



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK
BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**KOLESTEROL VE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS'UN
RATLARDA TESTİKULAR FONKSİYONA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif TUNA

SAMSUN

Aralık – 2017



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK
BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**KOLESTEROL VE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS'UN
RATLARDA TESTİKULAR FONKSİYONA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif TUNA

**Danışman
Doç. Dr. Gülay ÇİFTÇİ**

SAMSUN

Aralık– 2017

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


Elif TUNA tarafından Doç. Dr. Gülay ÇİFTÇİ danışmanlığında hazırlanan 'Kolesterol ve *Lactobacillus acidophylus*' un Ratlarda Testikular Fonksiyona Etkisinin Araştırılması'' başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 28/12/2017 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ali ERTEKİN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD



Üye : Doç. Dr. Gülay ÇİFTÇİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD

Üye : Doç. Dr. Ayşegül ÇEBİ
Giresun Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü



ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı tamamlamamı sağlayan, yüksek lisans eğitimim boyunca devam eden desteğinden dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülay ÇİFTÇİ' ye çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca gülyüzlerini eksik etmeyen, derin tecrübelerini olabildiğince paylaşan, her fırsatta bana yardımcı olan değerli Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın hocalarım, Prof. Dr. Ali ERTEKİN' e, Prof. Dr. Gül Fatma YARIM' a, Prof. Dr. Sena ÇENESİZ' e ve Doç. Dr. Cevat NİSBET' e, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının ilgili aşamalarında yardımlarından dolayı Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ' ye, Histoloji Anabilim Dalından Sayın hocalarım Doç. Dr. Şerife TÜTÜNCÜ' ye ve Yrd. Doç. Dr. Tuğrul ERTUĞRUL' a çok teşekkür ederim

Bölüm olarak, ekipçe çalışmamız boyunca zaman ve bilgilerini paylaşan değerli, Yrd. Doç. Dr. Filiz KAZAK' a, Araş. Gör. Emine ALTIN' a, Araş. Gör. Ayris SALT' a teşekkür ederim.

Birlikte devam ettirdiğimiz yüksek lisans eğitimi boyunca desteklerini hep hissettiren, iyi kötü günde ihtiyacım olan her fırsatta maddi manevi yanımda olan, zamanlarını benimle paylaşan çok kıymetli arkadaşlarım, Dilek ZORLU' ya, Berika TAŞTEKİN' e, Merve ÖZCAN' a teşekkür ederim.

Son olarak bugünlere gelebilmemde büyük ve önemli payı olan, her zaman minnettar olduğum, tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.16.019 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

KOLESTEROL VE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS'UN RATLARDA TESTİKULAR FONKSİYONA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada yüksek kolesterol diyeti ile beslenen erkek ratlara tedavi amaçlı *Lactobacillus acidophilus* probiyotiği verildi. Probiyotiğin testosteron, folikül uyarıcı hormon (FSH) lüteinizan hormon (LH), androjen bağlayıcı protein (ABP) ve faktör ilişkili apoptoz (FAS) düzeylerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmada 3 grup oluşturuldu. Grup1 (K) standart rat yemi ile 8 hafta beslendi. Grup2 (HK) rat yemine %2 kolesterol karıştırılarak 8 hafta beslendi. Grup3 (HKL) %2 kolesterolü yem ile belenen ratlara son 4 hafta *L. acidophilus* probiyotiği verildi. Testis doku örneklerinden bir tanesinde FSH, testosteron ve faktör ilişkili apoptoz düzeyi ELISA test kiti ile belirlendi. Diğer testis dokusu histolojik olarak incelendi. Serumda LH ve ABP düzeyi ELISA test kiti ile total kolesterol düzeyi ise otoanalizör ile belirlendi.

Bulgular: Hiperkolestemi grubunda serumda total kolesterol düzeyinin arttığı ($P<0.05$), LH ($P>0.05$) ve ABP ($P<0.05$) düzeyinin azaldığı belirlendi. Probiyotik eklenen grupta kolesterol düzeyinin azaldığı, LH ve ABP düzeyinin ise hafif arttığı belirlendi. Testis dokusunda ise HK grubunda FSH ve TES hormon düzeyinin azaldığı, FAS düzeyinin ise arttığı belirlendi. Histolojik olarak tubul duvarındaki hücrelerde atrofi, vakuolizasyon ve duvar yapısının bütünlüğünde bozulmalar olduğu tespit edildi. HKL grubunda ise FSH ve TES hormon düzeyinin arttığı FAS düzeyinin ise azaldığı belirlendi. Tubul duvarının iyileştiği dejenerasyon hücre sayısının yok denecek kadar az olduğu ve duvar yapısının bütünlüğünü koruduğu tespit edildi.

Sonuç: Hiperkolestemi durumunda *Lactobacillus acidophilus* probiyotiğinin ilave edilmesinin testikular fonksiyon üzerine olumlu etkisi olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hiperkolesterolemi; *Lactobacillus acidophilus*; Probiyotik; Testikular doku.

Elif TUNA (Yüksek Lisans Tezi)

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Aralık-2017

ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CHOLESTEROL AND LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS ON THE RATS TESTICULAR FUNCTION

Aim: In this study, *Lactobacillus acidophilus* probiotics were given to male rats fed with high cholesterol diet. It was aimed to determine the effect of probiotics on testosterone, follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), androgen binding protein (ABP) and factor related apoptosis (FAS) levels.

Material and Method: Three groups were formed in the study. Group 1 (K) was fed with standard rat diet for 8 weeks. Group 2 (HK) was fed to rat diet with 2% cholesterol for 8 weeks. Group 3 (HKL) *L. acidophilus* probiotics were given for the last 4 weeks to rats, which were fed with 2% cholesterol feed. FSH, testosterone (TES) and FAS levels in one of the testicular tissue samples were determined by ELISA test kits. The other testicular tissue was examined histologically. In serum LH and ABP levels were determined by ELISA test kit and total cholesterol level by autoanalyzer.

Results: In the hypercholesterolemic group, serum total cholesterol level increased ($P < 0.05$), LH ($P > 0.05$) and ABP ($P < 0.05$) decreased. In the probiotic supplement group, cholesterol level decreased, LH and ABP levels increased slightly. It was determined that FSH and TES hormone level decreased and FAS level increased in HK group. Histologically, it was determined that the integrity of atrophy, vacuolization, and wall structure was deteriorated in the tubular wall cells. In the HKL group, the level of FSH and TES hormone increased and FAS level decreased. It was found that the depleted cell count recovered by the tubular wall was low enough to survive and preserved the integrity of the wall structure.

Conclusion: In the case of hypercholesterolemia, it was concluded that the addition of *Lactobacillus acidophilus* probiotics had a positive effect on testicular function.

Keywords: Hypercholesterolemia; *Lactobacillus acidophilus*; Probiotic; Testicular tissue.

Elif TUNA (Master Thesis)

Ondokuz Mayıs University - Samsun, December-2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
CAD	: Kaspaz aktive edici faktör
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
EDRF	: Endotel-bağımlı rahatlatıcı faktör
GnRH	: Gonadotropin salıcı hormon
HMG-CoA	: 3-Hidroksi-3-Metilglutaril koenzim A
IAP	: İnhibitör apoptoz proteinleri
LCAT	: Lesitin kolesterol akiltransferaz
LAB	: Laktik asit bakterileri
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
P-Mod-S	: Testiküler parakrin faktör
P450_{sc}	: Sitokrom P450 kolesterol yan zincir bölünme enzimi
STAR	: Steroidogenik akut yanıt
3β-HSD	: 3 β Hidroksisteroiddehidrogenaz
17β-HSD	: 17 β Hidroksisteroiddehidrogenaz

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolesterol ve Yapısı.....	4
2.1.1. Kolesterol Biyosentezi.....	5
2.1.2. Kolesterolün Yıkımı.....	8
2.1.3. Hiperkolesterolemi.....	8
2.2. Probiyotikler.....	10
2.2.1. Probiyotik Tanım ve Tarihçesi.....	10
2.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri.....	13
2.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolizması.....	14
2.3. Erkek Üreme Sistemi.....	17
2.3.1. Testiküler Doku ve Fonksiyon.....	18
2.3.2. Leydig Hücreleri.....	20
2.3.3. Sertoli Hücreleri.....	23
2.3.4. Germ Hücresi ve Spermatogenez.....	25
2.3.5. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü.....	27
2.4. Erkek Üreme Hücreleri ve Apoptoz.....	30
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. MATERYAL.....	35
3.2. METOT.....	36
3.2.1. Probiyotik Süspansiyonunun Hazırlanması.....	36
3.2.2. Deneme Planı.....	36
3.2.3. Testis Doku Örneklerinden ELISA için Ekstraksiyon.....	36
3.2.4. Testosteron Düzeyinin Belirlenmesi.....	37
3.2.5. Folikül Uyarıcı Hormon Düzeyinin Belirlenmesi.....	37
3.2.6. Testis Dokusunda Faktör İlişkili Apoptoz Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi.....	38

3.2.7. SerumdaLuteinizan Hormon Düzeyinin Belirlenmesi	39
3.2.8. Androjen Bağlayıcı Protein Düzeyinin Belirlenmesi	40
3.2.9. SerumdaTotal Kolesterol Düzeyinin Belirlenmesi.....	41
3.2.10. Histolojik inceleme.....	42
3.2.11. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Testis Doku Örneklerinden ELISA için Ekstraksiyon	44
4.2. Testis Doku Süpernatantındaki Testosteron, Folikül Uyarıcı Hormon ve Faktör İlişkili Apotoz Düzeyleri.....	44
4.2.1. Testosteron Düzeyleri.....	44
4.2.2. Folikül Uyarıcı Hormon Düzeyi.....	44
4.2.3. Testis Dokusunda Faktör İlişkili Apoptoz Düzeyleri	45
4.3. Serumda Bazı Biyokimyasal Parametreler.....	45
4.3.1. Total Kolesterol Düzeyi.....	45
4.3.2. Luteinizan Hormon Düzeyi	45
4.3.3. Androjen Bağlayıcı Protein Düzeyi.....	46
4.4. Serumda Bazı Biyokimyasal Parametre Sonuçları.	46
4.5. Testis Doku Ekstraktındaki Bazı Hormon Sonuçları	46
4.6. Korelasyon İlişkisi	47
4.7. Histolojik İnceleme Sonuçları.....	47
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	56
EKLER	65
ÖZGEÇMİŞ	66

1. GİRİŞ

Kolesterolün fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığı ifade edilmektedir. Safra asidi biyosentezi, Vitamin- D sentezi, büyüme ve gelişme için gerekli bazı steroid hormonların üretiminde, insan ve hayvan hücre membranında temel bir bileşen olduğu belirtilmiştir (Lim ve ark., 2015). Kolesterolün gametogenesis seviyesinde sperm oluşumu ve fonksiyonlarını düzenleyici olduğu belirtilmektedir. Kolesterol dengesinin düzenlenmesinin posttestikular sperm olgunlaşması için çok önemli olduğu ve dengesiz bir kolesterol seviyesinin bu olaylar zincirinde sorun yaratabileceği belirtilmektedir (Whitfield ve ark., 2015).

Kolesterolün hücre fonksiyonu ve bütünlüğünde önemli bir rolü olduğu vurgulanmaktadır. Hücreler arası sinyalizasyon, hücre zarının yapısına katılma, hücre alış-verişi ve hücre geçirgenliği gibi olaylarda ki yeri önemle ifade edilmektedir. Bu yüzden kolesterol dengesinin optimal düzeydeki hücre fonksiyonları için çok önemli olduğu söylenerek, yıkımı ve sentezi arasında ki dengenin mutlaka korunması gerektiği bildirilmektedir. Erkek üreme sisteminin, kolesterol dengesine de bağımlı olarak bir fonksiyon üstlendiği yine verilen bilgiler arasındadır (Maqdasy ve ark., 2012).

Laktik asit gram pozitif bakterilerine ait olan *Lactobacilli*'nin anaerobik sporsuz ve genomik olmasının yanısıra DNA (Deoksiribonükleik asit)'sın da düşük GC (guanin-sitozin) içerdiği bildirilmiştir. İnsan sağlığına yararlı olduğu için *Lactobacillus acidophilus*'un (*L. acidophilus*), günlük fermante ürünler ve probiyotik destek ürünlerinin içeriğinde bir bileşik olarak pazarlara sunulduğu ifade edilmektedir. Aynı zaman da *Lactobacilli*'nin alerjik tedavilerde ve antibiyotik kaynaklı ishal vakalarının ve *Escherichia coli*'nin antagonisti olarak gastrointestinal enfeksiyonlar da önemle kullanıldığı bildirilmektedir. Bunların yanı sıra immün sistem düzenlenmesi ve kolesterol seviyesinin de kontrolünde katkısı olduğu belirtilmiştir (Patel ve ark., 2016).

Erkek üreme sistemini: eşey hücrelerini üreten testisler ile bu hücreleri ileten; tubulus rektus, rete testis, epididimis, duktus deferens, eklenik genital bezler ve dış genital organ penis oluşturur. Testislerde eşey hücrelerinin üretildiği kanalcıklar olan tubulus seminiferus kontortus duvarında, spermatogenik seriyi oluşturan hücreler ve bunlar arasında yer alan destek, koruma gibi fonksiyonları üstlenen Sertoli hücreleri vardır (Kirk, 2011). Testislerin öncelikli fonksiyonunun ön hipofizden gelen, luteinizan

hormon yanıtı olan, özellikle testosteron, erkek seks hormonlarının üretimi ve spermatogenez olduğu ifade edilmektedir (Lim ve ark., 2015).

Erkeklerde, mayoz ve spermatogenezin testislerde, ergenlik çağına kadar başlamadığı ve bu dönemden sonra seminifer tüpçükler olarak adlandırılan oldukça uzun, sıkıca bükülü tüpçüklerin iç epitelyum döşemesinde sürekli olarak üretildiği bildirilmiştir. Spermatogonyum olarak adlandırılan olgunlaşmamış germ hücrelerinin, bu tüpçüklerin dış kenarı boyunca bazal laminanın hemen altında yerleşim gösterdiği ve burada mitozla sürekli çoğaldıkları ifade edilmektedir (Alberts ve ark., 2008).

Spermatogenez, birçok etkenin doğrudan veya dolaylı olarak rol oynadığı, yaşam süresince devamlılığı süren kompleks bir olgudur. Bu olgunun, spermatogonial kök hücreler tarafından gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Spermatogenez olayının; testis yapısında bulunan seminifer tübüller içerisinde gerçekleştiği belirtilirken, sertoli hücrelerinin de bu olaydaki rolü önemle vurgulanmıştır. Sertoli hücreleri: eşeyli üreyen organizmalarda gamet oluşumunu sağlayacak olan Germ hücrelerinin etrafını sararak dış ortamla bağlantısını keserek aracı ve koruyucu hücre rolü oynamaktadır. Spermatozoidlerin etrafını tamamen sararak birbirlerine tutunurlar ve böylece Kan-Testis bariyerini oluşturmuş olurlar. Oluşturdukları bu bariyer sayesinde: kullanılan bazı ilaçların testise geçişi engellenir ve oluşan haploid sperm hücrelerinin immün sistem tarafından düşman olarak algılanıp yıkılmasını önlediği ifade edilmektedir. Aynı zamanda androjen bağlayıcı proteinler (ABP) salgılayarak androjenleri epididime taşıdıkları belirtilmektedir (Lim ve ark., 2015).

Spermatozoidlerin spermatit haline gelmesi ve daha sonra olgun bir spermatozoon olarak testisi terk etmesi için ise, ergenlikle (püberte ile) başlayan androjen hormonlara ihtiyaç vardır. Spermatogenez sürecine iştirak eden Leydig hücreleri: ergenliğin başlaması ile hipofizden salgılanmaya başlayan LH hormonuna yanıt olarak androjenleri (testosteron vb.) üretir. Ürettiği testosteron, ABP adı verilen bir taşıyıcı proteinle germinal epitelyuma gönderilir. Sertoli hücreleri seminifer tübulüslerin dış zarının (basement membranı) iç yüzeyine yayılır ve bir bakıcı hücre gibi spermatogenez sırasında farklılaşan hücreleri besler. Sertoli; FSH (folikül stimüle edici hormon) ve testosteronun hedef hücresidir. Bu hücreler spermatogenez destekleyen ABP, büyüme faktörleri, steroid hormonlar ve hücrelerin içerisine gömüldüğü matriks proteinlerini salgılar (Kirk, 2011).

Erkeklerde birinci üreme organı olan testislerin en önemli fonksiyonunun: ön hipofizden gelen lüteinizan hormon yanıtını verecek olan testosteron, erkek seks hormonları salınımı için gerekli sinyalizasyon ve spermatogenez olgusunun olduğu belirtilmektedir (Lim ve ark., 2015).

Probiyotikler, intestinal sistemin mikrobiyal dengesini düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan, canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır. Bunların içerisinde *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri en yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır. Laktik kültürlerin, özellikle *L. acidophilus* içeren süt ürünlerinin serum kolesterol düzeyini düşürücü ve fekal laktobasil sayısını artırıcı etkileri olduğu belirlenmiştir (Rolfe, 2000). Probiyotik bakterilerin serum kolesterolünü düşürücü etkilerini açıklamaya yönelik değişik görüşler bulunmaktadır. En çok kabul gören görüş; probiyotiklerin safra tuzlarını serbest asitlere parçalayarak intestinal sistemden hızlı bir şekilde uzaklaştırıldığını ileri sürmektedir. Serbest safra tuzları vücuttan atıldığı için, kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezi, vücuttaki toplam kolesterol konsantrasyonunu düşürebilmektedir (De Boever ve ark., 2000).

Bir başka görüşe göre ise, probiyotik laktik asit bakterileri asit üretimi sonucu pH'yı düşürerek, dekonjuge safra tuzları ile kolesterolün presipitasyonuna neden olmasındır (Laurens ve Viljoen, 2001). *L. acidophilus* probiyotiğinin kolesterol düşürücü rolü olduğu bildirilmiştir. Ancak testikular fonksiyona etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple çalışmada, yüksek kolesterol diyeti ile beslenen Sprague Dawley ırkı erkek ratlara tedavi amaçlı *L. acidophilus* probiyotiğinin verilmesinin testikular fonksiyonda önemli olan testosteron, FSH ve lüteinizan hormon (LH), ABP, faktör ilişkili apoptoz düzeyinin nasıl etkilendiği ELISA test kitleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

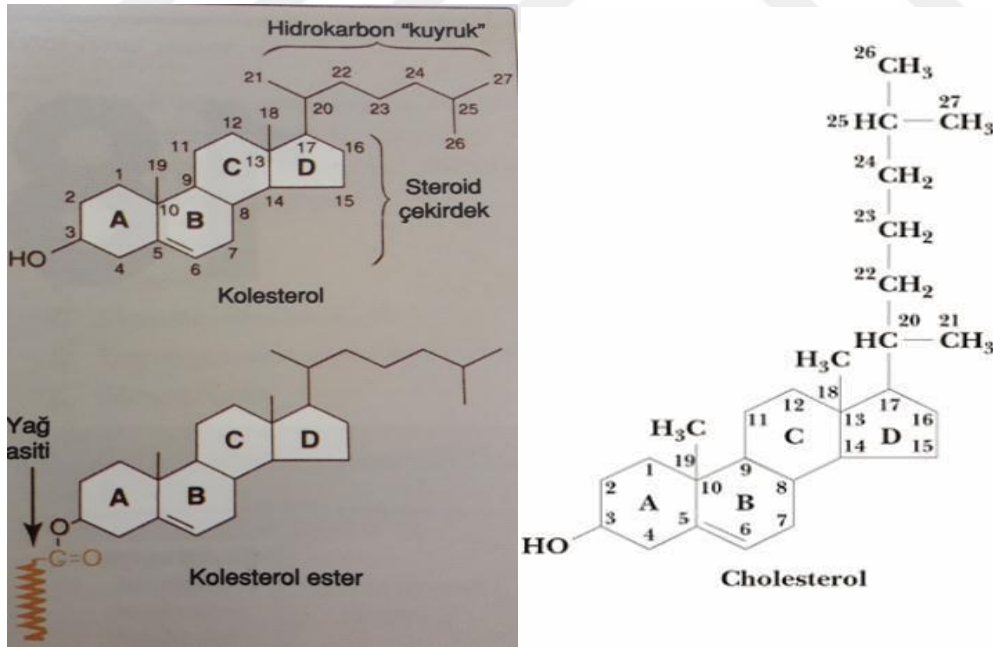
Yaptığımız bu çalışma sonuçlarının, literatürü destekleyeceğini ve yapılan diğer çalışmalara katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolesterol ve Yapısı

Kolesterolün biyolojideki rolü ve karakteri hakkında 18. yy Avrupasında bahsedilmiştir. Memelilerin normal hücre fonksiyonlarının devamlılığı için kolesterol önemlidir. Bu gerekliliğin, steroller ya da ekstra sellular yapı gibi endojen biyosentezi tarafından karşılanabileceği bildirilmektedir (Yeagle, 1985). Çok sayıda önemli fonksiyona sahip olan kolesterolün, hücre membranında bulunduğu ve hayvan kan plazması içerisinde taşınan steroid bir lipid olduğu belirtilmiştir. Ayrıca membran geçirgenliği ve akışkanlığının dengede kalmasına yardımcı ve hücreler arası sinyalizasyona destek veren, memeli plazma zarının önemli bir bileşeni olduğu da eklenmiştir (Saez ve ark., 2010).

Kolesterol dengesinin düzenlenmesinde en önemli işlevi olan karaciğere (KC) birçok kaynaktan kolesterol taşındığı ifade edilmektedir. Bunlar; besinsel olarak alınan kolesterolün yanı sıra KC'nin kendisinde sentezlenen ve KC dışı dokularda de novo olarak sentezlenen kolesterol kaynakları olarak belirtilmiştir (Champe ve ark., 2007).



Şekil 1. Kolesterolün yapısı (Champe ve ark., 2007)

Hidroforik bir bileşik olan kolesterolün, soldan sağa doğru okunan dört halkanın (A, B, C, D; steroid çekirdek) kaynaşmasıyla ve D halkasının 17. karbonuna

tutunmuş 8 karbonlu dallanmış hidrokarbon zincirinden meydana geldiği belirtilmiştir (Şekil 1). Bu halkanın çoğunlukla steroid halka sisteminin bir konformasyonu olduğu ifade edilmiş ve bu yapının halkaya düz bir görünüm kazandırdığı bildirilmiştir (Yeagle, 1985).

