol synthesis via the ROS-mediated PERK/ATF4 signaling pathway. Food and Chemical Toxicology 2023;182:114179. https://doi.org/10.1016/J.FCT.2023.114179.

[132] Li X liang, Liu Y lin, Liu J yu, Zhu Y yan, Zhu X xin, Zhang W wei, et al. 1-Nitropyrene disrupts testicular steroidogenesis via oxidative stress-evoked PERK-eIF2α pathway. Ecotoxicol Environ Saf 2023;259. https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2023.115027.

[133] Park SJ, Kim TS, Park CK, Lee SH, Kim JM, Lee KS, et al. hCG-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in Leydig cells of the testis. J Mol Endocrinol 2013;50:151–66. https://doi.org/10.1530/JME-12-0195.

[134] Sozen E, Demirel-Yalciner T, Koroglu MK, Elmas MA, Ercan F, Ozer NK. High cholesterol diet activates ER stress mediated apoptosis in testes tissue: Role of α-tocopherol. IUBMB Life 2022;74:85–92. https://doi.org/10.1002/IUB.2535.

[135] Du Z, Xu S, Hu S, Yang H, Zhou Z, Sidhu K, et al. Melatonin attenuates detrimental effects of diabetes on the niche of mouse spermatogonial stem cells by maintaining Leydig cells. Cell Death Dis 2018;9. https://doi.org/10.1038/S41419-018-0956-4.

[136] Kizilay G, Ersoy O, Cerkezkayabekir A, Topcu-Tarladacalisir Y. Sitagliptin and fucoidan prevent apoptosis and reducing ER stress in diabetic rat testes. Andrologia 2021;53. https://doi.org/10.1111/AND.13858.

[137] Wang D, Li Y, Zhai QQ, Zhu YF, Liu BY, Xu Y. Quercetin ameliorates testosterone secretion disorder by inhibiting endoplasmic reticulum stress through the miR-1306-5p/HSD17B7 axis in diabetic rats. Bosn J Basic Med Sci 2022;22:191. https://doi.org/10.17305/BJBMS.2021.6299.

[138] Shi W, Guo Z, Ji Y, Feng J. The protective effect of recombinant globular adiponectin on testis by modulating autophagy, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. Eur J Pharmacol 2020;879:173132. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173132.

[139] Huo R, Zhu YF, Ma X, Lin M, Zhou ZM, Sha JH. Differential expression of glucose-regulated protein 78 during spermatogenesis. Cell Tissue Res 2004;316:359–67. https://doi.org/10.1007/S00441-004-0885-7.

[140] Lachance C, Fortier M, Thimon V, Sullivan R, Bailey JL, Leclerc P. Localization of Hsp60 and Grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa. Int J Androl 2010;33:33–44. https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2008.00948.X.

[141] Lobo V, Rao P, Gajbhiye R, Kulkarni V, Parte P. Glucose Regulated Protein 78 Phosphorylation in Sperm Undergoes Dynamic Changes during Maturation. PLoS One 2015;10. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0141858.

[142] Luo G, Hou M, Wang B, Liu Z, Liu W, Han T, et al. Tsga10 is essential for arrangement of mitochondrial sheath and male fertility in mice. Andrology 2021;9:368–75. https://doi.org/10.1111/ANDR.12889.

[143] Lee WJ, Jung EJ, Hwang JM, Bae JW, Kwon WS. GRP78 plays a key role in sperm function via the PI3K/PDK1/AKT pathway. Reproductive Toxicology 2022;113:103–9. https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2022.08.008.

[144] Huo R, Guo X, Zhang J, Wu J, Mao Y, Lu Y, et al. ERp57 is a potential biomarker for human fertilization capability n.d. https://doi.org/10.1093/molehr/gam049.

[145] Żmijewski MA. Nongenomic Activities of Vitamin D. Nutrients 2022;14. https://doi.org/10.3390/NU14235104.

[146] Jeremy M, Gurusubramanian G, Roy VK. Vitamin D3 mediated regulation of steroidogenesis mitigates testicular activity in an aged rat model. J Steroid Biochem Mol Biol 2019;190:64–75. https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2019.03.016.

[147] Raines LN, Zhao H, Wang Y, Chen HY, Gallart-Ayala H, Hsueh PC, et al. PERK is a critical metabolic hub for immunosuppressive function in macrophages. Nat Immunol 2022;23:431. https://doi.org/10.1038/S41590-022-01145-X.

[148] Li W, Che X, Chen X, Zhou M, Luo X, Liu T. Study of calcitriol anti-aging effects on human natural killer cells in vitro. Bioengineered 2021;12:6844. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1972076.

HAM VERİLER

EK-1

Spearman Korelasyon Analizi Tüm Grup (RQ Değerleri)

		GroupSK_SKD	Group_RQ_MS_MSD	Group_all	RQ_ATF6_SK	RQ_ATF6_SK_SKD	RQ_ERP_SK	RQ_ERP_SK_SKD	RQ_GRP_SK	RQ_GRP_SK_SKD	RQ_ATF4_SK	RQ_ATF4_SK_SKD	RQ_PERK_SK	RQ_PERK_SK_SKD	RQ_VDR_SK	RQ_VDR_SK_SKD	RQ_CYP_SK	RQ_CYP_SK_SKD	RQ_CHOP_SK	RQ_CHOP_SK_SKD	RQ_IRE_SK	RQ_IRE_SK_SKD
Group_RQ_MS_MSD	Correlation Coefficient	1,000	1,000	1.000**	0,353	.759**	-0,298	-0,041	0,027	0,353	-0,217	-0,108	-0,172	0,089	0,071	0,058	0,330	0,330	-0,163	-0,036	0,251	0,394
	Sig. (2-tailed)				0,181	**0,001**	0,262	0,881	0,921	0,181	0,420	0,689	0,594	0,763	0,845	0,866	0,271	0,271	0,547	0,903	0,387	0,163
Group_all	Correlation Coefficient	1.000**	1,000		**.439***	**.759****	-,501*	-0,041	-0,214	0,353	0,037	-0,108	-0,306	0,089	**-,520***	0,058	0,021	0,330	**-,461***	-0,036	-0,109	0,394
	Sig. (2-tailed)				**0,032**	**0,001**	0,013	0,881	0,316	0,181	0,864	0,689	0,202	0,763	**0,039**	0,866	0,931	0,271	**0,023**	0,903	0,629	0,163
RQ_ATF6_SK	Correlation Coefficient	0,353	,439*	1,000	,800**	-0,097	,534*	0,148	0,356	0,077	0,153	-0,177	-0,499	-0,374	-0,374	-0,464	-0,117	-,571*	-0,176	0,226	0,061	-0,077
	Sig. (2-tailed)	0,181	0,032		0,000	0,652	0,033	0,491	0,176	0,721	0,572	0,469	0,069	0,154	0,151	0,622	0,041	0,411	0,436	0,787	0,794	
RQ_ATF6_SK_SKD	Correlation Coefficient	,759**	,800**	1,000	0,138	0,366	0,388	**,544***	0,041	0,147	-0,147	-0,191	-0,079	-0,182	0,115	-0,005	0,044	0,182	0,402	0,231		
	Sig. (2-tailed)	**0,001**	0,001	0,000		0,610	0,163	0,137	**0,029**	0,880	0,587	0,648	0,512	0,829	0,593	0,707	0,986	0,871	0,533	0,154	0,427	
RQ_ERP_SK	Correlation Coefficient	-0,298	-,501*	-0,097	0,138	1,000	,780**	,829**	,585*	0,263	0,388	0,082	0,079	0,788	0,311	0,937	0,164	0,629	0,147	0,935	0,612	0,887