Ayrıca kolesterolün, steroid hormonlardan 5 ana sınıfın öncül maddesi olduğu belirtilmiş ve bunlar; progesteron, glukokortikoidler, mineralokortikoidler, androjenler ve östrojenler olarak bildirilmiştir (Sözbilir Bayşu ve Bayşu, 2008).

Hidrofobik bir yapıda olan kolesterol, normal koşullarda kanda çözünmez. Kolesterolün kanda çözünebilmesi ve taşınabilmesi için karaciğerde, HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) ve LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) proteinleri ile paketlenildiği bildirilmiştir. HDL, KC'de üretilen, yüksek oranda protein içeren ve vücuttaki dokulardan KC'ye kolesterol taşıyan bir lipoprotein sınıfıdır. LDL, KC'de, diğer doku ve hücrelerde üretilen kolesterolü, ihtiyacı olan doku ve hücrelere taşımakla görevli lipoproteindir. Yapısında lipidlerin dışında, apolipoprotein-B100 (ApoB-100) ve apolipoprotein E (apoE) mevcuttur (Bayram ve ark., 2016). LDL reseptörünün, kan dolaşımındaki LDL sirkülasyonunun temizlenmesi ve aynı zamanda SREBP (sterol regulatory element-binding protein) yani sterol bağlayıcı protein yolları tarafından düzenlenen, kolesterol metabolizmasındaki diğer proteinlerle ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Zhang ve ark., 2016).

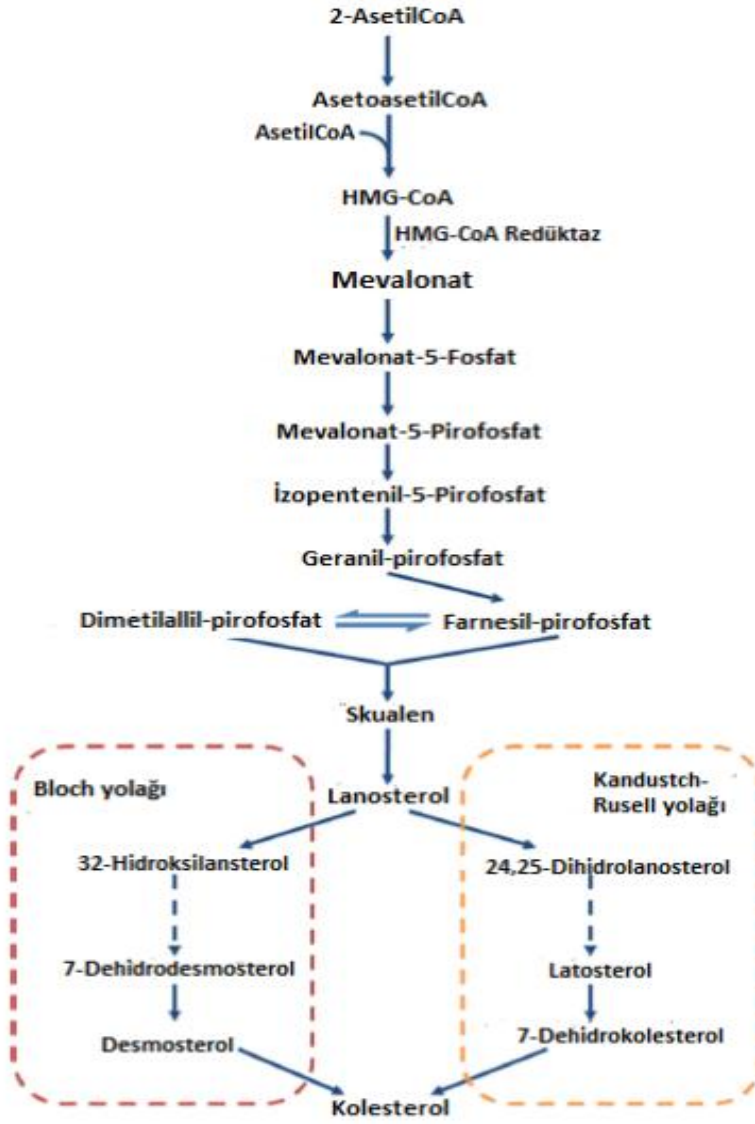
Hayvan dokularındaki başlıca sterol olan kolesterolün insanlar tarafından bazı bitki sterollerinden emiliminin yetersiz olduğu ifade edilmiştir. Enterositlere alındıktan sonra intestinal lümene geri taşınan bitki sterollerinin besinsel olarak kolesterolün emilimini engellemiş olduğu verilen bilgiler arasındadır. Böylece bitki sterollerinin hiperkolesteroleminin diyet yoluyla tedavisinde kullanılabileceği öngörülmüştür (Champe ve ark., 2007).

2.1.1. Kolesterol Biyosentezi

Kolesterol kaynağı olarak, karaciğer, barsak, adrenal korteks ve yumurtalık, testis, plasenta gibi üreme dokuları vücuda yüksek katkı sağlasalar da kolesterol vücutta ki tüm dokularda sentezlenmektedir (Champe ve ark., 2007). Kolesterolün diyet kaynaklı olabilmesi dışında, karaciğer başta olmak üzere; barsak, adrenal korteks ve beyinde Asetil-CoA'dan sentezlendiği bildirilmiştir. Serbest ve ester (KC, adrenal korteks, barsak mukozası ve plazmada ki mevcut enzimler tarafından esterleştirilmiş)

halde olabildiği ifade edilmiştir. Bu esterleşmenin, serbest kolesterolü kolesterol esterlerine çeviren LCAT (lesitin kolesterol akiltransferaz) enzimi ile katalizlenmekte olduğu bildirilmiştir (Karagül ve ark., 2000). Sentezlenen kolesterolün büyük bir kısmının lenf ve kan plazmasında bulunduğu ifade edilmektedir (Sözbilir Bayşu ve Bayşu, 2008). Kolesteroldeki karbonlarında yağ asitlerinde olduğu gibi asetat moleküllerince sağlandığı bildirilmektedir. Ayrıca sentezin sitozoldeki ve endoplazmik retikulum membranındaki enzimlerle beraber sitoplazmada gerçekleştiği belirtilmiştir (Champe ve ark., 2007; Sun ve ark., 2015).

Sentez aşamasında, iki mol asetil CoA birleşerek asetoasetil CoA' yı ve üçüncü bir asetil CoA eklenmesiyle de altı karbonlu 3-Hidroksi-3-metilglutaril CoA (HMG CoA) bileşiğinin oluştuğu belirtilmiştir. Sentez basamaklarının, kolesterol yoğunluğunda ki değişimlere duyarlı olduğu ve vücutta, sentez hızını atılım hızına göre ayarlayıcı mekanizmaların olduğu ifade edilmiştir. Daha sonra hız sınırlayıcı basamak olan HMG CoA redüktaz tarafından katalizlenme aşaması gelir (Şekil 2). HMG CoA redüktaz'ın transkripsiyonunun 1 ve 2 proteaz tarafından ucu kesildikten sonra Golgi aygıtı tarafından yeri değiştirilen SREBP tarafından kontrol edildiği bildirilmektedir. Sitozolda meydana gelen bu basamakla beraber, ajan olarak kullanılan iki molekül nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'ın kullanıldığı ve CoA'nın salınımı ile de basamağın geri dönüşümsüz hale geldiği ifade edilmekte ve sonucunda kolesterol öncülü olan mevalonik asit (mevalonat) oluşumu gerçekleşmektedir (Champe ve ark., 2007; Hu ve ark., 2010; Kangalgil ve Canbolat, 2016; Zhang ve ark., 2016).



Şekil 2. Kolesterol biyosentezi (Sun ve ark., 2015)

Dengeli bir diyetle alınan kolesterolün, karaciğerdeki endojen kolesterol hızı ve hücrelerde kolesterol kullanım hızı ile koordine edildiği belirtilmektedir. Bu mekanizmanın, kan dolaşımındaki kolesterol taşınmasında sorumlu olan LDL'ler için çok önemli olan belirgin bir reseptörü yani LDL reseptörünü kapsadığı da ifade edilmiştir (Karagül ve ark., 2000).

2.1.2.Kolesterolün Yıkımı

Yapısı itibari ile kolesterolün, insanlarda, karbondioksit ve suya metabolize edilemediği için yapısı türlere göre değişim gösteren safra asitlerine dönüşerek yıkıldığı bildirilmiştir. 24 karbon içeren safra asitleri 2 veya 3 hidroksil grubu ve 1 tane de karboksil grubu olan yan zincire sahip oldukları belirlenmiştir. pK_a değeri 6 olduğu için tam iyonize olmadıkları ve bu yüzden de “safra asiti” olarak isimlendirildikleri ifade edilmektedir (Champe ve ark., 2007; Sözbilir Bayşu ve Bayşu, 2008).

Belirtilene göre genel olarak sterol yapısı, dışkı ile atılmak üzere safra asitleri ya da safra tuzlarına dönüştürülür. Safra tuzlarının kolesterol yıkımı üzerine retroregülatör bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bazen de atılmak üzere barsağa taşınarak safra içine kolesterol salınımı ile vücuttan atılır. Safra ile salınan safra tuzlarının enterohepatik yolla karaciğere geri dönüşü engellenirse kolesterolün yıkımının hızlandığı ifade edilmiştir. Barsakda bulunan kolesterolün birazının atılmadan önce bakteriler tarafından değiştirildiği belirtilmiştir. Bu değişim yoluyla oluşan koprostanol ve kolestanolün kolesterol ile beraber başlıca dışkı sterollerini oluşturdukları bildirilmiştir (Karagül ve ark., 2000; Sözbilir Bayşu ve Bayşu., 2008).

Safra asitlerinin sentezi sırasında kolesterolün B halkasının çift bağı indirgenir ve zincirin sonuna bir karboksil grubu eklenirse, zincir 3 karbon kısalır. Oluşan bu bileşikler birincil safra asitleri olarak isimlendirilir. Bu noktada önemli olan sentez sırasında hız belirleyici olarak steroid halka yapısının 7. karbonuna hidroksil eklenmesidir. Bu eklenme yalnızca karaciğerde bulunan kolesterol-7-*a*-hidroksilaz tarafından gerçekleştirilir. Enzim kolesterol tarafından uyarılır, kolik asit (safra asiti) tarafından da baskılanır (Karagül ve ark., 2000; Önür ve Beyler, 2001; Champe ve ark., 2007; Nguyen ve Bouscarel, 2008).

2.1.3. Hiperkolesterolemi

Hiperkolesterolemi kandaki yüksek lipidleri örneğin; kolesterol, trigliserid ve fosfolipidleri belirleyen patolojik bir durum olarak ifade edilmektedir (Santini ve Novellino, 2016). Hiperkolesteroleminin sık görülen hastalıklar açısından yüksek risk faktörüne sahip olmasının yanı sıra kötü meni kalitesi ile birleşerek erkekte kısırlığa öncülük edebileceği de belirtilmiştir (Saez ve ark., 2010). Hiperkolesteroleminin, kolesterolün kan damarları duvarında depolanmasına neden

olduğu ve farklı dokusal depolara da (ksantom) ortam hazırladığı bildirilmiştir (Karagül ve ark., 2000).

Hiperkolesterolemi kardiyovasküler hastalıklar ve diğer metabolik rahatsızlıklar için dikkate alınması gereken önemli bir risk faktörüdür. Ailesel ve edinsel (aşırı yağlı diyetlerle sonradan oluşan) hiperkolesterolemi şeklinde bahsedilmektedir (Bayram ve ark., 2016). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile LDL-C'nin (düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol) damar sertleşmesi ile doğrudan bir ilişkisi olduğu ortaya konmuştur. Deney hayvanlarında yapılmış olan çalışmalarla, hiperkolesterolemi ve kalp-damar hastalıklarında özellikle yoğunlaşılması gereken parametrenin artmış LDL kolesterolü olduğu vurgulanmıştır (Çomak ve ark., 2016). Başka hiçbir risk faktörü olmaksızın $\geq 4,14$ mmol/l olarak sınır kabul edilen bundan yüksek olan LDL-C değerlerinin düşürülmesi gerektiği belirtilmiştir. Doymamış yağ asitleri, lifli gıdaların tüketimi ile ilerleyen diyet modifikasyonları, düzenli fiziksel aktivite ve yaşam tarzındaki sağlıklı değişimler tüm bu metabolik rahatsızlıkların primer yardımcı tedavi şekli olarak öngörölmüştür. Hiperkolesterolemi durumunda, kan lipidlerini düşürmek için gerekli temel besin stratejisi, dengeli bir diyet profili oluşturmaktır (Heinz ve ark., 2016).

Farmakolojik olmayan ancak tıbbi açıdan yararı olan gıdaları, tedavi amaçlı seçmenin artan hiperkolesterolemi durumlarında mümkün olduğu belirtilmiş ve organ hasarlarına kanıt olmayan, orta ya da düşük risk faktörünü temsil eden hafif hiperkolesterolemide bu gıdaların önemli bir etki yapacağı düşünölmüştür. Ancak kandaki kolesterol, trigliserid ve yağ fosfolipidlerinin yüksek miktarına bağlı olarak belirlenen hiperkolesterolemi patolojik bir durumdur (Santini ve Novellino, 2016).

Hiperkolesterolemi ile bozulan damar basıncı ve endotel yapısının iyileştirilmesinde L-arjini'nin etkisi olup olmadığı araştırılmış çalışmalar bulunmaktadır. L-arjinin verilmesinin endotel-bağımlı rahatlatıcı faktör (EDRF) sentezini artırabileceğini ve dolayısıyla hiperkolesterolemide endotele bağlı damar genişlemesini artırabileceği düşünölmüş. Bu düşünceler sonunda elde edilen verilerde L-arjininin hiperkolesterolemik insanlardaki dirençli damarlarda endotele bağlı vazodilatasyonu arttırdığını gösteren sonuçlar ortaya konmuştur (Arcaro ve ark., 1995).

Canlı dokuların iç yüzünü saran endotel hücreleri zedelenmelere oldukça fazla maruz kalmaktadır. Bu maruziyette yağlar, immunbileşikler, mikroorganizmalar ve

toksinler kan damarları bütünlüğünü ve kan bileşimi homeostazisini bozarak başrolü üstlenmişlerdir. Bu zedelenmelerde nitrik oksit gibi koruyucu moleküllerin salınımının azalmasıyla yaralı damar bölgesinin en iç katmanında kan pulcukları, monositler, nötrofiller, kolesterol gibi damar içi yoğunluğu arttıran moleküller birikmeye başlar. Nitrik oksit yeteri miktarda bulunmuyorsa düz kas hücre aktivasyonu artırılarak durum atheroklerozise kadar ilerleyebilmektedir. Bu bilgiler ışığında, hiperkolesteroleminin ve atherosklerozisin endotel işlevini bozarak ilerlemekte olduğu ifade edilmektedir (Li ve Försthermann, 2000).

Yüksek kolesterol tedavisin de HMG-CoA redüktaz inhibitörleri olarak bilinen statinlerin genelde kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı olarak görev almakta olduğu bildirilmektedir. Statinler kardiyovasküler riskin azaltılmasında etkili olduğu ispatlanmış, bilinen bir ilaç sınıfı olarak ifade edilmektedir. Statinlerin HMG-CoA' yı geri dönüşümlü olmak üzere inhibe ederek, kandaki total kolesterolü, LDL'yi ve trigliserid düzeyini düşürdüğü ve HDL kolesterol seviyesinin artmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Statinlerin bu düzenleyici etkiyi hepatositlerin membranlarında bulunan LDL reseptörlerinde daha fazla regülasyona yol açarak karaciğerin LDL ve VLDL (çok düşük yoğunluklu lipoprotein) alımını artırarak gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Arcaro ve ark., 1995).

2.2. Probiyotikler

2.2.1. Probiyotik Tanım ve Tarihçesi

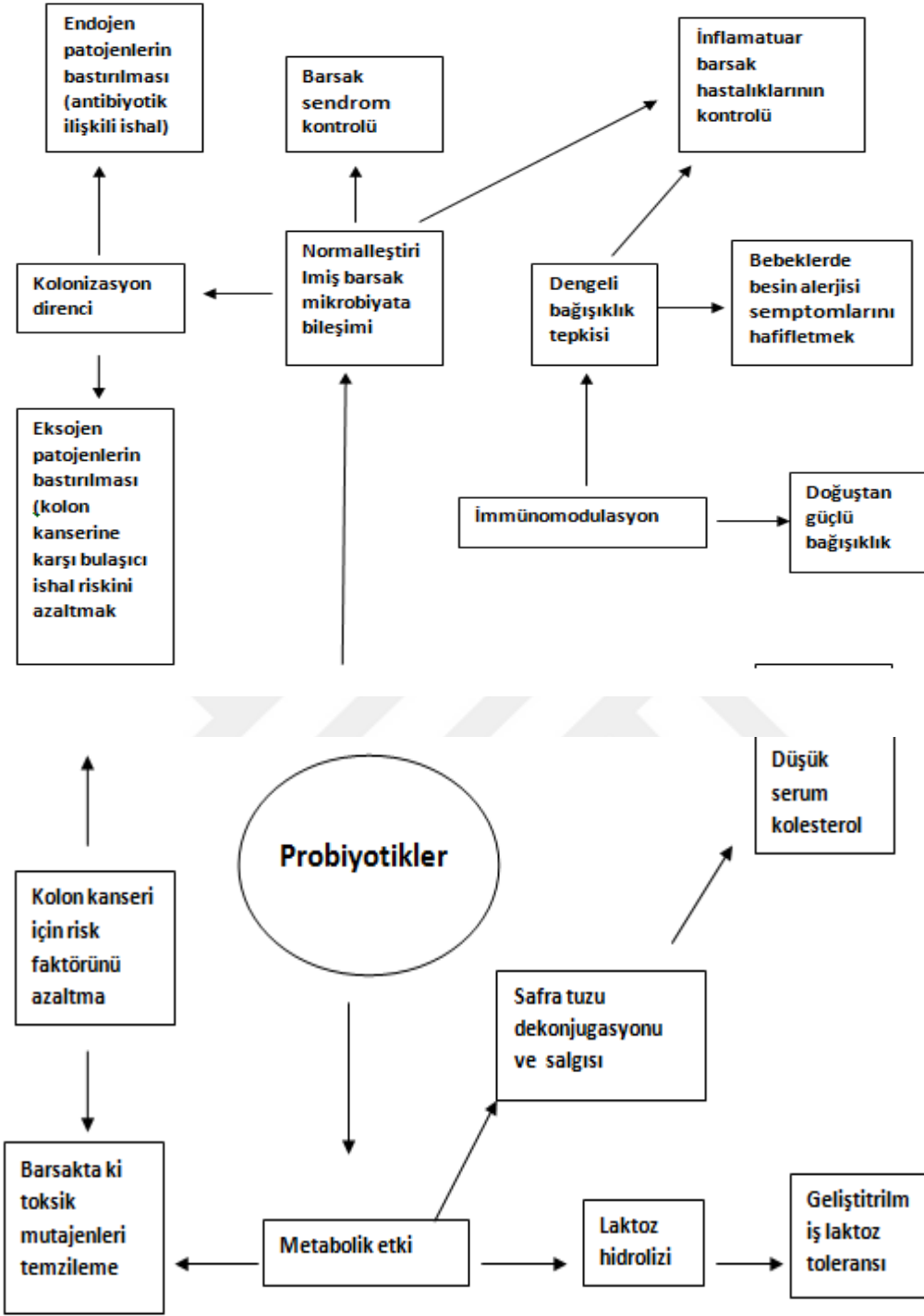
Kelime olarak Probiyotik 1953'de Alman araştırmacı Werner Kollath tarafından "yaşam için gerekli olan aktif maddeler" olarak tanımlanmıştır. 1965' de Lilly ve Stillwell tarafından "diğer mikroorganizma gelişimlerini sağlayan bir organizma tarafından salgılanan maddeler" olarak tanımlanmıştır. Daha sonra 1992' de Fuller tarafından; "barsak flora dengesini geliştirerek, konakçı hayvana iyi yönde etki eden canlı mikrobiyal yem takviyesi" olarak tanımlanmıştır. Probiyotik çalışmalarının modern hikayesine ise 1900'lü yılların başlarında Parisdeki Pasteur Enstitüsünde çalışan Rus araştırmacı Mikrobiyolog Elie Metchnikoff nobel ödülü alarak öncülük etmiştir (Barefoot ve Klaenhammer, 1983; Schrezenmeir ve De Vrese, 2001; Gasbarrini ve ark., 2016).

Aslında probiyotik teriminin bazı organizmaların büyümesini uyaran, farklı bir organizma tarafından üretilmiş bir içerik olduğu ifade edilmiştir. Probiyotik ürünlerin

özellikle yoğurt (*Acidophilus* ve *Bifidus*) üretiminin ve bunların pazarlanmasının son yıllarda dünya çapında büyük bir artış gösterdiği belirtilmiştir. Probiyotiklerin bilimsel geçerliliğinin belirlenmesinde mikroorganizma-konakçı ilişkisinin yapıldığı yardımcı çalışmaların endüstri ve sağlık sektörü ile önemli bir bağlantısı olması gerektiği ifade edilmektedir. Laktik asit üreten bakteriler (LAB) probiyotiklerin temel bileşeni olarak belirtilmiştir ve yapılan bu temel çalışmaların da sağlık sektöründe bu bakterilerin yönünü belirleyeceği düşünülmüştür (Fuller ve Gibson, 1997; Tannock, 1997).

Probiyotiklerin, bağışıklığı modüle etmek, kolesterolü düşürmek, romatoid artrit tedavisinde kullanmak, kanseri önlemek, laktoz intoleransını iyileştirmek ve atopik dermatitin etkilerini önlemek veya azaltmak gibi durumlarda terapötik olarak kullanılmakta olduğu eskilerden günümüze kadar gelen bilgiler arasındadır (Reid, 1999).

Yıllar boyunca, probiyotik ve prebiyotiklerin serum kolesterol düzeyleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için hayvan ve insan modellerinin kullanılması vurgulanmıştır. İnsan çalışmaları, köklü probiyotiklerin veya prebiyotiklerin hipokolesterolemik etkilere sahip olduğuna dair umut verici kanıtlar ortaya koyarken yeni probiyotik türleri veya yeni prebiyotikler hayvan modellerinde potansiyel hipokolesterolemik etkileri açısından değerlendirilmiştir. Birçok çalışmada, kolesterol ve safra asidi metabolizması, plazma lipoprotein dağılımı ve hepatik kolesterol enzimlerinin düzenlenmesi açısından insanlar ile benzerlikleri nedeniyle sıçanlar, fareler, hamsterler ve domuzların model olarak kullandığı belirtilmiştir. Bu hayvanların, insanlar ile benzer bir sindirim anatomisi ve fizyolojisi, besin maddesi gereksinimleri, biyoyararlanım ve absorpsiyon gibi benzer metabolik süreçler paylaştığı bilgisi onları araştırma uygulamaları için faydalı deneysel modeller haline getirmiştir. Dolayısıyla canlı hayvan çalışmalarında gösterilen pozitif hiperkolesterolemik etkilerin, insanlarda da benzer bir potansiyelin var olabileceğini düşündürmüştür (Ooi ve Liong, 2010).