	Sig. (2-tailed)	0,262	0,013	0,652	0,610		0,000	0,000	0,017	0,214	0,137	0,737	0,788	0,311	0,937	0,164	0,629	0,147	0,935	0,612	0,887	
RQ_ERP_SK_SKD	Correlation Coefficient	-0,041	-0,041	,534*	0,366	,780**	1,000	,681**	**,758****	0,311	0,431	-0,021	-0,037	-0,285	-0,191	-,641*	-0,294	0,096	0,079	0,015	0,068	
	Sig. (2-tailed)	0,881	0,881	0,033	0,163	0,000		0,004	**0,001**	0,242	0,095	0,948	0,899	0,425	0,574	0,018	0,329	0,725	0,788	0,958	0,817	
RQ_GRP_SK	Correlation Coefficient	0,027	-0,214	0,148	0,388	,829**	,681**	1,000	,656**	,423*	0,385	0,000	0,062	0,229	0,118	-0,024	-0,044	0,151	-0,204	0,387	0,086	
	Sig. (2-tailed)	0,921	0,316	0,491	0,137	0,000	0,004		0,006	0,040	0,141	1,000	0,834	0,393	0,729	0,920	0,887	0,482	0,483	0,075	0,771	
RQ_GRP_SK_SKD	Correlation Coefficient	0,353	0,353	0,356	**,544***	,585*	**,758****	,656**	1,000	0,285	0,471	0,088	0,376	-0,042	0,064	-0,011	0,319	0,150	-0,046	0,182	**,552***	
	Sig. (2-tailed)	0,181	0,181	0,176	**0,029**	0,017	**0,001**	0,006		0,284	0,066	0,787	0,185	0,907	0,853	0,972	0,289	0,579	0,876	0,533	**0,041**	
RQ_ATF4_SK	Correlation Coefficient	-0,217	0,037	0,077	0,041	0,263	0,311	,423*	0,285	1,000	,891**	0,213	0,279	0,435	0,418	0,274	0,330	0,290	-0,077	,567**	0,314	
	Sig. (2-tailed)	0,420	0,864	0,721	0,880	0,214	0,242	0,040	0,284		0,000	0,213	0,333	0,092	0,201	0,243	0,271	0,169	0,794	0,006	0,274	
RQ_ATF4_SK_SKD	Correlation Coefficient	-0,108	-0,108	0,153	0,147	0,388	0,431	0,385	0,471	,891**	1,000	0,336	0,304	,758*	0,500	0,192	0,423	0,321	0,156	0,442	0,490	
	Sig. (2-tailed)	0,689	0,689	0,572	0,587	0,137	0,095	0,141	0,066	0,000		0,285	0,291	0,011	0,117	0,529	0,150	0,226	0,594	0,114	0,075	
RQ_PERK_SK	Correlation Coefficient	-0,172	-0,306	-0,177	-0,147	0,082	-0,021	0,000	0,088	0,299	0,336	1,000	,614*	,776**	0,049	,710**	0,223	,598**	-0,159	0,404	0,314	
	Sig. (2-tailed)	0,594	0,202	0,469	0,648	0,737	0,948	1,000	0,787	0,213	0,285		0,034	0,000	0,894	0,001	0,509	0,007	0,640	0,097	0,346	
RQ_PERK_SK_SKD	Correlation Coefficient	0,089	-0,499	-0,191	0,079	-0,037	0,062	0,376	0,279	0,304	,614*	1,000	0,134	**,752****	0,289	**,732****	0,059	-0,201	-0,074	**,624***		
	Sig. (2-tailed)	0,763	0,763	0,069	0,512	0,788	0,899	0,834	0,185	0,333	0,291	0,034		0,713	**0,008**	0,338	**0,004**	0,840	0,511	0,809	**0,023**	
RQ_VDR_SK	Correlation Coefficient	0,071	-,520*	-0,374	-0,079	0,271	-0,285	0,229	-0,042	0,435	,758*	,776**	0,134	1,000	0,624	,824**	,685*	,718**	-0,224	,556*	0,394	
	Sig. (2-tailed)	0,845	0,039	0,154	0,829	0,311	0,425	0,393	0,907	0,092	0,011	0,000	0,713		0,054	0,000	0,029	0,002	0,533	0,025	0,260	
RQ_VDR_SK_SKD	Correlation Coefficient	0,058	-0,464	-0,182	0,027	-0,191	0,118	0,064	0,418	0,500	0,049	**,752****	0,624	1,000	0,382	**,955****	-0,245	0,009	0,118	0,591		
	Sig. (2-tailed)	0,866	0,866	0,151	0,593	0,937	0,574	0,729	0,853	0,201	0,117	0,894	**0,008**	0,054		0,247	**0,000**	0,467	0,979	0,729	0,056	
RQ_CYP_SK	Correlation Coefficient	0,330	0,021	-0,117	0,115	-0,323	-,641*	-0,024	-0,011	0,274	0,192	,710**	0,289	,824**	0,382	1,000	,621*	0,256	-0,357	,635*	0,379	
	Sig. (2-tailed)	0,271	0,931	0,622	0,707	0,164	0,018	0,920	0,972	0,243	0,529	0,001	0,338	0,000	0,247		0,024	0,277	0,231	0,003	0,201	
RQ_CYP_SK_SKD	Correlation Coefficient	0,330	0,330	-,571*	-0,005	-0,148	-0,294	-0,044	0,319	0,330	0,423	0,223	**,732****	,685*	**,955****	,621*	1,000	-0,104	-0,258	0,126	**,742****	
	Sig. (2-tailed)	0,271	0,271	0,041	0,986	0,629	0,329	0,887	0,289	0,271	0,150	0,509	**0,004**	0,029	**0,000**	0,024		0,734	0,394	0,681	**0,004**	
RQ_CHOP_SK	Correlation Coefficient	-0,163	-,461*	-0,176	0,044	0,305	0,096	0,151	0,150	0,290	0,321	,598**	0,059	,718**	-0,245	0,256	-0,104	1,000	0,530	0,298	0,077	
	Sig. (2-tailed)	0,547	0,023	0,411	0,871	0,147	0,725	0,482	0,579	0,169	0,226	0,007	0,840	0,002	0,467	0,277	0,734		0,051	0,179	0,794	
RQ_CHOP_SK_SKD	Correlation Coefficient	-0,036	-0,036	0,226	0,182	-0,024	0,079	-0,204	-0,046	-0,077	0,156	-0,159	-0,201	-0,224	0,009	-0,357	-0,258	0,530	1,000	-0,086	-0,138	
	Sig. (2-tailed)	0,903	0,903	0,436	0,533	0,935	0,788	0,483	0,876	0,794	0,594	0,640	0,511	0,533	0,979	0,231	0,394	0,051		0,771	0,637	
RQ_IRE_SK	Correlation Coefficient	0,251	-0,109	0,061	0,402	0,115	0,015	0,387	0,182	,567**	0,442	0,404	-0,074	,556*	0,118	,635**	0,126	0,298	-0,086	1,000	0,451	
	Sig. (2-tailed)	0,387	0,629	0,787	0,154	0,612	0,958	0,075	0,533	0,006	0,114	0,097	0,809	0,025	0,729	0,003	0,681	0,179	0,771		0,106	