Şekil 3. Probiotik tüketiminin sağlık için yararları (Parvez ve ark., 2006)

2.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri

Laktik asit bakterileri mukozal ve sistemik bağışıklığı etkilemelerinin yanı sıra mukoz membranlar ve sindirim kanalında kolonize olabilmekte ve mukoz maddeden salgılanan müsin içeriğini enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar. İntestinal sistemde canlı olarak devam edebilmeleri için sindirim enzim ve safra tuzlarına dayanıklı yapıda olabilmeleri gerekir. Aynı zamanda sistemde patojenlerin tutunma yerlerine tutunarak, onların kolonize olmasını engellediği ve patojenlerin kolonizasyonu için gerekli besin kaynaklarını tüketerek onların yaşam direncini kırdıkları bildirilmektedir (Fuller, 1989; Çakır ve Çakmakçı, 2004).

Aynı zamanda, fermantasyon yaparak laktik asit ve asetik asit oluşturdukları ve ortam pH'sını düşürerek patojenlerin üremesini engelledikleri ifade edilmektedir. Laktik asit bakterileri yaşamın birçok alanında karşımıza çıkabilir. Bu alanlar fermante yiyecek ve içeceklerde, toprakta, ağız boşluğunda, mukozal membranlarda barsak ve vajinal flora olarak belirtilebilir. Hemen hepsi gram-pozitif reaksiyon verirler ve istisnalar hariç spor oluşturmazlar. Morfolojik olarak kok ve çubuklardan oluşan uzunlukları farklı zincir şeklinde oldukları ifade edilmiştir (Du Toit ve ark., 2003; Parvez ve ark., 2006; Fuller ve Gibson, 1997).

LAB'lar; *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* grupları dahil olan birçok alt cinsleri de içerirler. LAB'ların, fermantasyon kabiliyetlerinin yanı sıra sağlık ve besinsel yararlarına göre endüstriyel olarak da oldukça önemli organizmalar olduğu vurgulanmaktadır. Bu organizmaların tahıllardan, yeşil bitkilerden, süt ve et ürünlerinden, sebze fermantasyonundan ve hayvanların mukozal yüzeylerinden izole edildiği bildirilmiştir. Aynı zamanda laktik asit fermantasyonu boyunca organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit ve bakteriyosin ya da bakterisit proteinleri gibi çeşitli bileşikler ürettikleri de belirtilmiştir. Bu bileşiklerin yalnızca gıdanın tadı, kokusu, rengi ve yapısı için gerekli olmadığı aynı zamanda istenmeyen mikroflorayı da engelledikleri ifade edilmiştir (Barefoot ve Klaenhammer, 1983; Martin ve ark., 1999; Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn, 2010).

LAB'lar, agregasyon yani toplanma, kümeleşme özellikleri ile birbirlerine sıkıca bağlanarak biyolojik bir bariyer oluştururlar. Aynı zamanda koagregasyon özelliği (diğer mikroorganizmalara bağlanabilmek) ile üropatojenlere karşı rekabet

ettiği de kaynaklarda ifade edilmiştir. Ürogenital bölgenin korunmasına yardımcı olabileceği ve özellikle patojen *E. coli*' yi inhibe edebileceği bildirilmiştir (Martin ve ark., 1999; Verdenelli ve ark., 2014).

Kullanılacak olan probiyotik suşlarının seçimi yapılırken, hayvan türlerine de dikkat edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Her probiyotik türünün etkilediği mikroflora farklılık gösterebilmektedir. Probiyotik seçiminde dikkat edilmesi gereken ayrı bir konu da antibiyotiklere dirençli olmaları gerektiğidir. Yani yiyeceklerine, büyümeyi teşvik edici antibiyotik eklenmiş çiftlik hayvanlarıyla beslenen insanların veya antibiyotik kullanmak durumunda kalan hastalık geçirmiş insanların barsak mikroflorasını yeniden düzenlemek için probiyotiklerin kullanılabileceği belirtilmektedir. Çünkü çiftlik hayvanları veya hasta insanların barsak mikroflorasında antibiyotik tortularının kalmış olabileceği düşünülmüştür. Zaten ekosistemde sadece antibiyotiğe dirençli suşların kolonize olabileceği gerçeği bu düşünceleri desteklemektedir (Tannock, 1997).

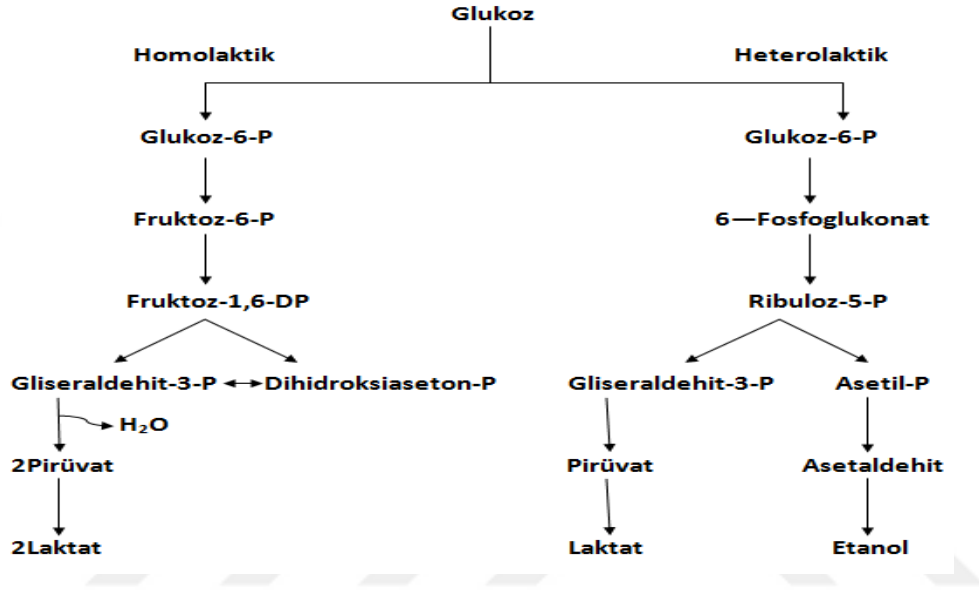
2.2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Metabolizması

Probiyotiklerin nasıl çalıştığının anlaşılabilmesi için sistemler içerisindeki mikrobiyolojisi ve fizyolojileri hakkında biraz bilgi edinmek gerektiği önemle vurgulanmaktadır (Parvez ve ark., 2006). LAB'nin karmaşık besin istekleri vardır. Büyümek için, aminoasit, peptidler, yağ asitleri ya da yağ asitleri esterleri, tuzlar, türetilmiş nükleik asitler, vitaminler ve karbonhidratlara ihtiyaç duyarlar. LAB metabolizmasının temel özelliği substrat düzeyinde fosforilasyon ile enerji üretebilen karbonhidratları etkili bir biçimde büyük basamaklar halinde fermante edebilme yetenekleridir. İki temel KH fermantasyon yolağı kullandıkları belirtilmiştir (Şekil 4). Homofermantatif LAB, Embden-Meyerhof yolağı üzerinden glukolizisi kullanırlar ve yalnızca laktik asidi üretirler. *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* ve bazı *Laktobasiller* homofermantatiflere örnektir. Ürünlerinin % 99'luk kısmı laktik asit, geri kalan %1'lik kısmı diğer bileşiklerdir. Heterofermantatif LAB'ler ise 6-fosfoglukonat/fosfoketolaz yolağını kullanırlar ve etanol, asetat, karbondioksit ve laktik asit üretirler. *Weissella*, *Leuconostoc* ve bazı *Laktobasiller* heterofermantatıklara örnek olarak gösterilmiştir. Ürünlerinin %70' lik kısmı laktik asit, %30' luk kısmı diğer bileşiklerdir (Fooks ve Gibson, 2002; Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn, 2010).

Homofermantatif yol:



Heterofermantatif yol:



Şekil 4. Laktik asit bakterilerinin glukoz fermantasyonu için genel şema (Parvez ve ark., 2006)

Lactobacilli'ler gram(+) bakterilerdir ve bu nedenle çoğunlukla peptidoglukan hücre duvarına sahiptirler. Sitokromları olmayan, katalaz-negatif (hem grupları olmayan), sporsuz, anaerobik yapıda, gram(+), safra asit toleranslı olarak tanımlanmış ve filogenetik olarak çeşitli gruplara bölünmüşlerdir. Şeker fermantasyonu ürünlerinin önemli sonucu olan laktik asit salgılayan, tam anlamıyla fermantatif bakterilerdir. LAB organik besin açısından zengin memeli barsak ve ürogenital sisteminde yüksek miktarda bulunur. LAB'lar, sitokrom, elektron taşıma sistemi (ETS), katalaz sistemlerinin eksiklikleri sebebiyle porfirin moleküllerini sentezleyemezler ve bu sebeple de oksidatif fosforilasyon ile enerji üretmezler (Rattanachakunsoopon ve Phumkhachorn, 2010).

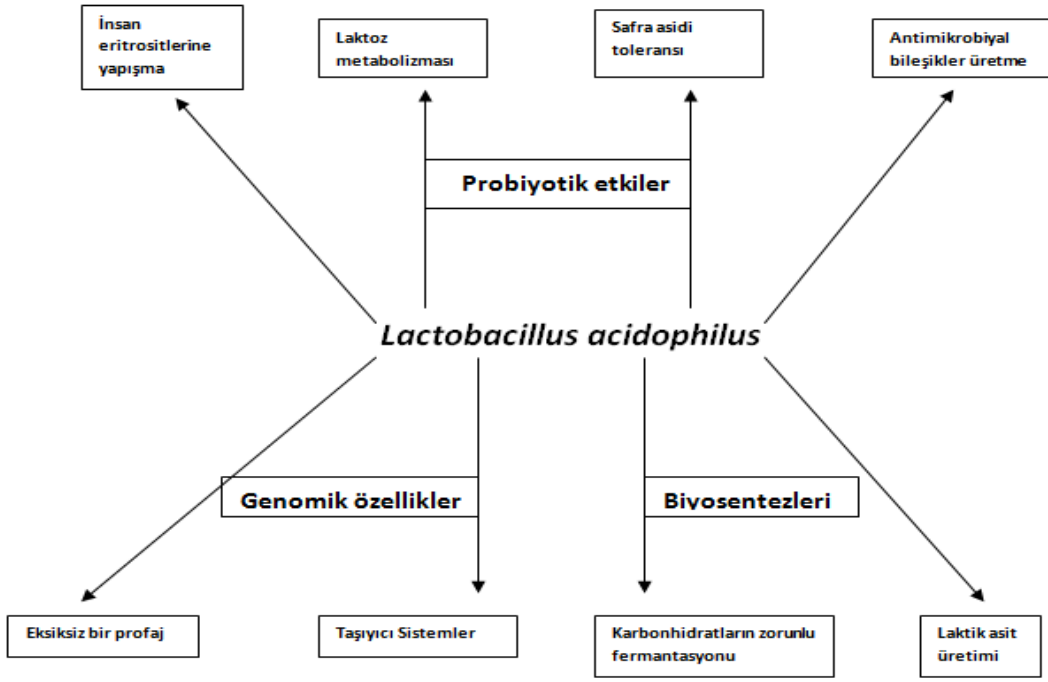
Bacillus alt türleri ve filamentli mantar (*Aspergillus oryzae*) ve mayaların *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces boulardii*, probiyotik preparatlarında kullanılan LAB'lar dışındaki diğer organizmalar olduğu bildirilmiştir. Probiyotik ürünlerin, fruktooligosakkaritler (FOS) ve probiyotik bileşimi dışında, *L. acidophilus*,

Bifidobacterium longum, *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecium* ve diğer organizmalar ile farklı formülasyonlarının mevcut olduğu belirtilmiştir. Bunlardan en yaygın olanları, FOS ile *L. acidophilus*, *L. acidophilus*, FOS ile *Bifidus longum* ve *Bifidus infantis* olarak ifade edilmiştir (Parvez ve ark., 2006).

Lactobacillus acidophilus ve *Bifidobakter'* lerin, enzimlerin antimikrobiyal etkisine, asitli ortama, yüksek oksidasyon redüksiyon potansiyeline ve düşük yüzey gerilimine diğer probiyotik bakterilere kıyasla daha dirençli olduklarından özellikle fermente süt ürünlerinde tercih edildikleri de verilen bilgiler arasındadır. Araştırma dünyasının “Yiyeceklerin bir kısmında bulunan canlı mikroorganizmalar yeterli miktarda tüketildiği zaman, konak hücre için sağlık yardımı sunar” düşüncesini genellediği belirtilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu genellemeyi tartışmak için yapılan araştırmalara bir sınırlama getirmiş ve yaklaşımlara bir netlik kazandırmak istemiştir. Bunun için de WHO, probiyotiklerin gıdalarda olması gerektiğini ve faydalı mikroorganizmaların ve bioteröpatik ajanlar bulunmayan gıdaların kullanımını öngörmediğini belirtmiştir (Morelli ve Capurso, 2012; Arief ve ark., 2016).

*Lactobacilli'*nin, immün sistem üzerine kolesterol azaltıcı, antitümör özellikli ve patojenik olmayan yollarla etki ettiği ifade edilmektedir (Fuller ve Gibson, 1997; Patel ve ark., 2016).

Araştırmacılar, endojen kolesterol sentezinin bastırılmasına ve diyetle alınan kolesterol absorpsiyonunun engellenmesine yardımcı olan laktik asit bakterilerinin, hiperkolesterolemiye etkisinin incelendiği birçok çalışmanın yapıldığını bildirmişlerdir (Park ve ark., 2007). *Lactobacillus acidophilus'*un, insan sağlığına yararlı olduğu için günlük fermente ürünlerin ve probiyotik destek ürünlerinin bir bileşeni olarak pazarlandığı ifade edilmiştir. *Lactobacilli'*nin aynı zamanda; antibiyotik kaynaklı ishalde, alerjik tedavilerde ve *Escherichia coli* (*E.coli*) antagonisti olarak, gastrointestinal enfeksiyonlarda önemle kullanıldığı vurgulanmaktadır (Şekil 5). (Patel ve ark., 2016).



Şekil 5. *Lactobacillus acidophilus*' un özellikleri (Patel ve ark., 2016)

2.3. Erkek Üreme Sistemi

Kolesterolün seks hormonlarının üretimi için önemli bir öncül etkisinin olduğu bilinmektedir. Özellikle gametogenez seviyesinde sperm fonksiyonlarını düzenleyici olduğu tanımlanmaktadır. Kolesterol dengesinin düzenlenmesinde posttestikular sperm olgunlaşmasının çok önemli olduğu vurgulanmakta ve dengesiz kolesterol seviyesinin özellikle posttestikular olayları etkileyebileceği belirtilmektedir. İndüklenen hiperkolesterolemiden sonra, testosteron serum dolaşım düzeyinin önemli derecede azaldığı gözlemlenmiştir (Martinez ve ark., 2011; Whitfield ve ark., 2015).

Erkeklerde yüksek kolesterol ve düşük testosteron konsantrasyonunun ateroskleroz için yüksek risk faktörü olduğu vurgulanmıştır. Kan basıncı ve sıvı dengesini düzenleyen hormonal sistem olan Renin-Anjiyotensin Sistemin biyo-aktif peptidlerinin gonadlarda lokalize olduğu belirtilmiştir. Bu peptidlerin sterogenezini düzenleyerek testosteron ve kolesterol arasında anahtar rol oynadığı bildirilmiş ve gerektiğinde testosteron üretimini de inhibe edebildiği ifade edilmiştir (Martinez ve ark., 2011).

Her bir memeli fetüsünün, hem erkek hem de kadın üreme sistemlerini geliştirme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. Erkek (wolffian) kanallarının farklılaşması ve kadınların mullerian kanallarının eşzamanlı gerilemesi için gerekli uyarının, androjenlerin ve diğer hormonların embriyonik testisler tarafından sentezlenmesi ve salgılanması ile mümkün olduğu ifade edilmiştir. Fetal testikular endokrin fonksiyonun yokluğunda veya testis tarafından salgılanan hormonlara cevap verme yeteneğinde erkek yolun başlangıcı dejenere olur ve kadın sistemin başlangıcı stabilize olur. Bu nedenle, erkeklerin cinsel farklılaşmasının, dişilerde yumurtalık gelişimi başlamadan önce başlatılan ve fetal testikular farklılaşmaya ve büyümeye bağlı aktif bir süreç olduğu ifade edilmektedir (Kaminski ve ark., 1999).

Erkeklerde testosteron ve kadınlarda östradiol olmak üzere gonadlar tarafından üretilen cinsel hormonların, cinsel farklılaşma ve gelişimin düzenlenmesinde anahtar hormonlar olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarda, cinsel hormonların serum konsantrasyonlarının, metabolik hastalıklarla, ruh hali bozukluğu ve kemik mineral yoğunluğu ile hatta ölüm ile birçok defa ilişkilendirildiği ifade edilmiştir. Erkek üreme sistemini, eşey hücrelerini üreten testisler ile bu hücreleri ileten; tubulus rektus, rete testis, epididimis, duktus deferens, eklenik genital bezler ve dış genital organ penis oluşturur (Kirk, 2011).

2.3.1. Testikular Doku ve Fonksiyon

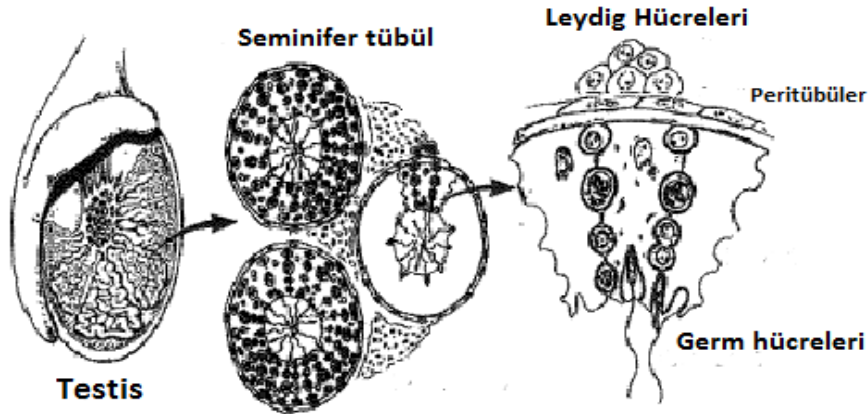
Erkeklerde eşeysel bez ya da eşey organı olan testisler oval bezimsi yapılardır. Karın boşluğunun sırt kısmında yer alırlar. Testisler doğumla beraber, kasık kanalı (inguinal kanal) yoluyla karın boşluğunun devamı olan skrotum içine yerleşirler. Skrotuma geçen testislerden sonra inguinal kanal bağ doku tarafından kapanır ve karın boşluğu ile skrotum arasında bağlantı kesilmiş olur. Testisin önemli yapılarından olan seminifer tübüllerin işlevini yerine getirebilmesi adına testisin skrotum içine inmesi oldukça önemli bir olaydır. Çünkü seminifer tübüllerin karın sıcaklığında işlevini yerine getirmesinin mümkün olmadığı belirtilmekte olup yerine yetişkin bir insan testisinin ortalama hacminin 30 ml olduğu ve ortalama 200-300 bölmeye ayrıldığı, her lobül de 1-3 seminifer tübül bulunduğu bildirilmiştir (Lira Neto ve ark., 2016). Memelilerde testis yapılanmasının iki önemli işlevi mevcuttur. İlkinin ön hipofizden gelen ve lüteinizan hormon yanıtı olan özellikle testosteron ve androsteron salınımı olduğu belirtilmiştir.

İkinci olarak da spermatogenez ile spermatozonların üretimini sağlamak olduğu ifade edilmiştir (Yılmaz, 1999; Lim ve ark., 2015).

Testis, erkek gametleri ve seks hormonları olan androjenlerin üretiminden sorumlu olan yapılandır. Spermatogenez, gametlerin üretimi ile ilgili sürecin tamamını kapsar ve tanımlar. Steroidogenez ise erkek steroid hormonların üretiminde rol alan başlıca enzimatik reaksiyonlardan bahseder. Spermatogenez ve steroidogenezin morfolojik ve fonksiyonel olarak birbirinden ayırt edilebilen iki farklı bölmede gerçekleştiği belirtilmiştir. Bunların seminifer tübüller arasındaki interstitiyal bölmeler ve seminifer tübüllerden oluşan tübüller bölmeler olduğu bildirilmiştir. Anatomik olarak ayrı olmakla beraber aynı zamanda birbirleriyle sıkı sıkıya bağlı bölmelerdir (Şekil 6). Çünkü sperm normal üretiminde nitel ve nicel olarak her iki bölmenin de bütünlüğünün gerekli olduğu ifade edilmiştir. Testislerin ve dolayısıyla bu bölmelerin fonksiyonları hipofiz bezi ve hipotalamus tarafından yönetilmektedir (Weinbauer ve ark., 2010).

Ergenlik döneminde salgılanan testosteron, sperm üretiminin başlamasını ve ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişimini sağlamaktadır. Erişkin canlılarda bu sperm üretiminin devam etmesi, ikincil cinsiyet karakterlerinin korunması ve yardımcı bezlerin fonksiyon görebilmesi, testis yapısının sağlıklı olma durumuna bağlı olduğu bilinmektedir (Nair ve Rajamohan, 2014).

Steroidlerin biyosentezi ve spermatozoa üretimi, gonadotropinler ve çok sayıda yerel olarak üretilen faktörler tarafından sıkı kontrol edilen memeli testisin iki önemli fonksiyonudur (Carreau ve ark., 2011).