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

EK-2

Spearman Korelasyon Analizi Tüm Grup (SK_SKD, delta Ct Değerleri)

		GroupSK_SKD	dCt_ATF6	dCt_ERP	dCt_GRP	dCt_ATF4	dCt_PERK	dCt_VDR	dCt_CYP	dCt_CHOP	dCt_IRE
GroupSK_SKD	Correlation	1,000	**.706****	0,285	**.624****	0,093	0,000	-0,195	0,230	-0,495	0,278
	Sig. (2-tailed)		**0,002**	0,285	**0,010**	0,742	1,000	0,504	0,428	0,061	0,315
dCt_ATF6	Correlation Coefficient	.706**	1,000	0,347	.529*	0,148	-0,104	-0,222	0,260	-0,331	0,359
	Sig. (2-tailed)	0,002		0,188	0,035	0,597	0,713	0,445	0,370	0,229	0,188
dCt_ERP	Correlation Coefficient	0,285	0,347	1,000	.670**	-0,110	0,225	-0,482	-0,169	0,088	.620*
	Sig. (2-tailed)	0,285	0,188		0,005	0,696	0,420	0,081	0,563	0,756	0,014
dCt_GRP	Correlation Coefficient	.624**	.529*	.670**	1,000	0,372	0,307	-0,062	0,385	-0,381	.769**
	Sig. (2-tailed)	0,010	0,035	0,005		0,172	0,265	0,834	0,174	0,162	0,001
dCt_ATF4	Correlation Coefficient	0,093	0,148	-0,110	0,372	1,000	0,122	0,495	.691**	-0,223	0,341
	Sig. (2-tailed)	0,742	0,597	0,696	0,172		0,666	0,072	0,006	0,423	0,213
dCt_PERK	Correlation Coefficient	0,000	-0,104	0,225	0,307	0,122	1,000	0,446	0,301	-0,239	0,261
	Sig. (2-tailed)	1,000	0,713	0,420	0,265	0,666		0,110	0,296	0,390	0,348
dCt_VDR	Correlation Coefficient	-0,195	-0,222	-0,482	-0,062	0,495	0,446	1,000	.697**	-0,262	-0,029
	Sig. (2-tailed)	0,504	0,445	0,081	0,834	0,072	0,110		0,006	0,366	0,923
dCt_CYP	Correlation Coefficient	0,230	0,260	-0,169	0,385	.691**	0,301	.697**	1,000	-.688**	0,292
	Sig. (2-tailed)	0,428	0,370	0,563	0,174	0,006	0,296	0,006		0,007	0,311
dCt_CHOP	Correlation Coefficient	-0,495	-0,331	0,088	-0,381	-0,223	-0,239	-0,262	-.688**	1,000	-0,071
	Sig. (2-tailed)	0,061	0,229	0,756	0,162	0,423	0,390	0,366	0,007		0,800
dCt_IRE	Correlation Coefficient	0,278	0,359	.620*	.769**	0,341	0,261	-0,029	0,292	-0,071	1,000
	Sig. (2-tailed)	0,315	0,188	0,014	0,001	0,213	0,348	0,923	0,311	0,800	

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

EK-3

MS Grubunun Kendi İçinde Korelasyon Analizi

		RQ_ATF6_SK_SKD	RQ_ERP_SK_SKD	RQ_GRP_SK_SKD	RQ_ATF4_SK_SKD	RQ_PERK_SK_SKD	RQ_VDR_SK_SKD	RQ_CYP_SK_SKD	RQ_CHOP_SK_SKD	RQ_IRE_SK_SKD
RQ_ATF6_SK_SKD	Correlation Coefficient	1000,000	.762*	**.714***	.143	.072	-.714	-.714	.143	.029
	Sig. (2-tailed)	.	.028	**.047**	.736	.878	.111	.111	.787	.957
RQ_ERP_SK_SKD	Correlation Coefficient	**.762***	1000	**.929****	.357	.360	-.657	-.657	-.371	-.257
	Sig. (2-tailed)	**.028**	.	**<.001**	.385	.427	.156	.156	.468	.623
RQ_GRP_SK_SKD	Correlation Coefficient	**.714***	**.929****	1000	.333	.342	-.486	-.486	-.429	.029
	Sig. (2-tailed)	**.047**	**<.001**	.	.420	.452	.329	.329	.397	.957
RQ_ATF4_SK_SKD	Correlation Coefficient	.143	.357	.333	1000	**.793***	.657	.657	.486	.029
	Sig. (2-tailed)	.736	.385	.420	.	**.033**	.156	.156	.329	.957
RQ_PERK__SK_SKD	Correlation Coefficient	.072	.360	.342	**.793***	1000,000	.522	.522	.406	.493
	Sig. (2-tailed)	.878	.427	.452	**.033**	.	.288	.288	.425	.321
RQ_VDR_SK_SKD	Correlation Coefficient	-.714	-.657	-.486	.657	.522	1000	1.000**	-.029	.371
	Sig. (2-tailed)	.111	.156	.329	.156	.288	.	.	.957	.468
RQ_CYP_SKP_SKD	Correlation Coefficient	-.714	-.657	-.486	.657	.522	1.000**	1000,000	-.029	.371
	Sig. (2-tailed)	.111	.156	.329	.156	.288	.	.	.957	.468
RQ_CHOP_SK_SKD	Correlation Coefficient	.143	-.371	-.429	.486	.406	-.029	-.029	1000	.371
	Sig. (2-tailed)	.787	.468	.397	.329	.425	.957	.957	.	.468
RQ_IRE_SK_SKD	Correlation Coefficient	.029	-.257	.029	.029	.493	.371	.371	.371	1000,000
	Sig. (2-tailed)	.957	.623	.957	.957	.321	.468	.468	.468	.