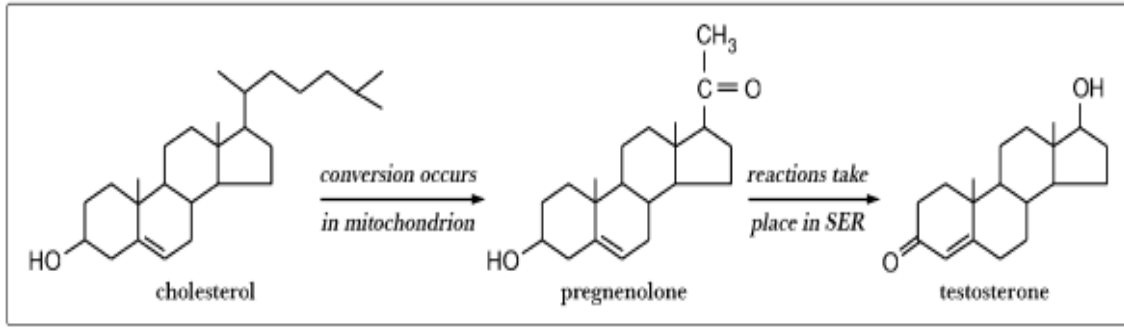
Şekil 6. Testikular doku ve hücreleri (Skinner ve ark., 1991)

2.3.2. Leydig Hücreleri

Testis içerisinde yer alan interstitiyal bölmelerdeki en önemli hücrelerin leydig hücreleri olduğu ifade edilmiştir. Bu hücrelerin testiküler testosteron kaynağı olduğu belirtilmiştir. Leydig hücrelerini kapsayan interstitiyal bölmelerin, immün hücreler, kan ve lenf damarları, sinirleri, fibroblastları ve gevşek bağ doku içerdiği belirtilmiştir. Deney hayvanlarında bu bölmenin, total testikular hacmin yaklaşık %2,6'sını kapsadığı bildirilmiştir (Weinbauer ve ark., 2010).

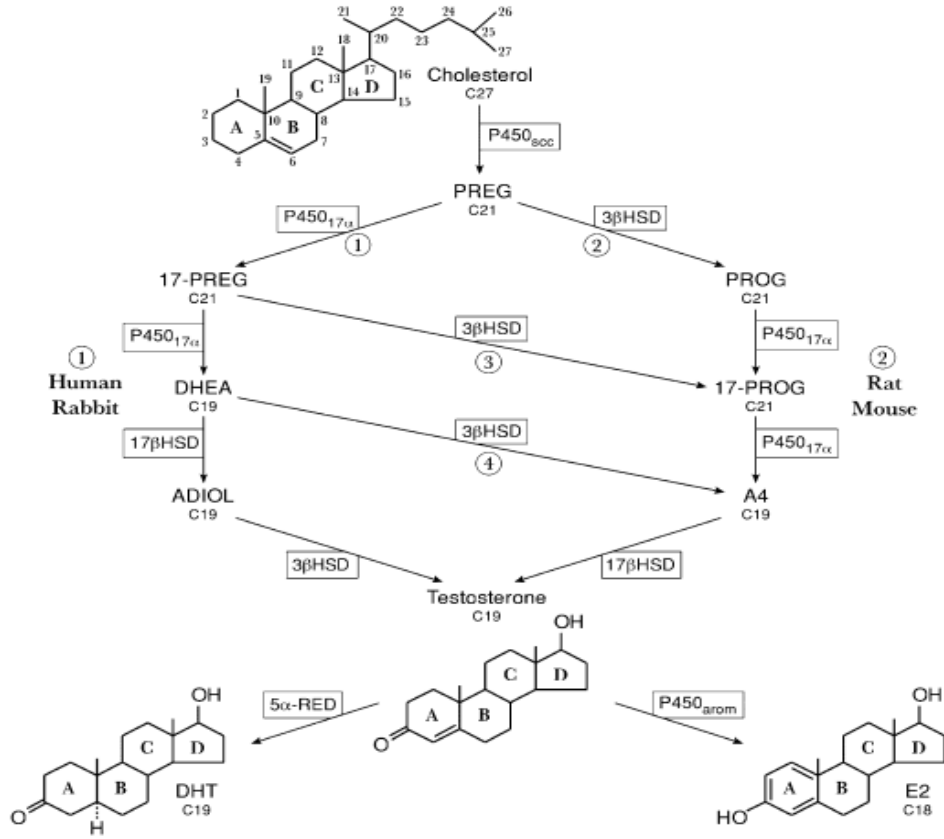
Leydig hücreleri 1850'de Franz Leydig tarafından isimlendirilmiştir. Bu hücreler en önemli cinsiyet hormonu olan testosteronu üretir ve salgırlar. Aynı zamanda interstitiyal immün sistem hücresi olan makrofaj ve lenfosit hücrelerini de içerdiği bildirilmiştir. Erişkin testiste, leydig hücrelerinin perivasküler ve peritübüler mezankimal benzeri hücrelerden geliştiği ve bu hücrelerin leydig hücrelerine farklılaşmasının LH tarafından indüklendiği ancak aynı zamanda sertoli hücrelerinden türetilen büyüme faktörleri ve farklılaşma faktörleri tarafından da tetiklendiği ifade edilmektedir. Testosteron yetişkin erkeklerde sperm üretiminin ve erkek sekonder cinsel özelliklerin korunması için gereklidir. Olgun erkeklerde testosteron öncelikle testikular leydig hücreleri tarafından üretilir (Guo ve ark., 2013).

Leydig hücrelerinin temel işlevinin, androjenik steroidleri sentezlemek ve salgılamak olduğu bildirilmiştir. Androjen biyosentezi sürecinde gerekli olan dört enzim, sitokrom P450 kolesterol yan zincir bölünme enzimi (P450_{scc}), 3 β hidroksisteroid dehidrogenaz / Δ 5-4 izomeraz (3 β -HSD), sitokrom P450 17 α -hidroksilaz (P450_{17 α}) ve 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (17 β -HSD) olarak bildirilmiştir. Leydig hücreleri testisin P450_{scc} ve 3 β -HSD içeren tek hücreleridir. Bu nedenle, leydig hücrelerinin tüm steroid hormonları için substrat olan kolesterolü, pregnenolona ve pregnenolondan da progesterona dönüştürdüğü bilinmektedir. Bundan sonra P450_{17 α} ve 17 β -HSD'nin katalitik aktiviteleri ile steroidogeneziste nihai ürün olan testosterona dönüştüğü bildirilmiştir (Şekil 7). (Kaminski ve ark., 1999; Yao ve ark., 2002; Dong ve Hardy, 2004; Chen ve ark., 2009).



Şekil 7. Kolesterolden testosteron sentezi (Dong ve Hardy, 2004)

Bütün türlerde, androjen biyosentezindeki ilk adımın, kolesterolün, iç mitokondriyal membranda bulunan P450scc tarafından katalize edilen pregnenolona dönüştürülmesi olduğu ifade edilmiştir (Hu ve ark., 2010). Bu reaksiyonun ayrıca, adrenodoksin ve adrenodoksin redüktazdan oluşan bir mitokondriyal elektron transfer sistemine ihtiyaç duyduğu ve elektronları NADPH'dan P450scc'ye kadar ilettiği belirtilmiştir. P450scc enziminin, kolesterolün üç ardışık oksidasyon reaksiyonunu katalize ettiği, her reaksiyonun bir O₂ molekülü ve bir molekül NADPH gerektirdiği bildirilmiştir. İlk reaksiyon, 22. karbonda hidroksilasyon ve bunu takiben yirminci karbonunda hidroksilasyona tabi tutularak 20.C ve 22.C' arasında bölünerek 21.C da steroid pregnenolon, izokaproaldehit ve hidroksikolesterol elde edilmesidir. İzokaproaldehit kararsızdır ve hızla izokaproik aside oksitlenir (Black ve ark., 1994; Davidoff ve ark., 1996). Steroid hormonların sentezindeki hız sınırlayıcı adımın, intraselüler kaynaklardan ön mitokondriyal zarın öncü kolesterolünün taşınmasından sonra kolesterolün P450scc'nin katalitik bölgesine yüklenmesi olduğu bildirilmiştir. Hidrofobik kolesterolün, mitokondriyumun sulu membranlar arası alanını geçemediği ve akut steroid sentezini desteklemek için basit difüzyonla P450scc'ye yeterince hızlı ulaştığı da verilen bilgiler arasındadır. Böylece, kolesterolün taşıyıcı proteinler tarafından harekete geçirildiği ifade edilmiştir. Steroidogenik akut yanıt (STAR) proteini ve periferik benzodiazepin reseptörü (PBR), mitokondriye kolesterol salınımına katılır. STAR öncelikle gonadotropin uyarılmış transferde bulunur. Steroidogenez için ham madde olan kolesterol, dolaşımdaki lipoproteinden elde edilir yani LDL insanlarda birincil kaynaktır (Şekil 8). (Zirkin ve Chen, 2000; Dong ve Hardy, 2004).



Şekil 8. Kolesterolden testosteron biosentezi aşamaları (Dong ve Hardy, 2004)

Testis organogenezinde kritik bir olayın da, sertoli hücreleri, peritubular miyoid hücreler ve leydig hücreleride dahil olmak üzere somatik hücre dizilerinin özelleşmesi olduğu bildirilmiştir. Bu hücrelerin testis morfolojisinin oluşturulmasında ve hormonların üretiminde oldukça önemli rol oynadığı ifade edilmiştir. Y kromozomundaki tek bir gen olan Sry (Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi) geninin, bu somatik hücre özelliklerinin farklılaşması için bir dizi sinyal yolağı oluşturduğu da verilen bilgiler arasındadır. Peritübüler miyoid hücrelerin farklılaşması ve buna bağlı testis bağlarının oluşumu, sertoli hücreleri tarafından üretilen bir sinyal proteini-yolağı olan Desert hedgehog (DHH) tarafından düzenlenir (Davidoff ve ark., 1996; Yao ve ark., 2002).

2.3.3. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri germinal epitelyumda bulunan somatik hücrelerdir. Bu hücreler bazal zar üzerinde bulunur ve seminifer tübül lümenine kadar uzanır ve geniş anlamda germinal epitelin destekleyici yapısı olarak düşünülebilir. Germ hücrelerini çevreleyerek dış bağlantıyı keserken, beslenme ve hormonal alışveriş için aracı görevi üstlendiği belirtilmektedir. Spermatozit ve spermatitleri halkasal şekilde onları çevreleyerek korumaktadırlar. Birbirlerine tutunarak oluşturdukları bu yapıya ‘‘Kan-Testis’’ bariyeri denilmektedir. Bu bariyer ile immün sistemin, sperm hücrelerini yabancı olarak algılayıp yok etmesinin engellenmiş olduğu ifade edilmiştir. Kan-testis bariyerinin, pubertede spermatogenez başladığı zaman oluştuğu bildirilmiştir. Sertoli hücresi, fonksiyonel bir testis gelişiminde ve dolayısıyla bir erkek fenotipinin ekspresyonunda merkezi bir rol oynar. Yine bu hücrelerin seminifer kord oluşumunu sağlayan, germ hücrelerinin mayoz evresine geçebilmesini ve Leydig hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan, fetal gonada ayırdedilebilir şekilde fark edilen ilk hücreler olduğu belirtilmektedir (Sharpe ve ark., 2003; Kaur ve ark., 2014; Lim ve ark., 2015).

Sertoli hücrelerinin, protein, sitokin, büyüme faktörü, opioid, steroid, prostaglandin, hücre bölünmesinin modülatörleri gibi çok çeşitli faktörleri sentezledikleri ve salgıladıkları belirtilmektedir. Griswold spermatogenez için önemli olan sertoli hücreleri tarafından salgılanan glikoproteinleri üç kategoriye ayırmıştır. İlk olarak, iyonların ve hormonların taşınmasını kolaylaştıran, biyo-koruyucu fonksiyonlar sağlayan transferin, serüloplazmin ve ABP; ikinci olarak, proteazlar ve proteaz inhibitörleri (bu proteinler; spermiyasyon veya prelepoten spermatozitlerin seminifer tübülün adluminal bölmesine hareketi sırasında oluşan doku yenileme süreçlerinde rolü vardır); son olarak da sertoli hücreleri ile peritübüler hücreler arasındaki temel zarın yapısal bileşenleri şeklinde ifade edilmiştir (Ravina ve ark., 2007; Sofikitis, 2008). Sertoli hücrelerinin bir diğer önemli fonksiyonu da, yetişkinlerde son testis hacmi ve sperm üretiminden sorumlu oldukları şeklinde bildirilmiştir. Sertoli hücre akışkanının %90'ından fazlasının tübül lümeninde salgılanmakta olduğu belirtilmiştir. Sertoli hücresi başına sperm sayısının türe bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir. Gap-junction (açıklık bağlantıları) proteini olan konneksin-43 eksikliğinin, spermatogenezini önleme ile bağlantılı olarak sertoli hücresi olgunlaşmasını engellediği bildirilmektedir. Sertoli hücrelerinin belirteçleri, transferrin, androjen bağlayıcı protein ve bağlantı

proteinlerinden olan, N-cadherin, connexin-43, gelsolin, laminin- γ 3, okluziv, testin, nektin ve vinculin' in androjen bağımlı oldukları ifade edilmektedir (Skinner ve ark., 1991; Weinbauer ve ark., 2010).

Spermatozoonların üretiminin gerçekleştiği seminifer tübüller, testis yapısının büyük bir kısmını kapsamaktadır. Seminifer tübüller ince ve bol kıvrımlıdır. İç yüzeyi germinal epitel hücreleriyle doludur. İşte spermatozoon (spermatogenez) oluşumu da bu ilkel germinal hücrelerde başlamaktadır. Seminifer tübül kesitinin iç kısmında hücreler bazal membrandan lümene doğru sıralanmaktadır. Sertoli hücreleri temel zar (bazal membran) üzerine oturmuş spermatogonyumlar arasında destek amaçlı bulunmaktadır. Bazal membrandan lümene doğru sırasıyla primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatit ve spermatozoonlar mevcuttur. Seminifer tübüllerin lümene kadar uzanan uç kısımlarının birleşmesiyle oluşan rete testis yapısının, sert bağ doku tabakasıyla kuşatılması sayesinde kanalların sürekli açık kalmaları sağlanmıştır. Sürekli açık olan bu kanalcıklar tunika albuginea'yı delerek epididimin baş kısmına açılırlar. İşte bu kıvrımlı kanallar efferent kanallar (efferent ductules, vaza efferents) olarak isimlendirilmiştir (Johnson ve ark., 2008; Dadhich ve ark., 2013; Pintus ve ark., 2015).

Efferent kanallar birleşerek epididim kanalı ismini taşıyan ductus epididimisi oluşturarak, spermatozoonları dışarıya ileten katlantılı bir yol meydana getirmiş olurlar. Bu yol yani epididim kanalı spermatozoonların toplanma ve depolanma yeri olarak bildirilmektedir. Olgun sperm hücrelerinin, seminifer tübüllerden ince kanallar yardımıyla testiste yer alan epididimise geçtiği ve çeşitli salgılarıyla aktive edilinceye kadar burada bekletildikleri daha sonra da çiftleşme sırasında salındıkları belirtilmektedir. Epididim kanalı kuyruk kısmına ilerledikçe düzleşip kalınlaşarak ingüinal (kasık) kanalı içerisine uzanan deferens kanal (ductus defferents) şeklini alır. Üretraya açılacak olan deferent kanal öncesinde bir genişleme yapar. Genişleme yapan bu yapı ampulla duktus ismini alır. Ampullanın uç kısmı incelerek vezikula seminalis kanalı ile birleşir ve prostat içerisine girer. İşte prostat içerisine kalan bu dar kanalda boşalma kanalı (ejakülatör kanal, ductus ejakulatorius) ismini almıştır. Buradan sonra da üretraya açılarak hem eşeyssel sıvı hem de idrar boşaltım yolu olarak devam ettiği bilinmektedir. Seminal vezikül, prostat ve cowper bezinin eşeyssel sıvı yani seminal sıvı üretiminden sorumlu olmaları ve bu sayede spermin bozulmadan dışıye aktarımı için

oldukça önemli yardımcı bezler oldukları belirtilmektedir (Skinner, 2005; Weinbauer ve ark., 2010).

2.3.4. Germ Hücresi ve Spermatogenez

Yetişkin memeli vücudundaki potansiyel olarak totipotent diploid hücrelerin tek kaynağı, testisin seminifer tübüllerinin bazal tabakasında bulunur. Bu hücrelerin tamamı germ hücresi olarak adlandırılmakta ve olgunlaşma sıralarıyla farklı isimler almaktadırlar (Brinster ve Zimmermann, 1994).

Germ hücreleri, tübüldeki komşu sertoli hücreleri arasında aşamalı gelişim katmanlarıyla tanımlanır. Olgunlaşmamış germ hücreleri, spermatogonia veya kök hücreler bazal laminada bulunur. Spermatogenezin germ hücrelerinin mitoz bölünme (spermatogonyal proliferasyon), mayoz bölünme (spermatosit DNA rekombinasyonu, redüksiyon ve bölünme) ve spermiyogenez olmak üzere üç aşamalı gelişme sürecinden geçen karmaşık ve oldukça organize bir süreç olduğu bildirilmiştir. Bu süreçler, sonunda farklılaşmamış spermatogonyayı son derece özelleşmiş spermilere dönüştürür (Kaur ve ark., 2014).

Spermatogenez sürecinde esas hücrenin A tipi spermatogonyum olduğu bildirilmiştir. Seminifer tübüllerin dış kenarında bazal membrana bitişik olarak yerleşmiş bu A tipi spermatogonyumlar devamlı olarak çoğalarak kendilerini yenilerler. Bu hücrelerin bir bölümü de spermatozoonlar oluşuncaya kadar başkalaşımını sürdürürler. Seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenez, hareketsiz spermatogonyumların bölünmesi ile başlayıp hareketli, kuyruklu bir hücrenin (spermatozoon) oluşumu ile biten bir süreçtir. Spermatozoonların olgunlaşması ve lümen ilerlemesinde rol oynayan sertoli hücreleri, spermatozoon oluşumu için gerekli besin ve enzimlerin de kaynağı olarak ifade edilmiştir. A tipi spermatogonyumlar, çoğalma evresinde, mitoz bölünme ile çoğalarak sayılarını artıran ve B tipi spermatogonyumlara dönüşen, spermatogenezin ilk aşamasını tamamlarlar. B tipi spermatogonyumlar seminifer tübül boşluğuna doğru ilerlerken A tipinden B tipine dönüşümde mitozla bölünen hücrelerden biri kalarak spermatogonyumların devamlılığını sağlar. Spermatogonyumların kromozom sayısı vücut hücrelerinde olduğu gibi 46 (2n) tanedir. I. mayozdan sonra oluşan spermatositlerden itibaren kromozom sayıları yarıya (n) iner (Lira Neto ve ark., 2016; Kaur ve ark., 2014).

İlk olarak spermatitin golgi cisimciğinde kendini gösteren spermatogenez, spermatitin sentriol ve çekirdeğinde de devam etmektedir. Karbonhidrat bakımından zengin olan proakrozom granülleri golgi aygıtındaki küçük taneciklerdir. Bu granüllerin bir kese içerisinde toplanmasıyla oluşan akrozom keseciği spermatitin çekirdek zarına yapışıp ön yüz kısmında bir başlık oluşturmaktadır. Granüller kese içerisinde iyice yayılarak akrozomu yapılandırmış olurlar. Bu sırada çekirdeğin arka kutbunda bir çift sentriol oluşumu meydana gelmektedir. Çekirdek akrozom ve sentriollerle beraber hareket ederek, kromatinini artırarak homojen bir yapılanma gösterir. Sentriollerden biri (proksimal) çekirdeğin arka ucunda bir yarığa gömülerek spermatozoon yapısının boyun kısmını oluşturur. Diğer sentriol (distal), hücre dışına bir fibril demeti uzatarak boyun, orta bölüm ve kuyruk boyunca ilerler. Ribonükleik asit, glukojen ve su kaybederek değişikliğe uğrayan stoplazma uzayarak çekirdeğin yapısını alır. Yine de büyük kısmı dejener olarak sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Orta parçacıkta bulunan eksen iplikçikleri spermatozoonun kuyruk kısmını oluşturur (Skinner, 2005; Johnson ve ark., 2008).

Bu sırada spermatogonyumlardan daha büyük olan sertoli hücreleri onları kuşatır ve destek vererek Kan-Testis bariyerini oluşturarak spermatojenik hücreleri otoimmün sisteme karşı korumaya alır. Dışarıdan hücre girişi olmadan olgunlaşan spermatogonyumlar bu bariyeri aşarak ilerleyebilir ve sertoli hücrelerinin stoplazma uzantılarıyla bağlantı kurabilirler. Memelilerde spermatogenez embriyo oluşumunun başında başlayıp, ergenlik ve sonrasında da devam eden uzun bir dizi adımları içermektedir (Kaur ve ark., 2014).

Spermatogenezin, endokrin kontrolü altında otokrin ve parakrin kontrolündeki sertoli hücre fonksiyonuna oldukça bağımlı olan karmaşık bir süreç olduğu belirtilmektedir. Öyle ki bu karmaşıklık, farklı testikular hücrelerin çok dallanmış etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Glukoz metabolizması araştırmalarında sertoli hücrelerinin aktif olarak glukozu metabolize ettiği çoğunluğunun laktata dönüştüğü fakat sitrik asit döngüsü yoluyla oksitlenmediği bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında germ hücrelerinin mayoz sonrasındaki metabolizmaları için gerekli enerjiyi, sertoli hücreleri tarafından sentezlenen laktat yardımıyla elde ettikleri ve glukozu direk olarak kullanamadıkları belirtilmektedir (Maldonado ve ark., 2016; Galardo ve ark., 2017; Mariana ve ark., 2017).

2.3.5. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü

Testislerin, embriyonik gelişimleri boyunca erkek eşey hormonu olan testosteron salgılamaya başladıkları belirtilmiştir. Testosteronun, yeterli miktarda sistem içerisinde mevcut olduğunda yardımcı üreme yapılarının olgunlaşmasını uyardığı ve ergenlikte ikincil eşeyssel özelliklerin (sakal, ses kalınlaşması, kas hacmi artışı vb.) değişimini de başlattığı ifade edilmektedir. Testislerin spermatozoon oluşumunu gerçekleştirmesinin yanı sıra temel görevinden biri de, tüm bu süreci kontrol edecek olan androjenleri salacak olması olduğu bilinmektedir. Bir spermatogenetik süreç için yaklaşık 74 gün gerektiği düşünülmektedir. Ratlarda sperm üretiminin, doğum sonrası 45. günden itibaren olduğu ancak en ideal üretimin 75. günden önce gerçekleşmediği bildirilmektedir (Welsh ve ark., 2017).

Cinsel hormonlar hipotalamus, hipofiz ve gonadal aksisler tarafından düzenlenen dinamik bir sistemdir. Hipofizden, LH ve FSH salınımını kontrol eden hipotalamustaki gonadotropin salıcı hormon (GnRH) dişilerde östradiol ve erkeklerde testikular testosteron salınımında LH ve FSH'yı kapsayan gonadotropinlerin sentezini uyarır. Testisin, spermatogenesis ve steroidogenesis olmak üzere iki fonksiyonunun, sırasıyla GnRH tarafından uyarılan, FSH ve LH olmak üzere, hipofiz gonadotropinleri tarafından yapılan normal stimülasyona bağlı olduğu bildirilmiştir (Şekil 9). GnRH, hipotalamusta sentezlenen ve hipotalamik-hipofizyal portal sistemi tarafından ön hipofizdeki gonadotropik hücrelere taşınan bir dekaeptittir. GnRH'nin hipofiz bezleri üzerindeki reseptörlere bağlanmasının hem FSH hem de LH'nin salınmasına neden olduğu bilgisi verilmiştir. Her iki gonadotropin (FSH, LH), bir G-protein ilişkili transmembran alan reseptörü içeren klasik protein hormonu reseptör mekanizmaları yoluyla etkilerini göstermektedirler. Reseptör aracılı bağlanma gerçekleştikten sonra adenilat siklaz aktive edilir ve protein kinaz aracılı protein fosforilasyonunu ve gonadotropinlerin hücresel etkilerini aktive eden hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) artışlarına yol açar (Simoni ve ark., 1997; Dierich ve ark., 1998; Hayes ve ark., 2001; Xia ve ark., 2017).

FSH ve testosteron sekresyonu, spermatogenezin başarıyla tamamlanması için gereklidir. Germ hücrelerinde direkt olarak FSH veya testosteron için herhangi bir reseptör bulunmadığından bu adımda orta basamak olduğu ifade edilmektedir. Sertoli hücrelerinin hem FSH hem de testosteron için reseptörler içerdiği, bu hormonların sertoli

hücre fonksiyonunu modüle ederek germ hücreleri üzerindeki etkilerini gösterdikleri belirtilmektedir. Hem FSH hemde testosteronun germ hücreleri üzerinde sinerjik etkiler yaptığı ancak testosteronun, spermatid olgunlaşmasının sonraki aşamalarında spesifik bir etkiye sahip olduğu da verilen bilgiler arasındadır. Erkek seks hormonu olan testosteron, Leydig hücresi tarafından LH stimülasyonu altında salgılanır ve periferik dokuların farklılaşmasında ve spermatogenezini teşvik etmekte önemli bir rol oynar (Kangasniemi ve ark., 1990; Sluka ve ark., 2006).

Spermatogenezin gonadotropin bağımlılığı hipofizektomi, GnRH aşılması, GnRH agonisti ve antagonisti tedavisi ve androjenin indüklediği gonadotropin sekresyonunu bastırma gibi çeşitli deneysel yaklaşımlarla gösterilmiştir (Schulz ve Miura, 2002).

FSH'in, testis gelişiminde sertoli hücre mitozunu uyarabilme yeteneği ile erişkin testisin spermatojenik kapasitesini etkileyebilme yeteneğinden de bahsedilmektedir. FSH'in başlıca görevi spermatogenezini başlatmak ve devamlılığını sağlamak olarak ifade edilmektedir. Bu görevinin yanı sıra sertoli hücrelerinden ABP ve östrojen salgılamasına da yardımcı olmaktadır. Sertoli hücrelerinin, FSH'yi bağlama kapasitesine sahip olduğu ve FSH reseptörü için mRNA içerdiği bilgisi verilmiştir. Birçok çalışmada, FSH'nin olgunlaşmamış sertoli hücrelerinde mRNA ve protein sentezini uyardığını ve androjen bağlayıcı protein, transferrin ve inhibin gibi spesifik proteinlerin salgılanmasını arttırdığından bahsedilmiştir. FSH'nin sertoli hücrelerine bağlanmasının, cAMP birikmesini, protein kinaz aktivasyonunu ve androjen bağlayıcı protein üretimini izlediği bildirilmiştir (Heckert ve Griswold, 2002; Mruk ve Cheng, 2004).

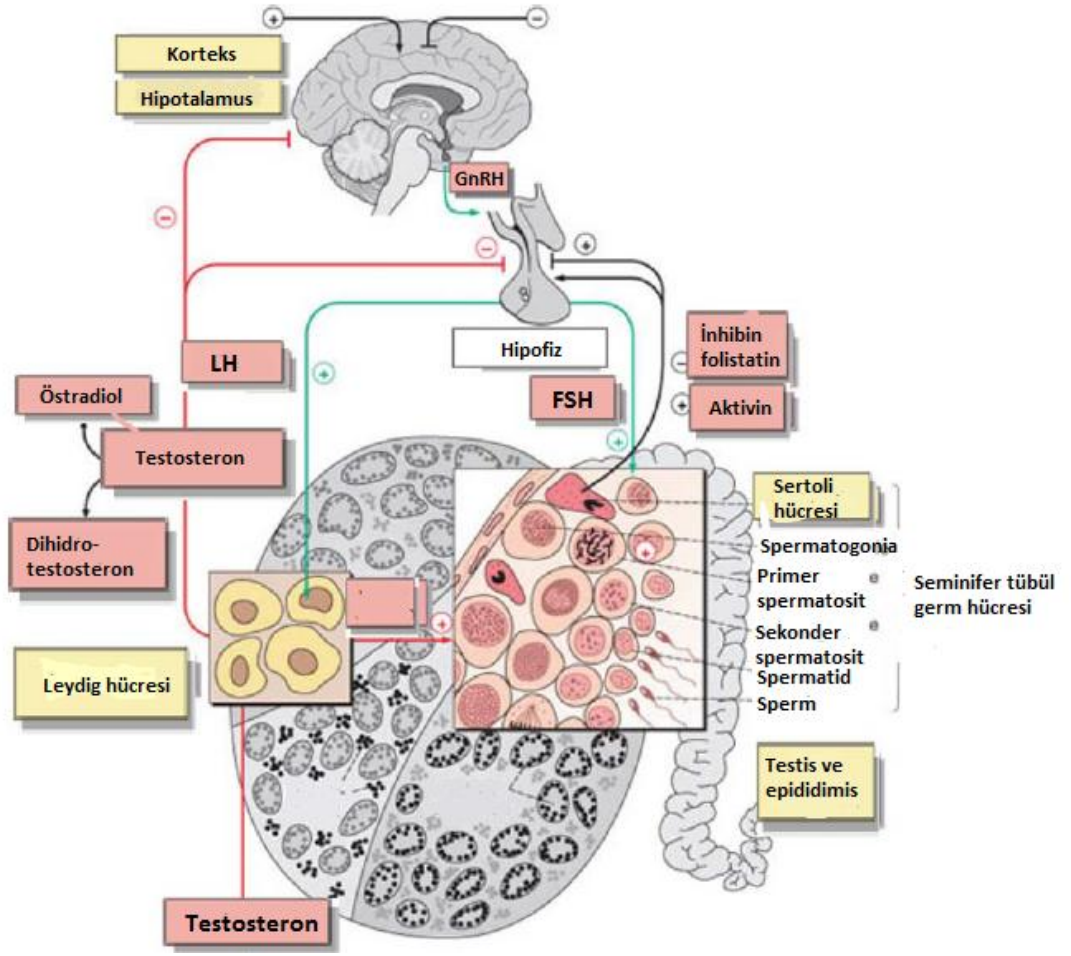
ABP, testosteron ve östrojenlere bağlanarak onların seminifer tübül içerisine taşınmasına yardımcı olur ki böylece spermatozoon olgunlaşması için gerektiğinde kullanımları sağlanabilmektedir. Östrojenlerin diğer hormonlar üzerinde denetim sağlayabildiği yani LH salgılamasını ve testosteron düzeyini düşürebileceği gibi FSH salgılamasını da denetleyebileceği belirtilmektedir. Seminifer tübüllerde aşırı üretilen spermatozoonun kısıtlayıcı etki yapmak üzere FSH salgılamasını sınırlandırdığı bildirilmiştir. Bu kısıtlayıcı etkinin sertoli hücrelerinden salınan inhibin etkimesiyle gerçekleştiği ifade edilmektedir. İnhibin bu noktada ön hipofizde yer alan gonadotrop

hücelere etki eder. Aynı durum tam tersi üretim için zıt yönde artırıcı etkilerle ilerlemektedir (Mclachlan ve ark., 2002).

Androjen reseptörleri sertoli, peritubular miyoid ve leydig hücrelerinde bol miktarda bulunmaktadır. LH leydig hücrelerini uyararak testosteron salınımına yardımcı olmaktadır. Leydig hücreleri testisin, kolesterolden androjen (testosteron) dönüşümünü sağlayan ana hücrelerdir. LH' nin leydig hücrelerine, spesifik olarak bağlanmasıyla, cAMP birikimini ve kolesterolün pregnenolona dönüşmesini uyardığı ve testis steroid ürünü olan testosteronun oluşumunda artışa neden olduğu belirtilmektedir. Leydig hücresinde bulunan lipid damlacıkları kolesterol esterlerinin biriktiği, depolandığı yer olarak ifade edilmektedir. Kolesterolün dıştan iç mitokondriyal zar içine taşınmasının hız sınırlayıcı bir adım olduğu ve bir STAR protein aracılı olduğu da verilen bilgiler arasındadır (Holdcraft ve Braun, 2004; Ruwanpura ve ark., 2010).

Seminifer tübülleri çevreleyen peritubular hücrelerin, sertoli hücre fonksiyonunda önemli etkilere sahip olan ve testis fonksiyonunun kontrolünde önemli olduğu kabul edilen, P-Mod-S (testikular parakrin faktör) olarak adlandırılan bir parakrin faktör ürettiği ifade edilmektedir. Testosteronun peritubular miyoid hücreler üzerinde bulunan androjen reseptörleri yardımıyla, P-Mod-S A ve B olarak adlandırılan proteinlerin üretimini uyarabildiği ve bu durumda transferrin, androjen bağlayıcı protein ve inhibin'nin sertoli hücresinde salınımını uyardığı da verilen bilgiler arasındadır (Anthony ve ark., 1991).

Sertoli hücrelerinin bir salgı ürünü olan ABP'nin testiste, testosteron ve FSH tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. ABP'nin cinsiyet steroidleri için bir bağlayıcı-taşıyıcı protein olarak bulunduğu ifade edilmektedir. Seks hormon bağlayıcı globulin ve ABP'nin; hepatosit ve sertoli hücreleri tarafından üretilen, ekstraselüler steroid taşıyıcı proteinler ile sıkı bir ilişkisi olduğu belirtilmektedir. Ratlarda testikular ABP sentezinin, FSH ve testosteron tarafından artırıldığı bildirilmiştir (Hammond ve ark., 1989).



Şekil 9. Üreme hücreleri ve spermatogenezin hormonal kontrolü (Weinbauer ve ark., 2010)

FSH, sertoli hücre metabolizmasının kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. FSH, sertoli hücresi laktat üretimini, örneğin glukoz taşıyıcılarının düzenlenmesi ve laktat dehidrogenaz (LDH) izoenzimi sisteminin ifadesi gibi farklı biyokimyasal mekanizmaların modülasyonu yoluyla düzenler (Galardo ve ark., 2017).

2.4. Erkek Üreme Hücreleri ve Apoptoz

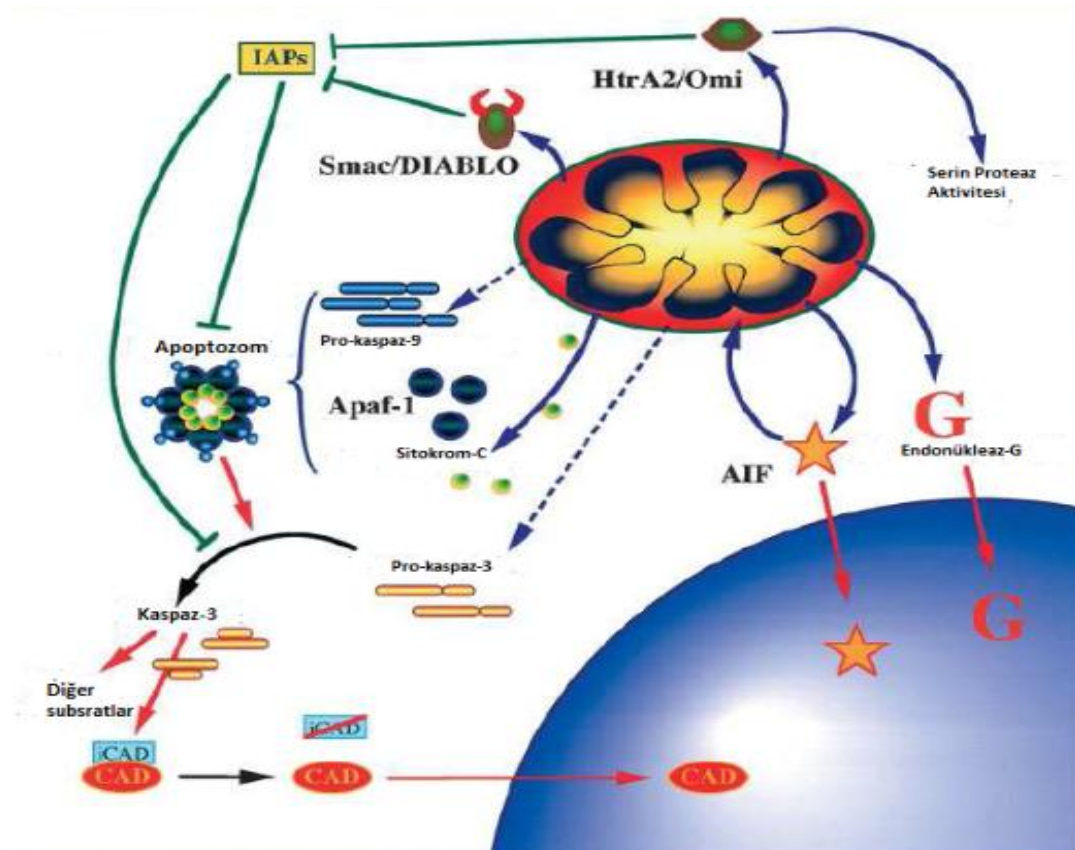
Teorik olarak çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle yönetilen ve hücrenin tarafından programlanmış bir mekanizma aracılığı ile hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlemdir. Hücrenin intiharı olarak da tanımlanabilir. Hücrelerimizin, çoğalması veya ölmesi ya da bölünme olmadan rollerini devam ettirmesi, bazı faktörlere bağlı olarak karar verecekleri bir süreç olarak değerlendirilmiştir. Bu faktörler, hücreye reseptörler yoluyla iletilen ölüm veya çoğalma sinyalleri, besin maddelerinin varlığı veya yokluğu, hücrenin zarar görmüş olması

(DNA yapısının bozulması vs.) olabilir. Apoptoz mekanizması, etkin yerlerinde bir sistein olan ve hedef proteinlerini belirli aspartik asitlerden kesen bir proteaz ailesinden olan Kaspazlar tarafından kontrol edilir. Bunlar, aktif yerlerinde amino asit olan sisteini ihtiva eden son derece spesifik proteazlardan oluşan bir aileyi içerir (Majno ve Joris., 1995).

Apoptoz, embriyonik dönemde gereksiz dokuların körelmesinde, dokulardaki hücre sayısı kontrolünde, işlevini yitirmiş ya da tehlike potansiyeli olan anormal hücreleri yok etmede, canlı vücut homeostazisinde ve daha birçok olayda oldukça önemli bir role sahiptir. Bilindiği gibi spermatogenezde, sperm oluşumu için önemli olan germinal hücre ölümü de gerçekleşmektedir. Bu durumun, spermatozoanın normal gelişimi için önemli ve mutlak gerekli olduğu ifade edilmiştir. Böylece spermatozoaların %25-%75' lik bir kaybı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca gerekliliği, germ hücreleri ve sertoli hücrelerinin sayısal denkliliğini korumak olarak gösterilmiştir ki bu dengenin bozulmasının yani germ hücrelerinde apoptoz fazlalığı veya azlığının, erkek bireylerde infertiliteye sebep olduğu da verilen bilgiler arasındadır. Bu sistemin hormonal kontrol altında gerçekleştiği ifade edilmektedir (Vaux ve Korsmeyer, 1999; Martin ve ark., 2004).

Herkes tarafından enerji kaynağı olarak kabul gören mitokondri aynı zaman da çeşitli yollarla gelen ölüm sinyallerinin toplandığı organel olarak da ifade edilmektedir. Bu durumun mitokondrideki zar potansiyeli değişimiyle (19 üyesi bulunan bcl-2 protein ailesi tarafından) başlayıp, sitokrom-C' nin (normal şartlarda ATP zincirinde yer almakta) stoplazmaya dağılması ve Apaf-1 (inaktif) molekülüne bağlanarak apoptozom denen yapıyı aktifleştirmesiyle devam ettiği belirtilmektedir. Mitokondrideki solunum zincirinde yer alan, apoptoz indükleyici faktör (AIF), SMAC (mitokondriden salınan ikinci kaspaz faktörü) ve CAD (kaspaz aktive edici)-ENDO G adlı DNaz enzimleri de sitokrom-C' nin yanı sıra sitoplazmaya dağılan diğer enzimlerdir. Daha sonra mekanizmanın, apoptozomun kaspaz-9'u uyarması ve onunda diğer kaspazları uyarmasıyla ilerlediği böylece proteolitik bir zincir oluşturularak apoptoza kadar giden basamaklardan oluştuğu bildirilmiştir. Hücrede zara tutunmuş şekilde var olan ölüm reseptörlerinin, bir ucu hücrenin dışına diğer ucu ise hücrenin içine bakan ve iç kısma bakan tarafda prokaspaz 8'in aktifleştirilmesi için ölüm bölgesi (death domain) bulunduran reseptörler olduğu bilgisi verilmektedir. Kaspazların peptid bağlarını kırarak

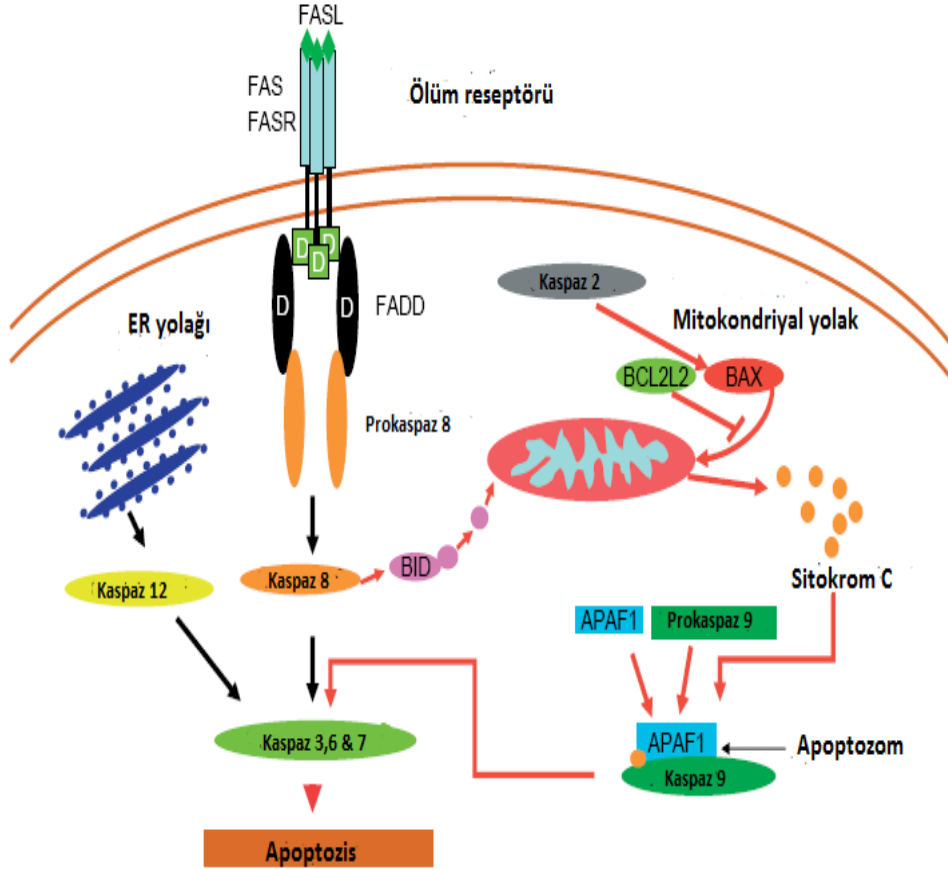
hücreyi ölüme sürüklediği ve farklı dokular için farklı kaspaz türlerinin işlev gördüğü de verilen bilgiler arasındadır. Son olarak kaspazların inhibitör apoptoz proteinleri (IAP) denen bir grup protein tarafından baskılandığı bilgisi de verilmektedir. IAP' lere örnek olarak, XIAP, c-IAP1 ve c-IAP2 inhibitörlerinin, kaspaz-3 ve 9'u etkin şekilde bağlayabildiği ve bunları inhibe edebildiği bildirilmiştir (Şekil 10). (Ravagnan ve ark., 2002; Bouchier ve ark., 2005; Elmore, 2007; Ow ve ark., 2008).



Şekil 10. Mitochondriyal membrandan salınan farklı proteinlerin apoptoza katkısı (Ravagnan ve ark., 2002)

Protein katlanmasında aktif rol alan endoplazmik retikulumun apoptotik süreci başlatan başka bir organel olduğu belirtilmektedir. ER'nin üstlendiği bu görevde bir problem ortaya çıktığında, katlanmamış proteinlerin bir stres faktörü oluşturdukları, bu stresin ortadan kalkmadığı ya da uzadığı durumlarda proteaz ve kinazların aktive olarak hücre içi kalsiyum seviyesinde artış meydana geldiği ifade edilmiştir. Bu basamaklarla beraber, mitokondriyal apoptotik süreç aktive edilmiş duruma gelmektedir (Şekil 11). (Xu ve ark., 2005).

Gen koruyucusu olarak da bilinen p53 proteini, DNA zarar gördüğünde hücre döngüsünü durdurarak hasar tamiri için zaman kazandıran ancak hasar telafi edilemeyecek kadar çok olduğunda, hücreyi apoptoza sürükleyen diğer bir hücre içi faktör olarak ifade edilmiştir (Spierings ve ark., 2004).