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

EK-4

MSD Grubunun Kendi İçinde Korelasyonu

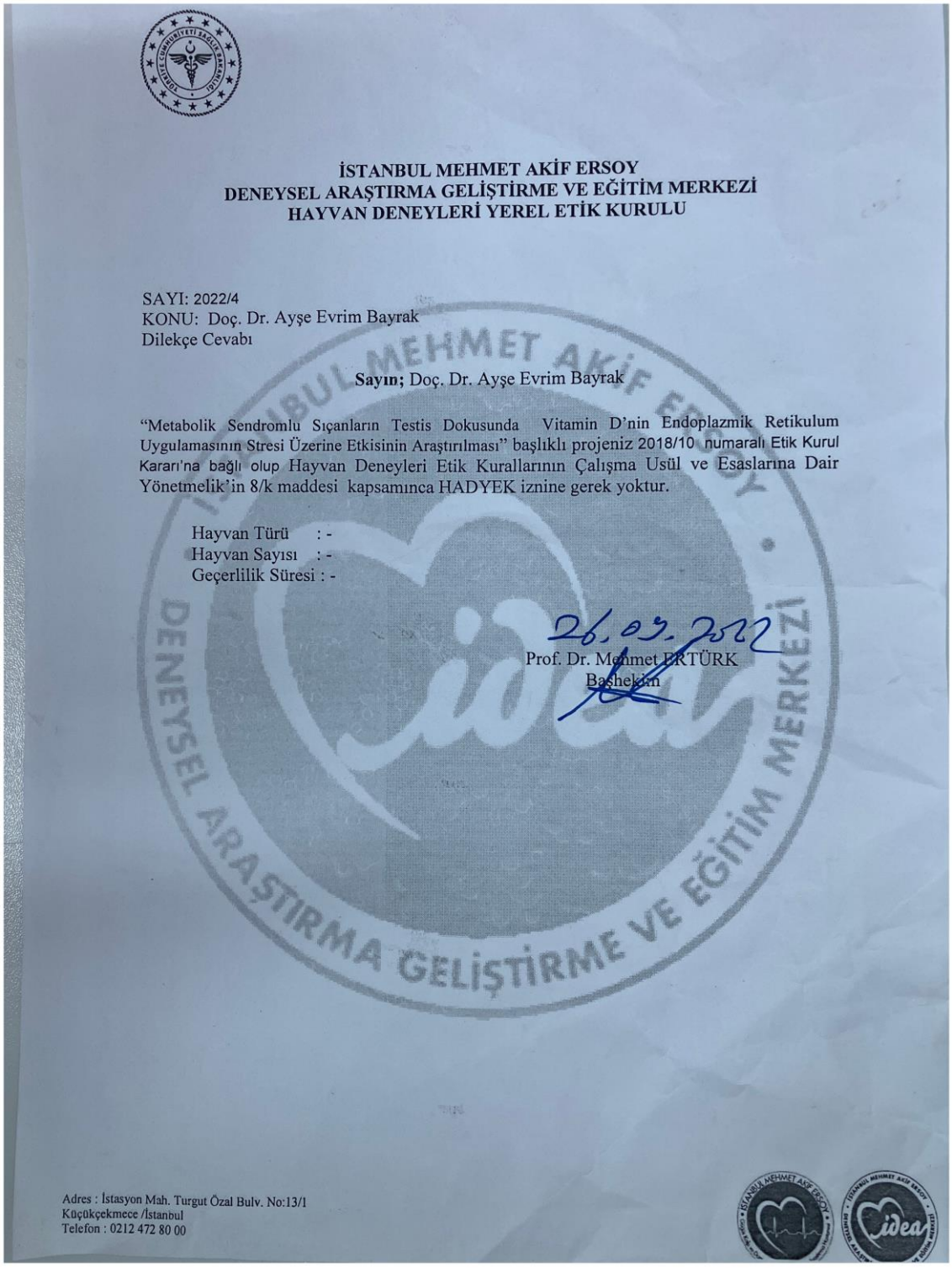
		RQ_ATF6 _SK_SKD	RQ_ERP_ SK_SKD	RQ_GRP_ SK_SKD	RQ_ATF4_ SK_SKD	RQ_PERK_SK_S KD	RQ_VDR_ SK_SKD	RQ_CYP_ SK_SKD	RQ_CHOP _SK_SKD	RQ_IRE_S K_SKD
RQ_ATF6 _SKD	Correlation Coefficient	1000,000	.619	.167	.333	**-.857***	-.400	-.607	.690	-.357
	Sig. (2-tailed)	.	.102	.693	.420	**.014**	.505	.148	.058	.385
RQ_ERP_SKD	Correlation Coefficient	.619	1000	.548	**.714***	-.429	-.300	-.321	.548	.119
	Sig. (2-tailed)	.102	.	.160	**.047**	.337	.624	.482	.160	.779
RQ_GRP_SKD	Correlation Coefficient	.167	.548	1000	.690	.214	.200	.393	.238	.429
	Sig. (2-tailed)	.693	.160	.	.058	.645	.747	.383	.570	.289
RQ_ATF4_SKD	Correlation Coefficient	.333	**.714***	**.690**	1000	.036	.000	.286	.000	.643
	Sig. (2-tailed)	.420	**.047**	**.058**	.	.939	1000	.535	1000	.086
RQ_PERK_SKD	Correlation Coefficient	**-.857***	-.429	.214	.036	1000,000	**.900***	**.893****	-.714	.750
	Sig. (2-tailed)	**.014**	.337	.645	.939	.	**.037**	**.007**	.071	.052
RQ_VDR_SKD	Correlation Coefficient	-.400	-.300	.200	.000	**.900***	1000	**.900***	-.100	.600
	Sig. (2-tailed)	.505	.624	.747	1000	**.037**	.	**.037**	.873	.285
RQ_CYP_SKD	Correlation Coefficient	-.607	-.321	.393	.286	**.893****	.900*	1000,000	-.679	**.893****
	Sig. (2-tailed)	.148	.482	.383	.535	**.007**	.037	.	.094	**.007**
RQ_CHOP_SKD	Correlation Coefficient	.690	.548	.238	.000	-.714	-.100	-.679	1000	-.548
	Sig. (2-tailed)	.058	.160	.570	1000	.071	.873	.094	.	.160
RQ_IRE_SKD	Correlation Coefficient	-.357	.119	.429	.643	.750	.600	**.893****	-.548	1000,000
	Sig. (2-tailed)	.385	.779	.289	.086	.052	.285	**.007**	.160	.