Şekil 11. Memeli testis hücrelerinde yer alan kaspaza bağımlı apoptotik yolağın üç temel moleküler mekanizmasının basitleştirilmiş şematik diyagramı (Ruwanpura ve ark., 2010)

Apoptoz teriminin, nekrozdan, moleküler ve morfolojik olarak farklı olan programlanmış hücre ölümünü tanımladığı ifade edilmektedir. Apoptoz sürecinde, fagositoz basamağı için komşu makrofajları alan apoptotik hücrelerin yüzeyinde, hücre membranından PS'nin (fosfotidilserin) translokasyonu oluşur, bu durumun nekrozdan esas fark olduğu belirtilmektedir. Apoptozda hücre çekirdeği küçülüp kromatin yoğunlaşırken, nekrozda hücre içeriğinin dış ortama dağılması belirtilen farklar arasındadır. Germ hücrelerinde meydana gelen FSH'nin geri çekilmesiyle oluşan akut

apoptotik değişiklikler, programlanmış hücre ölümünün klasik yollarından bağımsız olabilir. Programlanmış hücre ölümünün insan spermindeki fonksiyonel etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Apoptotik süreçle ortaya çıkan germ hücrelerindeki kaybın, baskın bir süreç olduğu, p53-p21, fas düzeyince, kaspaz, bcl-2 gibi değişik yollarla kontrol edildiği bilgisi verilmektedir. Çeşitli çalışmalar, reseptör aracılı apoptozun (bax ve bcl-x gibi regülatör proteinlerinin) bir göstergesi olarak, plazma zar bütünlüğünü bozan ve insan sperm hücrelerindeki programlanmış hücre ölümünü ifade eden CD95'i (DNA sarmalının kopmasını işaret eden fas ligandı) araştırdı (Hikim ve Swerdloff, 1999; Paasch ve ark., 2004; Youle ve Strasser, 2008; Aitken ve ark., 2011; Doğan ve ark., 2013).

Hiperkolesterolemi dünyada çok yaygın olarak görülen bir sağlık sorunudur. Bu çalışmada yüksek kolesterol diyeti ile beslenen Sprague Dawley ırkı erkek ratlara tedavi amaçlı olarak *L. acidophilus* probiyotiğinin verilmesinin testikular fonksiyonda önemli olan testosteron, FSH ve LH, ABP, faktör ilişkili apoptoz (FAS) düzeylerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

Çalışmada ağırlıkları 300-550 gr arasında değişen 10-12 haftalık 24 adet erkek Sprague-Dawley ırkı erişkin rat Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışma boyunca 22 ± 2 °C'lik oda sıcaklığı, %60 nem oranı, 12/12 saat aydınlık/karanlık ortamı sağlanmıştır. Deneysel hayvanları çalışma boyunca *ad libitum* olarak beslenmiştir.

Çalışmamız; B.30.2.ODM.0.20.09.00-0050.04-146-173 sayılı, 03.10.2016 tarihli, 2016/27 numaralı ‘‘Kolesterol ve *Lactobacillus acidophilus*’ un Ratlarda Testikular Fonksiyona Etkisinin Araştırılması’’ konu başlığıyla Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izniyle ilerlemiştir.

Hiperkolesterolemi oluşturmak için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden standart rat yemi sağlanmıştır (Tablo 1). Standart yeme ticari bir yem fabrikası tarafından %2 oranında kolesterol ilave ettirilmiş ve homojen olarak karıştırma sonrasında tekrar peletlenmiştir. Kontrol grubu dışındaki tüm gruplara hazırlanmış olan kolesterolü yem çalışma boyunca *ad libitum* olarak verilmiştir.

Tablo 1. Standart rat yemi içeriği

Temel Besin Maddeleri

Kuru madde (en az) %88

Ham protein (en az) %24

Ham selüloz (en çok) %7

Ham kül (en çok) %8

Ham yağ (en az) %6

Tuz (en çok) %1

Metabolik enerji 2650 kcal/kg

3.2. METOT

3.2.1. Probiyotik Süspansiyonunun Hazırlanması:

L. acidophilus probiyotiği liyofilize olarak satın alınmıştır. Liyofilize olan *L. acidophilus* bakterisi canlılık ve saflık kontrolü yapılması için MRS broth ile sulandırıldıktan sonra, %5 koyun kanlı agara inokule edilmiştir. Canlı ve saf olduğu belirlenen kültürden 9 ml MRS içeren tüpe 1 ml miktarında eklenmiş ve 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda sıvı kültürden 10⁹'a kadar FTS ile süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan 3'er adet kanlı agara ekim yapılmış ve 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında pleytlerde üreyen bakteri kolonileri sayılmış ve ana kültürdeki bakteri miktarı hesaplanmıştır. Hesaplama sonrasında ana kültürde 10⁹ kob/ml bakteri olacak şekilde süspansiyon yapılmış ve tedavi amacıyla kullanılacak olan *L. acidophilus* probiyotik süspansiyonu hazırlanmıştır (Park ve ark. 2006).

3.2.2. Deneme Planı

Çalışmada 24 adet rat rastgele 3 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu) (K): standart rat yemi ile 8 hafta beslendi.

Grup 2 (%2 kolesterolü yem) (HK): normal rat yemine %2 kolesterol karıştırılarak 8 hafta beslendi (Onody ve ark., 2003; Wang ve ark., 2010).

Grup 3 (%2 kolesterol+*L. acidophilus*) (HKL): %2 kolesterol karıştırılmış normal rat yemi ile 4 hafta beslendikten sonra, oral gavaj uygulaması ile 4 hafta *L. acidophilus* probiyotiği verildi (Park ve ark., 2006).

Çalışma sonunda tek tek ratlar tartılarak %10 ketasol (0,8-1,3ml/kg) ve %2 basilazin (2-5 mg/kg) IP uygulanarak kalpten kan alındıktan sonra dekapite edilerek testis doku örnekleri alındı. Testis doku örneklerinden birinde FSH, testosteron ve faktör ilişkili apoptoz düzeyi ELISA test kitleri ile belirlendi diğer testis dokusu ise histopatolojik olarak incelendi. Serumda ise LH ve ABP ve total kolesterol düzeyleri belirlendi.

3.2.3. Testis Doku Örneklerinden ELISA için Ekstraksiyon

Testis doku homojenizasyonun hazırlanması için, doku örnekleri, homojenizasyondan önce buz soğukluğunda PBS (Phosphate Buffer Saline) (0,01 mol /L, pH 7,0-7,2) ile yıkandıktan sonra tartıldı. Doku ufak parçalara ayrıldıktan sonra buz

içinde homojenizatör (Pro 200) ile 5-10 mL PBS ile homojenizasyon gerçekleştirildi. Daha sonra buz içinde 1 veya 2 defa da ultrasonikatör ile hücre membranın parçalanması sağlandı ve hücrenin daha iyi parçalanması için 2 kez dondurma çözündürme işlemi uygulandı. Daha sonra homojenat 5000 x g'de, 4°C 5 dk santrifüj edilerek süpernatantlar -80°C analiz yapılana kadar muhafaza edildi. Daha sonra süpernatantlar kullanılarak ELISA test yapıldı. Bu test için ratta spesifik testis dokusu ekstraktında ölçümüne uygun testosteron, FSH düzeyi ELISA test kitleri prosedürü takip edilerek yapıldı ve sonuçlar ELISA okuyucuda okunarak hesaplandı.

3.2.4. Testosteron Düzeyinin Belirlenmesi

Testis doku süpernatantlarındaki testosteron düzeyinin belirlenmesi için rat spesifik Cusobio marka testosteron kiti (CSB- E05097r) kullanıldı. ELISA testi üretici firmanın bildirdiği metoda göre gerçekleştirildi. ELISA testinin saptama aralığının 0,13 ng/ml-25,6 ng/ml ve saptayabildiği en düşük konsantrasyonun da 0,06 ng/ml'nin altında olduğu bildirildi. Test metoduna göre öncelikle tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Kit içerisinde bulunan hazır standart solüsyonundan 0,06-25,6 ng/ml konsantrasyonlarında çalışma standart solüsyonları oluşturuldu. Mikropleyitin ilk ve son 6 kuyucuğuna 50 µl standart dilüsyonları, diğer kuyucuklara da 50 µl örnekler konuldu. Ayrıca başta ve sonda birer kuyucuk ta blank olarak ayrılmış ve bu kuyucuklara hiçbir solüsyon konulmadı. Blank olarak ayrılan kuyucuklar hariç olmak üzere diğer tüm kuyucukların üzerine 50 µl HRP-konjugat ilave edildi. Sonrasında tüm kuyucuklara 50µl Antikor ilave edildi. Mikropleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkama gerçekleştirildi. Sonrasında tüm kuyucuklara 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B solüsyonları eklendi ve karanlık ortamda 37°C'de 15 dk inkübe edildi. Süre sonunda tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi ve 10 dk içerisinde 450 nm'ye ayarlanmış olan ELISA reader da okutuldu. Belirlenen OD₄₅₀ değerleri Magellan Standard Tracker (V7-2) yazılımı ile standartlara ait OD₄₅₀ değerleri dikkate alınarak hesaplandı.

3.2.5. Folikül Uyarıcı Hormon Düzeyinin Belirlenmesi

Testis doku süpernatantlarındaki folikül uyarıcı hormon düzeyinin belirlenmesi için rat spesifik Sun-red marka FSH kiti (sunred) kullanıldı. ELISA testinin saptama aralığının 0,25 - 60 IU/L ve saptayabildiği en düşük konsantrasyonun da 0,202 IU/L

altında olduğu bildirildi. Test metoduna göre öncelikle tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Kit içerisinden çıkan hazır konsantre standart 80 IU/L (0,5 ml) solüsyonları dilue etmek için 6 adet ependorf tüpe 125'er mikrolitre standart diluent konu. Konsantre standart aşağıdaki tabloya göre 2 katlı olarak sulandırıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Konsantre 80 IU/L (0,5 ml) standart çözelti dilüsyonları

Standart konsantrasyon	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Standart Konsantrasyon (IU/L)	40	20	10	5	2.5	1.25

Konsantre 30x olan yıkama solyonu hazırlandı. Bunun için 20 ml konsantre yıkama tamponu 580 ml distile su ile karıştırıldı. Çalışma öncesinde kitin içinden çıkan tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi ve örnekler çözüldükten sonra santrifüj edildi. Başta ve sonda birer kuyucuk ta blank olarak ayrılarak bu kuyucuklara sample diluent konuldu. Mikropleytin ilk ve son 6 kuyucuğuna 50 µl standart dilüsyonları, diğer kuyucuklara da 40 µl örnekler konuldu. Blank olarak ayrılan kuyucuklar hariç olmak üzere diğer tüm kuyucukların üzerine 50 µl streptavidin-HRP konjugat ilave edildi. Sonrasında örneklerin üzerine 10 µl ADP antikor eklendi. zerine 50 µl streptavidin eklenerek mikropleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda yıkama solyonu ile 5 defa yıkama gerçekleştirildi. Sonrasında tüm kuyucuklara 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B solüsyonları eklendi ve karanlık ortamda 37°C'de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda tüm kuyucuklara 50 µl stop solyonu eklendi ve 37°C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi ve 450 nm'ye ayarlanmış olan ELISA readerda okutuldu. Belirlenen OD₄₅₀ değerleri Magellan Standard Tracker (V7-2) yazılımı ile standartlara ait OD₄₅₀ değerleri dikkate alınarak hesaplandı.

3.2.6. Testis Dokusunda Faktör İlişkili Apoptoz Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Faktör ilişkili apoptoz düzeyi, apoptozis sürecinin başlamasını tetikleyen proteine verilen isim olup ölçümü, kantitatif sandwich enzim immunoassay prensibine dayanan yöntem kullanılarak belirlendi (CSB-E07324r).

ELISA testinin saptama aralığının 0,78 ng/ml-50 ng/ml ve saptayabildiği en düşük konsantrasyonun da 0,195 ng/ml altında olduğu bildirildi. Test metoduna göre öncelikle tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Standart vialini 6000-10000 rpm de 30 sn santrifüj edildi ve standard vialine 1,0 ml örnek sulandırıcısı ilave edilerek sulandırıldı. Konsante standart 50 ng/ml olup 7 adet ependorf alnarak içerisine 250 µl örnek sulandırıcısı konularak 2 kat sulandırması yapıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Konsantre standart çözelti dilüsyonları

Standart konsantrasyon	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Standart Konsantrasyon (ng/ml)	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39

Biotin işaretli antikor (1x) – açılmadan önce santrifüj edildi. Biotin antikorunu 100 kat sulandırıldı. Bunun için 10 µl Biotin-antikoruna 990 µl Biotin-antikor sulandırıcısı ilave edildi. HRP-avidin (1x) - açılmadan önce santrifüj edildi ve HRP-avidin 100 katlı sulandırıldı. Bunun için 10 µl HRP-avidin 990 µl HRP-avidin sulandırıcısı ilave edildi. Yıkama solüsyonu hazırlandı. Bunun için 20 ml yıkama tampon solüsyonuna (25 x) 480 ml distile su ilave edilerek 500 ml yıkama solüsyonu hazırlandı (1 x). Çalışma öncesinde kitin içinden çıkan tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi. Kuyucuklara 100 µl standart ve örnek konularak 37°C’de 2 saat inkübe edilerek süre sonunda kuyucukların içindeki sıvı döküldü ama yıkama yapılmadı. Tüm kuyucuklara 100 µl biotin-Antibody (1X) eklenerek 37°C’de 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında 3 defa yıkama yapıldıktan sonra kuyucuklara 100 µl HRP-avidin (1X) eklenerek 37°C’de 1 saat inkübe edildi. 5 defa yıkama yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara 90 µl TMB-Substrate (tetrametilbenzidin) eklenerek 37°C’de 15-30 dk karanlık ortamda inkübe edildi (ışık almayacak şekilde). Tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklenerek 5 dk içerisinde 450 nm’ye ayarlanmış olan ELISA reader da okutuldu. Belirlenen OD₄₅₀ değerleri Magellan Standard Tracker (V7-2) yazılımı ile standartlara ait OD₄₅₀ değerleri dikkate alınarak hesaplandı.

3.2.7. Serumda Luteinizan Hormon Düzeyinin Belirlenmesi

Serumda LH düzeyinin belirlenmesi için rat spesifik Sun-red marka Luteinizan hormon (sunred) kullanıldı. ELISA testinin saptama aralığının 0,30 - 60 mIU/mL ve saptayabildiği en düşük konsantrasyonun da 0,206 mIU/mL altında olduğu bildirildi.

Test metoduna göre öncelikle tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Kit içerisinden çıkan hazır konsantre standart 64 mIU/mL (0,5 ml) solüsyonları hazırlanması için 6 adet ependorf tüpe 125'er mikrolitre standart diluent konuldu. Konsantre standart aşağıdaki tabloya göre 2 kat olarak sulandırıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Konsantre 64 mIU/mL (0.5 ml) standart çözelti dilüsyonları

Standart konsantrasyon	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Standart Konsantrasyon (mIU/mL)	32	16	8	4	2	1

Konsantre 30x olan yıkama solüsyonu hazırlandı. Bunun için 20 ml konsantre yıkama tamponu 580 ml distile su ile karıştırıldı. Çalışma öncesinde kitin içinden çıkan tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi ve örnekler çözüldükten sonra santrifüj edildi. Başta ve sonda birer kuyucukta blank olarak ayrılarak bu kuyucuklara sample diluent konuldu. Mikropleyitin ilk ve son 6 kuyucuğuna 50 µl standart dilüsyonları, diğer kuyucuklarda 40 µl örnekler konuldu. Blank olarak ayrılan kuyucuklar hariç olmak üzere diğer tüm kuyucukların üzerine 50 µl streptavidin-HRP konjugat ilave edildi. Sonrasında örneklerin üzerine 10 µl ADP antikor eklendi. Üzerine 50 µl streptavidin eklenerek mikropleyt 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkama gerçekleştirildi. Sonrasında tüm kuyucuklara 50 µl Substrate A ve 50 µl Substrate B solüsyonları eklenmiş ve karanlık ortamda 37°C'de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi ve 37°C'de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi ve 450 nm'ye ayarlanan ELISA reader da okutuldu. Belirlenen OD₄₅₀ değerleri Magellan Standard Tracker (V7-2) yazılımı ile standartlara ait OD₄₅₀ değerleri dikkate alınarak hesaplandı.

3.2.8. Androjen Bağlayıcı Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Serumda androjen bağlayıcı protein (ABP) düzeyinin belirlenmesi için rat spesifik Sun-red marka Androjen Bağlayıcı Protein kiti kullanıldı. ELISA testinin saptama aralığının 200 nmol/L ve saptayabildiği en düşük konsantrasyonun da 0.766 nmol/L altında olduğu bildirildi. Test metoduna göre öncelikle tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Kit içerisinden çıkan hazır konsantre standart 240 nmol/L (0,5 ml) solüsyonları hazırlanması için 6 adet ependorf tüpe 125'er

mikrolitre standart diluent konuldu. Konsantre standart aşağıdaki tabloya göre 2 kat olarak sulandırıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Konsantre 240 nmol/L (0.5 ml) standart çözelti dilüsyonları

Standart konsantrasyon	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Standart Konsantrasyon (nmol/L)	120	60	30	15	7.5	3.75

Konsantre 30x olan yıkama solüsyonu hazırlandı. Bunun için 20 ml konsantre yıkama tamponu 580 ml distile su ile karıştırıldı. Çalışma öncesinde kitin içinden çıkan tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi ve örnekler çözüldükten sonra santrifüj edildi. Başta ve sonda birer kuyucukta blank olarak ayrılarak bu kuyucuklara sample diluent konuldu. Mikropleyitin ilk ve son 6 kuyucuğuna 50 µl standart dilüsyonları, diğer kuyucuklara da 40 µl örnekler konuldu. Blank olarak ayrılan kuyucuklar hariç olmak üzere diğer tüm kuyucukların üzerine 50 µl streptavidin-HRP konjugat ilave edildi. Sonrasında örneklerin üzerine 10 µl ADP antikor eklendi. Üzerine 50 µl streptavidin eklenerek mikropleyt 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkama gerçekleştirildi. Sonrasında tüm kuyucuklara 50 µl substrate A ve 50 µl substrate B solüsyonları eklenmiş ve karanlık ortamda 37°C’de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi ve 37°C’de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi ve 450 nm’ye ayarlanan ELISA reader da okutuldu. Belirlenen OD₄₅₀ değerleri Magellan Standard Tracker (V7-2) yazılımı ile standartlara ait OD₄₅₀ değerleri dikkate alınarak hesaplandı.

3.2.9. Serumda Total Kolesterol Düzeyinin Belirlenmesi

Total kolesterol düzeyi Mindray-TC kiti kullanılarak otoanalizör (BS120 Vet, Mindray, Çin) ile direkt enzimatik olarak ölçüldü (Sacks, 1999). Bu yöntemde kolesterol esterase, kolesterol esterlerini ayırdıktan sonra 4-kolesterol oluşturmakta ve kırmızı renkli quinon üretilmekte olup serumdaki kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılı olmaktadır. Test amacıyla serumlardan 10 µL alınarak 100 µL çalışma reaktifi ile karıştırıldı, 37°C de 5 dakika inkübasyon sonrasında dakikadaki absorbans değişimi 500 nm dalga boyu otoanalizör ile ölçüldü (Tablo 6 ve 7). Elde edilen sonuçlar gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Tablo 6. Total kolesterol düzeyinin belirlenmesi amacıyla kullanılan reaktifler

Reaktif	Konsantrasyon
Phosphate buffer	100 mmol/L
Phenol	5 mmol/L
4-Aminoantipyrine	0,3 mmol/L
Cholesterol esterase	>150 KU/L
Cholesterol oxidase	>100 KU/L
Peroxidase	5 KU/L

Tablo 7. Total kolesterol düzeyinin belirlenmesi amacıyla kullanılan reaktifler

	Blank	Örnek
Reaktif	1000 µL	1000 Ml
Distilesu	10 Ml	—
Örnek	—	10 Ml

37°C’de 10 dk inkubasyondan sonra absorbansı okundu.
 $\Delta A = [\Delta A_{\text{sample}}] - [\Delta A_{\text{blank}}]$

3.2.10. Histolojik İnceleme

Sekiz haftalık deney süresi sonunda bütün hayvanlar dekapitasyon yönteminden sonra bir testis dokusu hormon düzeyi ölçümünde kullanıldı diğer testis dokusu ise histolojik olarak incelendi. Bunun için ratların testisleri çıkartılarak çevre dokulardan temizlendi. Işık mikroskopik incelemeler için kontrol, kolesterol ve kolesterol+probiyotik olmak üzere üç gruba ayrılmış ratlardan alınan testisler histolojik incelemeler için %10’luk formaldehid solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokular rutin histolojik doku takibi prosedürlerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Elde edilen parafin bloklardan Leica RM 2235 marka mikrotomdan 5 µm’luk kesitler alındı. Testislerin ayrıntılı histolojik yapısını incelemek amacıyla alınan kesitlere Crosssmon’un üçlü boyama tekniği uygulandı. Boyanan preparatlar Nikon

Eclipse 50İ araştırma mikroskobunda ayrıntılı olarak incelenerek fotoğraflandı (Crossman, 1937).

3.2.11. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için SPSS statistical software for Windows (SPSS-PC, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) kullanıldı. Total kolesterol (TK), testosteron (TES), Luteinizan hormon (LH), androjen bağlayıcı protein (ABP), Faktör ilişkili apoptoz düzeyinin (FAS), folikül uyarıcı hormon (FSH) düzeylerinin kontrol (K), kolesterollü yem ile beslenen grup (HK), kolesterollü yem ile birlikte probiyotik (HKL) verilen gruplar arasında farklılığın belirlenmesinde One-way analysis of variance (ANOVA) testi ve Duncan's multiple range-test ve gruplar arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson korelasyon testi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Testis Doku Örneklerinden ELISA için Ekstraksiyon

Testis dokularından ekstraksiyon ELISA kitlerinin prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen protein süpernatantlardaki protein miktarı Nonadrop Spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Ekstrakte edilen testis doku süpernatantları testosteron, folikül uyarıcı hormon, faktör ilişkili apoptoz düzeyleri ELISA testi ile belirlendi (Tablo 8).

Tablo 8. Testis doku süpernatantları Kontrol grubu, hiperkolesterolemi grubu ve hiperkolesterolemi+probiyotik grubu , FSH, TES, ve FAS düzeyleri

	K	HK	HKL
FSH (IU/ mg doku)	129,41±1,43 ^a	115,47±4,67 ^b	125,08±1,28 ^a
TES (ng/mg doku)	172,34±3,86 ^a	121,75±8,82 ^b	170,61±6,59 ^a
FAS (ng/mg doku)	1,32±0,06 ^a	1,87±0,08 ^b	1,51±0,03 ^a

a, b, c : Aynı satır farklı harflerle gösterilen gruplar arası farklar önemli (P<0,05).

4.2. Testis Doku Süpernatantındaki Testosteron, Folikül Uyarıcı Hormon ve Faktör İlişkili Apoptoz Düzeyleri

4.2.1. Testosteron Düzeyleri

Testosteron hormon düzeyi kontrol, kolesterollü yem ile beslenen grup, kolesterollü yem ile birlikte probiyotik verilen gruplar arasında sırasıyla, 172,34±3,86, 121,75±8,82, 170,61±6,59 ng/mg doku belirlendi. Testosteron hormon düzeyi diyetle kolesterol ilave edilmiş olan grupta kontrol grubuna göre önemli düzeyde testis dokusunda azaldığı tedavi amacıyla probiyotik verilen grupta artmaya başladığı belirlendi.

4.2.2. Folikül Uyarıcı Hormon Düzeyleri

Folikül uyarıcı hormon düzeyi kontrol, kolesterollü yem ile beslenen grup, kolesterollü yem ile birlikte probiyotik verilen gruplar arasında sırasıyla, 129,41±1,43, 115,47±4,67, 125,08±1,28 (UL/mg doku) belirlendi. FSH hormon düzeyi diyetle kolesterol ilave edilmiş olan grupta, kontrol grubuna göre önemli düzeyde testis dokusunda azaldığı tedavi amacıyla ve probiyotik verilen grupta artmaya başlayarak kontrol grubuna yaklaştığı belirlendi.

4.2.3. Faktör İlişkili Apoptoz Düzeyleri

Faktör ilişkili apoptoz düzeyinin kontrol, kolesterollü yem ile beslenen grup, kolesterollü yem ile birlikte probiyotik verilen gruplar arasında sırasıyla, $1,32\pm 0,06$, $1,87\pm 0,08$, $1,51\pm 0,03$ (ng/mg doku) belirlendi. FAS düzeyi diyetle kolesterol ilave edilmiş olan grupta, kontrol grubuna göre önemli düzeyde testis dokusunda arttığı tedavi amacıyla ve probiyotik verilen grupta azalmaya başladığı belirlendi.

4.3. Serumda Bazı Biyokimyasal Parametreler

Tablo 9. Kontrol grubu, hiperkolesterolemi grubu ve hiperkolesterolemi+probiyotik grubu, LH, ABP ve TK düzeyleri

	K	HK	HKL
LH (mIU/ml)	$12,15\pm 0,41^a$	$7,77\pm 0,15^b$	$7,85\pm 0,43^b$
ABP (nmol/L)	$46,74\pm 0,76$	$43,91\pm 1,72$	$47,12\pm 0,567$
TK (mg/dl)	$52,25\pm 1,75^a$	$75,75\pm 1,98^b$	$60,95\pm 0,84^c$

a, b, c : Aynı satır farklı harflerle gösterilen gruplar arası farklar önemli ($P<0,05$).

4.3.1. Total Kolesterol Düzeyleri

Total kolesterol düzeyi kontrol grubu, kolesterollü yem ile beslenen grup, kolesterollü yem ile birlikte *L. acidophilus* probiyotiği verilen gruplar arasında sırasıyla, $52,25\pm 1,75$, $75,75\pm 1,98$, $60,95\pm 0,84$ (mg/dl) belirlendi. Total kolesterol düzeyi diyetle kolesterol ilave edilmiş olan grupta total kolesterol düzeyinin arttığı tedavi amacıyla probiyotik verilen grupta ise total kolesterol düzeyinin düştüğü belirlendi.

4.3.2. Luteinizan Hormon Düzeyleri

Luteinizan hormon düzeyi kontrol, kolesterollü yem ile beslenen grup, kolesterollü yem ile birlikte probiyotik verilen gruplar arasında sırasıyla, $12,15\pm 0,41$, $7,77\pm 0,15$, $7,85\pm 0,43$ (mIU/ml) belirlendi. Luteinizan hormon düzeyi diyetle kolesterol ilave edilmiş olan grupta Luteinizan hormon düzeyinin azaldığı tedavi amacıyla probiyotik verilen grupta ise Luteinizan hormon düzeyinin hafif arttığı bunun istatistiksel olarak önemli olmadığı ($P>0,05$) belirlendi.

4.3.3. Androjen Bağlayıcı Protein Düzeyleri

Androjen bağlayıcı protein düzeyi kontrol, kolesterolü yem ile beslenen grup, kolesterolü yem ile birlikte probiyotik verilen gruplar arasında sırasıyla, $46,74 \pm 0,76$, $43,91 \pm 1,72$, $47,12 \pm 0,56$ (nmol/L) olarak belirlendi. Androjen bağlayıcı protein düzeyi, diyetle kolesterol ilave edilmiş olan grupta hafif azaldığı tedavi amacıyla probiyotik verilen grupta ise androjen bağlayıcı protein düzeyinin biraz arttığı bunun istatistiksel olarak önemli olmadığı ($P > 0,05$) belirlendi.

4.4. Serumda Bazı Biyokimyasal Parametre Sonuçları

%2 kolesterol ilave edilmiş grupta total kolesterol düzeyinin anlamlı düzeyde arttığı ($P < 0,05$), son dört hafta tedavi amacıyla *L. acidophilus* probiyotiği gavaj ile verilen grupta total kolesterol düzeyinin azaldığı belirlendi ($P < 0,05$).

Serumda luteinizan hormon düzeyi, kolesterolü yem ile beslenen grupta, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı ($P < 0,05$) kolesterolü yem ile birlikte probiyotik verilen grupta ise kolesterolü yem ile beslenen gruba göre çok az düzeyde arttığı bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi ($P > 0,05$).

Androjen bağlayıcı protein düzeyi serumda, kolesterolü yem ile beslenen grupta kontrol grubuna göre hafif azaldığı ($P > 0,05$) kolesterolü yem ile birlikte probiyotik verilen grupta ise hafif arttığı bu artışın önemli olmadığı belirlendi ($P > 0,05$).

4.5. Testis Doku Ekstraktındaki Bazı Hormon Sonuçları

Testis doku süpernatantlarındaki testosteron ve folikül uyarıcı hormon düzeyinin kolesterolü yem ile beslenen grupta, kontrol grubuna göre azaldığı bu azalışın istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0,05$) kolesterolü yem ile birlikte probiyotik verilen grupta ise artarak kontrol grubuna yaklaştığı belirlendi ($P < 0,05$).

Testis doku süpernatantlarındaki faktör ilişkili apoptoz düzeyi kolesterolü yem ile beslenen grupta, kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığı bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0,05$) kolesterolü yem ile birlikte probiyotik verilen grupta ise azalarak kontrol grubuna yaklaştığı belirlendi ($P < 0,05$).

4.6. Korelasyon İlişkisi

Gruplar arasındaki total kolesterol, testosteron, luteinizan hormon, androjen bağlayıcı protein, faktör ilişkili apoptoz düzeyinin, folikül uyarıcı hormon miktarlarının korelasyon ilişkisi incelendiğinde total kolesterol ile LH arasında önemli düzeyde negatif korelasyon olduğu ($r=-0,711^{**}$), ABP ile total kolesterol düzeyi arasında negatif korelasyon olduğu ($r=-0,282$), FSH ile testosteron arasında önemli düzeyde pozitif korelasyon olduğu ($r=0,535^{**}$), total kolesterol ile ise önemli düzeyde negatif korelasyon olduğu ($r=-0,656^{**}$) belirlendi. Testosteron hormon düzeyi ile total kolesterol düzeyi arasında ise anlamlı düzeyde negatif korelasyon olduğu ($r=-0,723^{**}$) belirlendi.

Faktör ilişkili apoptoz düzeyi ile LH, FSH, testosteron hormonu düzeyleri arasında önemli düzeyde negatif korelasyon olduğu ($r=-0,548^{**}$, $-0,698^{**}$, $0,821^{**}$) total kolesterol düzeyi ile arasında önemli düzeyde pozitif korelasyon ($r=0,821^{**}$) olduğu belirlendi (Tablo 10).

Tablo 10. Gruplar arasındaki Total kolesterol, testosteron, Luteinizan hormon, Androjen Bağlayıcı Protein, faktör ilişkili apoptoz düzeyinin ve Folikül uyarıcı hormon düzeylerinin korelasyon ilişkisi

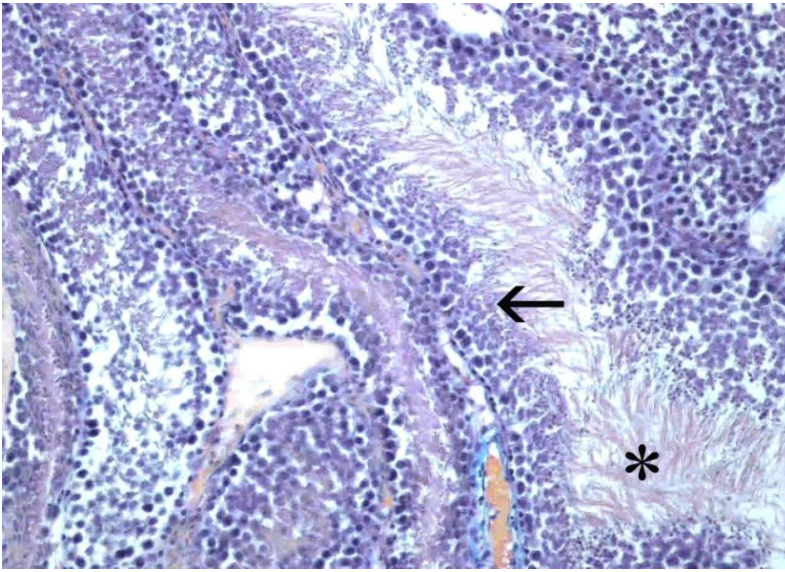
	LH	ABP	FSH	TES	TK	FAS
LH	1	0,129	0365	0,343	-0,711**	-0,548**
ABP		1	0,232	0,472*	-0,282	-0,356
FSH			1	0,535**	-0,656**	-0,698**
TES				1	-0,723**	-0,859**
TK					1	0,821**
FAS						1

*($P<0,05$), **($P<0,01$)

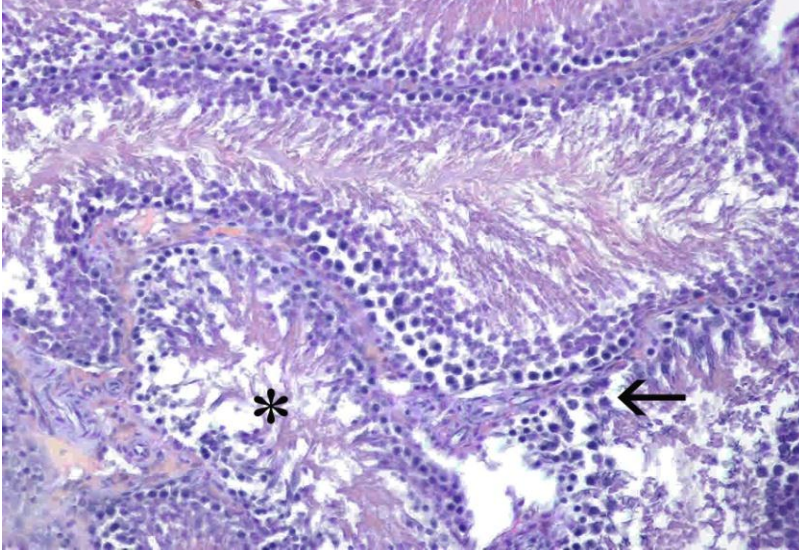
4.7. Histolojik İnceleme Sonuçları

Testis dokusu incelendiğinde, organın dıştan düzensiz sıkı bir bağ doku olan tunika albuginea ile sarılı olduğu belirlendi. Tunika albuginea'nın organın içersine kollar göndererek organı septumlara böldüğü ve septula testis adını verdiğimiz bu yapıların içersinde farklı uzunluklarda ve çaplarda seminifer tubullerin varlığı gözlemlendi. Seminifer tubüllerde farklı gelişme aşamalarındaki spermatozoidler ve sertoli hücreleri görüldü. Tubüllerin aralarındaki gevşek bağ dokuda ise küçük kan damarları ve Leydig hücrelerinin varlığı tespit edildi. Kontrol, kolesterollü yem ile beslenen grup,

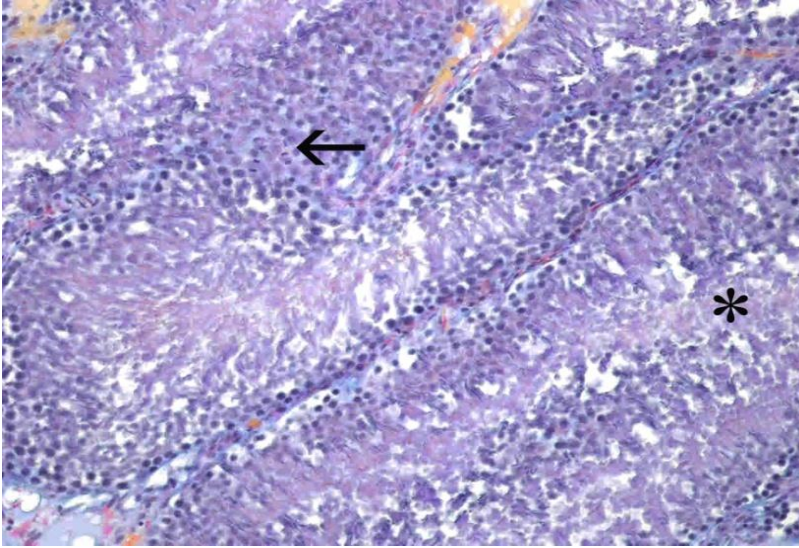
kolesterollü yem ile birlikte probiyotik verilen gruplar kendi aralarında tubul duvarlarına bakılarak değerlendirildiğinde; kolesterollü yem ile beslenen grubun testislerinde, tubül duvarındaki hücrelerde yer yer atrofi, vakuolizasyon ve duvar yapısının bütünlüğünde bozulmalar olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında belirgin bir farklılık olduğu tespit edildi. Ancak kolesterollü yem ile birlikte probiyotik verilen gruba baktığımızda tubul duvarının iyileştiği dejenerasyon hücre sayısının yok denecek kadar az olduğu ve duvar yapısının bütünlüğünü koruduğu tespit edildi (Şekil 12, 13 ve 14).



Şekil 12. Kontrol grubu rat testis dokusu. Spermatogenetik seri hücreleri (ok), seminifer tubül lümeni (yıldız). Triple.X20



Şekil 13. Kolesterol verilen grup rat testis dokusu. Seminifer tubüllerde birbirlerinden yer yer ayrılan spermatogenetik seri hücreleri (ok), seminifertübül lümeni (yıldız). Triple. X20



Şekil 14. Probiyotik ve kolesterol verilen grup rat testis dokusu. Spermatogenetik seri hücreleri (ok), seminifer tubül lümeni (yıldız). Triple. X20

5.TARTIŞMA

Yapılan birçok çalışmada, probiyotiklerin canlılar üzerindeki etkisi araştırılmış ve sağlık üzerine pozitif yönde olan önemi vurgulanmıştır. Özellikle ileri düzeyde kolesterol sentezinin bastırılmasına ve diyetle alınan fazla kolesterol absorpsiyonunun engellenmesini sağlayarak hiperkolesterolemi üzerine olan etkisi ifade edilmiştir (Kim ve ark, 2007).

Kolesterol homeostazı kolesterol biyosentezine, dolaşımdan kolesterolün uzaklaştırılmasına, diyet ile kolesterolün alınmasına, dışkı ve safra yoluyla kolesterolün atılmasına bağlı olarak değişmektedir (Vijaimohan ve ark., 2006). Kolesterol homeostazının kontrolünde beslenme önemli rol oynamaktadır. Kolesterol konsantrasyonu, vücutta anormal birikmesine bağlı olarak iyi ya da kötü karakterde olabilmektedir. Canlı yaşamında çok önemli fonksiyonları olduğu için kolesterol vücut için esansiyeldir. Hücre membranında önemli bir bileşendir, safra asitlerinin sentezinde, yağların ve yağda çözünen vitaminlerin emilmesinde, steroid hormonların sentezinde (cinsiyet hormonları, minerakortikoidler, glukokortiodler) ön maddesi olup önemlidir (Chen ve ark., 2004). Yüksek kolesterolü diyet ile beslenmek hiperkolestemiye neden olup arterioskleroz ve iskemik kalp rahatsızlığı, anormal lipid oksidasyon veya metabolizması gibi birçok rahatsızlığın oluşmasına yol açan kolesterol aynı zamanda istenmeyen bir suçludur (Onody ve ark., 2003). Hiperkolestemide kolesterol düzeyi serum da olduğu gibi eritrositlerde ve endotel hücrelerinde de artmaktadır. Kolesterol düzeyinin yükselmesi bu hücrelerde okside serbest radikal ürünlerin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Prasad ve Kalra, 1989). Hiperkolesterolemi günümüzde pek çok insanı ilgilendiren yaygın bir sağlık sorunudur.

Probiyotiklerin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, düzenli olarak laktik asit bakterileri tüketen erkek farelerde, yaşlarına uygun kontrol gruplarına kıyasla daha büyük testisler gözlemlenmiş ve serum testosteron seviyelerinin arttığı keşfedilmiştir. Çalışmada probiyotik olarak, *Lactobacillus reuteri* verilmiş ve mikroskobik yardımcı histomorfometriyle yapılan ayrıntılı incelemede farelerin, seminifer tübül-testis başına düşen spermatogenez, leydig hücre sayısının arttığı bildirilmiştir. Bunların yanında gonadal yaşlanmanın belirtilerinin azaldığı da ifade edilmiştir (Poutahidis ve ark., 2014).

Probiyotiğin canlı üzerindeki bazı parametreleri nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla yeni Zelanda tavşanlarına bir ay boyunca *Mega acidophilus* diye adlandırılan

(*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus helveticus* dan oluşan bir karışım) uygulanmıştır. Sonuç olarak probiyotik takviyesinin antioksidan etkinliği artırdığı ve testosteron seviyesinde anlamlı artışlara neden olduğu ortaya konmuştur (Ghoneim ve Moselhy, 2016).

12 hafta süren, 145 mg/dL'den daha yüksek serum düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-C) olan erkeklerin, 80 mg simvastatin randomize edildiği bir çalışma yapılmış. 15 dakika arayla alınan gonadal hormon sekresyonunu değerlendirmek için bir insan koryonik gonadotropin (hCG) uyarı testi alınmıştır. Biriktirilen serbest testosteronun, plasebo grubunda %4,9 artışına rağmen simvastatin grubunda %6,3 azaldığı biyolojik olarak kullanılabilir testosteronun ise simvastatin grubunda %10,2 azaldığı ve plasebo grubunda %1,4 arttığı belirtilmiştir. Serum FSH veya LH da hiçbir telafi edici artış olmadığı halde, simvastatin ile tedavi edilen grupta toplam 12 hafta sonra toplanmış, serbest ve biyolojik olarak mevcut testosteron düzeyinin azaldığını bildirmişlerdir (Dobs ve ark., 2000). Yaptığımız çalışmada 8 hafta boyunca %2 kolesterol verilen grupta testis dokusunda testosteron hormon düzeyinin azaldığını *L. acidophilus* probiyotiği verilen grupta ise testosteron hormon düzeyinin arttığı belirlendi.

L. rhamnosus PB01'in sperm kinematik parametreleri üzerine yapılan bir diğer çalışmada, testosteron, LH ve FSH düzeylerinin, hareketli sperm oranlarının anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir. Ayrıca *L. rhamnosus*' un kilo kaybı ve üreme hormonları üzerine olumlu düzenleyici bir ajan olarak etki ettiği de verilen bilgiler arasındadır (Dardmeh ve ark., 2017).

Tavuklara bir ay boyunca probiyotik uygulandığında (10 ve 20 gm probiyotik/kg) LH ve FSH hormon düzeylerinin önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir (Sultan ve Rahman., 2011).

Farelere, selenyum ile zenginleştirilmiş probiyotik ve yüksek yağlı diyet (% 15 domuz yağı, % 1 kolesterol, % 0,3 kolik asit ve % 83,7 basal diyet) uygulanan bir çalışma yapılmıştır. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin, testosteron düzeyi ve semen kalitesinin azaldığı, seminifer tübül atrofisi ve dejenerasyonu olduğu bildirilmiştir. Yüksek yağ diyetine selenyum ile zenginleştirilmiş probiyotik ilavesinin testikular doku hasarını azaltarak serum testosteron seviyesini artırdığını bildirmişlerdir (İbrahim ve ark., 2012).

İki ay boyunca yüksek yağlı diyet uygulanan erkek ratların üreme sistemi yapısının araştırıldığı başka bir çalışmada ise sperm kalitesi ve sayısının azaldığı, leydig hücre bozulmalarının arttığı, spermatozoid ve spermatid yapılanmalarının azaldığı, seminifer tübül çapında daralmanın meydana geldiği bildirilmiştir (Bataneh ve ark., 2005). Yaptığımız çalışmada kolesterolü yem ile beslenen grubun testisleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tübül duvarındaki hücrelerde yer yer atrofi, vakuolizasyon ve duvar yapısının bütünlüğünde bozulmalar olduğu gözlemlendi. Kolesterolü yem ile birlikte probiyotik verilen grupta ise tübül duvarının iyileştiği dejenere hücre sayısının yok denecek kadar az olduğu ve duvar yapısının bütünlüğünü koruduğu tespit edildi.

Son araştırmalara göre, yüksek yağlı diyet kaynaklı oluşan yüksek kolesterol seviyesinin, ürolojik bozukluklara (penis sertleşme sorunu, spermatogenezis anomalileri, iyi huylu prostat büyümesi ve kanser vb.) yol açabileceği bildirilmektedir. Bunu da genelde, dokulardaki epiteliyal yapıyı bozarak ilerlettiği ve işlevsel bozukluğa yol açtığı şeklinde açıklamaktadırlar (Lim ve ark., 2015).

Leydig hücresi erkeklerde testosteronun birincil kaynağıdır. Dolaşımdaki testosteron seviyelerinin, bireysel leydig hücrelerinin steroidojenik kapasiteleri ve testis başına düşen toplam leydig hücresi sayısı ile belirlendiği bildirilmiştir. Stresin neden olduğu serum glukokortikoid konsantrasyonundaki artışların testosteron biyosentetik enzim aktivitesini inhibe ederek testosteron salınım oranlarını düşürdüğü ifade edilmektedir (Hardy ve ark., 2005).

Kuzulara karahindiba özütünden elde edilen ekstrat ve inek sütünden izole edilmiş probiyotik verilen bir çalışmada, özütün hareketli sperm yüzdesini düşürdüğü, probiyotiğin seminifer tübül yapısında bir değişiklik göstermediği belirtildi. Probiyotik uygulamasıyla, en yüksek sperm-testosteron konsantrasyonu ve ileri hareketlilik gözlemlendiği bildirilmiştir (Zeitoun ve ark., 2014).