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

FORMLAR

Etik Kurul Belgesi



İSTANBUL MEHMET AKİF ERSOY
DENEYSEL ARAŞTIRMA GELİŞTİRME VE EĞİTİM MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2022/4
KONU: Doç. Dr. Ayşe Evrim Bayrak
Dilekçe Cevabı

Sayın; Doç. Dr. Ayşe Evrim Bayrak

"Metabolik Sendromlu Sıçanların Testis Dokusunda Vitamin D'nin Endoplazmik Retikulum Uygulamasının Stresi Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı projeniz 2018/10 numaralı Etik Kurul Kararı'na bağlı olup Hayvan Deneyleri Etik Kurallarının Çalışma Usül ve Esaslarına Dair Yönetmelik'in 8/k maddesi kapsamınca HADYEK iznine gerek yoktur.

Hayvan Türü : -
Hayvan Sayısı : -
Geçerlilik Süresi : -

26.09.2022
Prof. Dr. Mehmet ERTÜRK
Başhekim

Adres : İstasyon Mah. Turgut Özal Bulv. No:13/1
Küçükçekmece /İstanbul
Telefon : 0212 472 80 00

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

METABOLİK SENDROMLU SIÇANLARIN TESTİS DOKUSUNDA VİTAMİN D'NİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%7	%5	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
3	tbgder.org İnternet Kaynağı	<%1
4	apps.dtic.mil İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
6	Uncu, Beste. "Veri Madenciliği ile Yeni Ilaç Hedeflerinin Saptanmasına Yönelik Interaktomikler: in Silico bir Senaryo", Dokuz Eylul Universitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
7	file.tkd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1