Endokrin bozucu ve testikular bir toksik olan Bisfenol A (BPA) (160 veya 480 mg / kg- günlük) erkek farelere gavaj yoluyla uygulanmış bir çalışmada, BPA' ya maruz bırakılan farelerin testislerinde Fas ve FasL düzeylerinde bir artış gözlemlenmiştir. BPA maruziyetinin testislerde kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün aktivasyonunu uyandırdığı da bildirilmiştir (Wang ve ark., 2010).

Bu tür epiteliyal yapı bozulmaları, üreme hormon seviyelerinin olumsuz yönde değişimlerine sebep olabilir. Probiyotik kullanımının, hücre dejenerasyonları azaltıcı ve tedaviye yardımcı etkisinin olduğunu çalışma sonuçlarımızla desteklendiğini düşünmekteyiz.

Mandalarla yapılan bir çalışmada, in vitro olgunlaşma ortamındaki FSH takviyesinin, proapoptotik genlerin yani BCL2 ile ilişkili X proteini (BAX), sitokrom c ve kaspaz-3'ün ekspresyonunda doz bağımlı bir azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur (Jain ve ark., 2016).

Kardiyovasküler risk altında olan hastalarla yapılan 12 haftalık bir çalışmada statin verilen gruplar kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Çalışmada dikkat çeken, Fas/Fas ligand etkileşiminin aterogenez ile ilgili olduğunu belirtilmesidir. Tedavi amaçlı atorvastatin kullanılmıştır. Yüksek kardiyovasküler risk altındaki kişilerde sFas konsantrasyonlarının arttığı ve sFasL' nin azaldığı bildirilmiştir. Bu proteinlerin vasküler hasarın yeni belirteçleri olabileceği ileri sürülmüştür. Atorvastatinin sFas'ı düşürdüğü bildirilmiştir. Atorvastatin ile kısa süreli tedavinin bu kişilerde antiinflamatuvar etkiler sergilediğini bildirmişlerdir (Blanco ve ark., 2007).

Çalışmamızın testis süpernatantlarında faktör ilişkili apoptoz düzeyi gruplarına göre sırasıyla $1,32 \pm 0,06^a$, $1,87 \pm 0,08^b$, $1,51 \pm 0,03^a$ olarak ölçüldü. Hiperkolestemi oluşturulan grupta Fas düzeyi önemli derecede artış göstermişten probiyotik eklenen grupta kontrole yaklaşan bir azalma olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra LH, FSH ve testosteron seviyelerinin artış gösterdiği durumlarda, FAS azalmıştır.

Bizim çalışmamızda bu verileri destekleyecek şekilde probiyotik tedavisi olan grupta, LH, FSH ve testosteron hormon düzeyi ile FAS arasında negatif korelasyon olduğu belirlendi. Yani FAS'ın düzeyinin azaldığı probiyotik verilen grupta LH, FSH ve testosteron hormon düzeyinin arttığı belirlendi.

Karbendazim kaynaklı üreme işlev bozukluğu oluşturulan erkek sıçanlara tedavi amaçlı kolaviron (*Garcinia kola* tohumundan izole edilmiş bir bioflavonoid) ve vitamin E verilmiştir. Erkek sıçanlara oral olarak karbendazim (200 mg/kg) tek başına veya kolaviron (100 ve 200 mg/kg) ile kombinasyon halinde verilmiştir. Karbendazime maruz bırakılan sıçanlarda, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Karbendazimin, steroidojenik enzimlerin aktivitelerinde, STAR protein ve ABP ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Karbendazim

verilen sıçanlarda germ hücre apoptozu teyit edilmiştir. Kolaviron'un, karbendazim ile tetiklenen üreme bozukluğuyla mücadelede yararlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Adedara ve ark., 2013).

Probiyotik tedavisi uyguladığımız grupta, ABP' nin kolesterol ile beslenen gruba oranla az da olsa artırdığını belirledik.

Apoptoz, testis gelişimi ve spermatogenez sırasında erkek germ hücrelerinin sayısının kontrol edilmesinde ve arızalı germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada standart rat yemine %2 kolesterol ilave edilen grupta total kolesterol düzeyinin anlamlı düzeyde arttığı, son dört hafta probiyotik (*L. acidophilus*) eklenen grupta ise total kolesterol düzeyinin azaldığı belirlendi. Laktik asit bakterilerinin, safra asitlerinin atılmasını artırarak kolesterolü düşürdüğü ileri sürülmektedir.

Yaptığımız çalışma ile yüksek kolesterolün sebep olduğu testis doku hücre dejenerasyonuna probiyotik tedavisinin iyi geldiği belirlenmiştir. Yüksek kolesterolle beslenen gruplarda azalan LH, FSH, testosteron ve ABP düzeylerinin probiyotik tedavisiyle artış gösterdiği, yüksek kolesterol ile artan faktör ilişkili apoptoz düzeyinin ise probiyotik tedavisiyle azaldığı belirlenmiştir.

Yaptığımız literatür taramasında Hiperkolesterolemi, testikular fonksiyon ve probiyotik (*L. acidophilus*) konularının birbiri ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, hiperkolesterolemi oluşturulmuş ratların testikular fonksiyon değişimine bakılmış, testikular dokuda probiyotik verilen grubun kontrol grubundaki değerlere yakınlığı, Probiyotiğin (*L. acidophilus*) tedaviye yardımcı, dejenerasyonları iyileştirmede etkili olduğu düşüncemizi desteklemiştir.

Daha uzun deneme süresi olabilecek daha ileri çalışmalar ışığında daha kesin ve net sonuçlar elde edileceğini düşünmekteyiz. Probiyotiğin gıda tüketimindeki pratik kullanımıyla, insan hayatında tek başına tedavi edici olmasa da hücre yapı bozukluklarının giderilmesinde uygulanan tedavilerde yardımcı olarak önemli rolü olduğu kananatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Adedara IA, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP, Farombi EO. Kolaviron prevents carbendazim-induced steroidogenic dysfunction and apoptosis in testes of rats. *Environ Toxicol Phar* 2013;35(3):444-453.
- Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB. Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 2011;141(2):139-50.
- Anthony CT, Rosselli M, Skinner MK. Actions of the testicular paracrine factor (P-Mod-S) on sertoli cell transferrin secretion throughout pubertal development. *Endocrinology* 1991;129(1):353-360.
- Arcaro G, Zenereb MB, Traviab D, Zentib GM, Covi G, Lechi A, Muggeo M. Non-invasive detection of early endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic subjects. *Atherosclerosis* 1995;114:247-254.
- Arief II, Afiyah ND, Wulandari Z, Budiman C. Physicochemical properties, fatty acid profiles, and sensory characteristics of fermented beef sausage by probiotics *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12 or *Lactobacillus acidophilus* IIA-2B4. *J. Food Sci* 2016;81(11):2761-2769.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 4. Baskı, Ankara, Tüba Yayınları. 2008; 1127-1156.
- Barefoot FS, Klaenhammer RT. Detection and activity of lactacin B, bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Environ Microbiol* 1983;45(6): 1808-1815.
- Bataineh HN, Nusier MK. Effect of cholesterol diet on reproductive function in male albino rats. *Saudi Med J* 2005;26(3):398-404.
- Bayram F, Sabuncu T, Özkan Y, Gökçe C, Cesur M, Sönmez A, Ertek S, Aslan İ, Özoğuz U, Torun AI, Üçler R. Lipid metabolizma bozuklukları tanı ve tedavi kılavuzu. *Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği* 2. Baskı, Ankara, Bayt Grafik Tasarım ve Yayın Hizmetleri. 2016;11-58.
- Black SM, Harikrishna JA, Szklarz GD, Miller WL. The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme' cytochrome P450_{sc}. *Proc Natl Acad Sci Cell Biology* 1994;9:7247-7251.
- Blanco LMC, Martín JLM, Munoz BG, Orbe J, Paramo JA, Michel JB, Ortiz A, Meilhac O, Egido J. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:916-922.
- Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:11298-11302.

- Bouchier HL, Lartigue L, Newmeyer DD. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005;115(10):2640–2647.
- Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delaland C. Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis* 2011;1(2):90–94.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's illustrated reviews biochemistry. 3. Baskı., İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2007;217-242.
- Chen H, Ge RS, Zirkin BR. Leydig cells: from stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol* 2009;306(2):9-16.
- Chen ZJ, Peng B, Wang SY, Peng XX. Rapid screening of highly efficient vaccine candidates by immunoproteomics. *Proteomics* 2004;4:3203–3213.
- Crossman G. A modification of mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec* 1937;69:33-38.
- Çakır İ, Çakmakçı L. Probiyotikler: tanımı, etki mekanizması, seçim ve güvenilirlik kriterleri. *Türkiye Gıda Dergisi* 2004;29:427-434.
- Çomak GEM, Ergin F, Küçükçetin A. Sindirim sistemi modellerinde probiyotik mikroorganizmaların canlılığı. *Akademik Gıda* 2016;14(2):158-165.
- Dardmeh F, Alipour H, Gazerani P, Van der Horst G, Brandsborg E, Nielsen HI. *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (DSM 14870) supplementation affects markers of sperm kinematic parameters in a diet-induced obesity mice model. *Plos One* 2017;12(10):1-17.
- Dadhich RK, Barrionuevo FJ, Real FM, Lupianez DG, Ortega E, Burgos M, Jimenez R. Identification of live germ-cell desquamation as a major mechanism of seasonal testis regression in mammals: a study in the iberian mole (*Talpa occidentalis*). *Biol Reprod* 2013;88(4):1-12.
- Davidoff MS, Middendorff R, Holstein AF. Dual nature of leydig cells of the human testis. *Biomed Rev* 1996;6:11-41.
- De Boever P, Wouters R, Verschaeve L, Berckmans P, Schoeters G, Verstraete W. Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *App Microbiol Biotechnol* 2000;53:709-714.
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, Lemeur M, Corsi PS. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:13612-13617.
- Dobs AS, Schrott H, Davidson MH, Bays H, Stein EA, Kush D, Wu M, Mitchel Y, Illingworth RD. Effects of high-dose simvastatin on adrenal and gonadal steroidogenesis in men with hypercholesterolemia. *Metabolism* 2000;49(9):1234-1238.

- Doğan Ş, Mason MC, Govindaraju A, Besler L, Kaya A, Stoke J, Rowe D, Memili E. Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm. *J Reprod Dev* 2013;59:18-26.
- Dong O, Hardy P.M. *Male Hypogonadism- Leydig Cell Function in Man*. 1.Baskı; New York Springer Science-Business Media, Humana Press. 2004;727-978.
- Du Toit M, Dicks LMT, Holzapfel WH. Identification of heterofermentative *Lactobacilli* isolated from pig faeces by numerical analysis of total soluble cell protein patterns and RAPD-PCR. *Lett Appl Microbiol* 2003;37:12-16.
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4): 495–516.
- Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr* 2002; 88(1):39-49.
- Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 1997;222:28-31.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-378.
- Galardo MN, Gorga A, Merlo JP, Rgueira M, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Riera MF, Meroni SB. Participation of HIFs in the regulation of sertoli cell lactate production. *Biochimie* 2017;132:9-18.
- Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics history. *J Clin Gastroenterol* 2016; 50:116-119.
- Guo J, Zhou H, Su Z, Chen B, Wang G, Wang CQF, Xu Y, Ge RS. Comparison of cell types in the rat leydig cell lineage after ethane dimethane sulfonate treatment. *Soc Reprod Fertil* 2013;145:371–380.
- Ghoneim MA, Moselhy SS. Antioxidant status and hormonal profile reflected by experimental feeding of probiotics. *Toxicol Ind Health* 2016;32(4):741–750.
- Hammond GL, Underbill DU, Rykse HM, Smith CL. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Mol Endocrinol* 1989;3(11):1869-1876.
- Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue* 2005;322(1):147–153.
- Hayes FJ, Decruz S, Seminara SB, Boepple PA, Crowley WF. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(1):53-8.
- Heckert LL, Griswold MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:129-148.

- Heinz T, Schuchardta JP, Möllera K, Hadjib P, Hahna A. Low daily dose of 3 mg monacolin K from RYR reduces the concentration of LDL-C in a randomized, placebo-controlled intervention. *Nutr Res* 2016;36(10):1162-1170.
- Hikim APS, Swerdloff R.S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *J Reprod Infertil* 1999;4:38-47.
- Holdcraft RW, Braun R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 2004; 27:335-342.
- Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab* 2010;7:25-47.
- Ibrahim HAM, Zhu Y, Wu C, Lu C, Ezekwe MO, Liao SF, Haung K. Selenium-enriched probiotics improves murine male fertility compromised by high fat diet. *Biol Trace Elem Res* 2012;147:1-3.
- Johnson L, Thompson DL, Varner DD. Role of sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci* 2008;105:23–51.
- Jain A, Jain T, Kumar P, Kumar M, De S, Gohain M, Kumar R, Datta TK. Follicle-stimulating hormone-induced rescue of cumulus cell apoptosis and enhanced development ability of buffalo oocytes. *Domest Anim Endocrinol* 2016;55:74–82.
- Kaminski MA, Corbin CJ, Conley AJ. Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. *Biol Reprod* 1999; 60:119–127.
- Kangalgil M, Canbolat E. Kolesterolün bazı hastalıkların patogenezinde ki rolü. *Eur JHS* 2016;2(2):56-63.
- Kangasniemi M, Kaipia A, Toppari J, Perheentupa A, Huhtaniemi I, Par-Vinen M. Cellular regulation of follicle-stimulating hormone binding in rat seminiferous tubules. *J Androl* 1990;11:336-343.
- Karagül H, Altıntaş A, Fidancı RU, Sel T. *Klinik Biyokimya*. Ankara., Medisan Yayınları. 2000;1:133-136.
- Kaur G, Thompson LA, Duofur JM, Sertoli cells–immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014;30:36–44.
- Kim P, Jung MY, Chang YH, Kim S, Kim SJ, Park YH. Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74(5):1103-1111.
- Kirk C. Loand Irustin domes. Can we grow sperm? A translational perspective on the current animal and human spermatogenesis models. *Asian J Androl* 2011;13: 677-682.

- Laurens HA, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy Journal* 2001;11:1-17.
- Lim W, Bae H, Yang Sohn J, Jeong W, Hun Kim S, Gwonhwa Song G. Dietary cholesterol affects expression of prostatic acid phosphatase in reproductive organs of male rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;456:421-427.
- Lira Neto FT, Vu Bach P, Najari BB, Li SP, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 2016;59:10-26.
- Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000;190:244-254.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis an overview of cell death. *AJP* 1995;1:146-152.
- Maldonado R, Mancilla H, Villarroel-Espindola F, Slebe F, Slebe JC, Mendez R, Guinovart JJ, Concha II. Glycogen synthase in sertoli cells: more than glycogenesis. *J Cell Biochem* 2016;117(11):2597-2607.
- Maqdasy S, Baptissart M, Aurélie Vega A, Baron S, Lobaccaro JMA, Volle DH. Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted. *Mol Cell Endocrinol* 2013;368:30-46.
- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 2004;71(1):28-37.
- Mariana R, Marcelo RG, Noel GM, Herminia PE, Beatriz CS, Beatriz MS, Fernanda RM. Germ cells regulate 3-hydroxybutyrate production in rat sertoli cells. *Gen Comp Endocrinol* 2017;248:5-15.
- Martin LH, Richardson AB, Nyange MP, Lavreys L, Hillier LS, Chohan B, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Bwayo J, Kreiss J. Vaginal *Lactobacilli*, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999;180:1863-1868.
- Martinez MJM, Arrazola M, Mayas MD, Carrera-Gonzalez MP, Garcia MJ, Ramirez - Exposito MJ. Diet-induced hypercholesterolemia impaired testicular steroidogenesis in mice through the renin-angiotensin system. *Gen Comp Endocrinol* 2011;173:15-19.
- Mclachlan RI, Odonnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: in sights for development of the male hormonal contraceptive. *J Androl* 2002;23(2):149-162.
- Morelli L, Capurso L. FAO/WHO Guidelines on probiotics ten years later. *J Clin Gastroenterol* 2012;46:1-2.

- Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endoc Rev* 2004;25(5):747-806.
- Nguyen A, Bouscarel B. Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis. *Cell Signal* 2008;20:2180-2197.
- Nair SVG, Rajamohan T. The role of coconut water on nicotine-induced reproductive dysfunction in experimental male rat model. *FNS* 2014;5:1121-1130.
- Onody A, Csonka C, Giricz Z, Ferdinandy P. Hyperlipidemia hinduced by a cholesterol-rich diet leads to enhanced peroxynitrite formation in rat hearts. *Cardiovasc Res* 2003;58:663-670.
- Ow YLP, Green RD, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2008;9(7):532-542.
- Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int J Mol Sci* 2010;11(6):2499-522.
- Önür ND, Beyler AR. Safra asitleri metabolizması. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001;54(1):65-76.
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004;81(1):802-809.
- Park SC, Hwang MH, Kim YH, Kim JC, Song JC, Lee KW, Jeong KS, Rhee MH, Kim KS, Kim TW. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *World J Microbiol Biotechnol* 2006;22(1):35-37.
- Park HY, Gun Kim J, Won Shin Y, Hun Kim S, Youn Whang K. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* atcc 43121 on cholesterol metabolism in rats. *J Microbiol Biotechnol* 2007;17(4):655-662.
- Prasad K, Kalra J. Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. *Angiology* 1989;40(9):835-843.
- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 2006;100(6):1171-1185.
- Patel DK, Shah KR, Pappachan A, Gupta S, Singh DD. Cloning expression and characterization of a mucin-binding GAPDH from *Lactobacillus acidophilus*. *Int J Biol Macromol* 2016;91:338-346.
- Pintus E, Ros-Santaella J, Garde JJ. Beyond testis size links between spermatogenesis and sperm traits in a seasonal breeding mammal. *Plos One* 2015;10(10):139-240.

- Poutahidis T, Springer A, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, Ibrahim YM, Chatzigiagos A, Alm EJ, Erdman SE. Probiotic microbes sustain youthful serum testosterone levels and testicular size in aging mice. *Plos One* 2014; 9(1):1-12.
- Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Lactic acid bacteria their antimicrobial compounds and their uses in food production. *An Biol Res* 2010;1(4):218-228.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002;192(2):131-137.
- Ravina CG, Seda M, Pinto FM, Orea A, Fernandez-Sanchez M, Pintado CO, Canden ML. A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod* 2007;22 (6):1617–1625.
- Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(9):3763–3766.
- Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 2000;130:396-402.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 2010;205(2):117-131.
- Sacks DB. Diabetes mellitus. In: Burtis CA, Ashwood ER (editors). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Co. 1999;766-776.
- Saez LTE, Boarelli PV, Monclus MA, Cabrillana ME, Clementi MA, Espinola LS, Cid Barria JL, Vincenti AE, Santi AG, Fornes MW. Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *Plos One* 2010;5(10):1-8.
- Santini A, Novellino E. Nutraceuticals in hypercholesterolemia: an overview. *BJP* 2016; 174(11):1450-1463.
- Schrezenmeir J, De Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2):361-364.
- Schulz RW, Miura T, Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 2002;26:43-56.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine* 1997;18(6):739–773.
- Skinner MK, Norton JN, Mullaney BP, Roselli M, Whaley PD, Anthony CT. Cell-cell interactions and the regulation of testis function. *An N Y Acad Sci* 1991; 637(1):354-363.
- Skinner MK. Sertoli cell biology. In: Skinner MK, Griswold MD. *Sertoli cell-somatic cell interactions*. Washington: 2005;18:317-328.

- Sluka P, Odonnell L, Bartles JR, Stanton PG. FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat sertoli cells in vitro and in vivo. *J Endocrinol* 2006;189(2):381-395.
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109(3):323-330.
- Sözbilir Bayşu N, Bayşu N. *Biyokimya*. Ankara, Öncü Basımevi. 2008;520-523.
- Spierings DC, Vries EG, Vellenga E, Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, Jong S. Tissue distribution of the death ligand trail and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004;52:821-831.
- Sharpe RM, McKinnell C, Fisher JS, Fisher CK. Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;125:769–784.
- Sun JH, Yu JT, Tan L. The role of cholesterol metabolism in alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 2015; 51(3): 947-965.
- Sultan KH, Rahman SYA. Effect of probiotic on some physiological parameters in broiler breeders. *Int J Poult Sci* 2011;10(8):626-628.
- Tannock GW. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends Biotechnol* 1997;15(7):270–274.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96:245-254.
- Verdenelli MC, Coman MM, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. Evaluation of antipathogenic activity and adherence properties of human *Lactobacillus* strains for vaginal formulations. *J Appl Microbiol* 2014;116(5):1297-1307.
- Vijaimohan K, Jainu M, Sabitha KE, Subramaniyam S, Anandhan C, Shyamala Devi CS. Information beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sci* 2006;79(5):448-454.
- Wang Q, Zhao XF, Ji YL, Wang H, Liu P, Zhang C, Zhang Y, Xu DX. Mitochondrial signaling pathway is also involved in bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol Lett* 2010;199:129–135.
- Weinbauer FG, Luetjens MC, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. *Andrology* 2010;11-59.
- Welsh M, Saunders TKP, Atanassova N, Sharpe MR, Smith BL. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *The Faseb J* 2017;23(12):4218-4230.

- Whitfield M, Xavier Pollet-Villard X, Rachel Levy R, Drevet JR, Fabrice Saez F. Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia. *Asian J Androl* 2015;17:742-748.
- Xia F, Wang N, Han B, Li Q, Chen Y, Zhu C, Chen Y, Pu X, Cang Z, Zhu C, Lu M, Meng Y, Guo H, Chen C, Lin D, Zheng J, Kuang L, Tu W, Li B, Hu L, Shen Z, Lu Y. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in aging men and women: increasing total testosterone in aging men. *Neuroendocrinol* 2017;104(3):291-301.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005;115(10):2656-2664.
- Yao HHC, Whoriskey W, Capel B. Desert hedgehog/patched 1 signaling specifies fetal leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 2002;16:1433–1440.
- Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1985;822(4):267-287.
- Yılmaz B. Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. Ankara. Tuğra Ajans. Feryal Matbaacılık 1999;1:340-395.
- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(1):47-59.
- Zeitoun M, Farahna M, Al-Sobayil K, Abdel-Salam A. Impact of the aqueous extract of dandelion, probiotic and their synbiotic on male lamb's testicular histopathology relative to semen characteristics. *J Anim Sci* 2014;4(1):23-30.
- Zhang M, Xie Z, Gao W, Pua L, Weia J, Guoa C. Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux in rats. *Nutr Res* 2016;36(3):271-279.
- Zirkin BR, Chen H. Regulation of leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod* 2000;63:977-981.

EK 1: Etik Kurul İzni



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : B.30.2.ODM.0.20.09.00-050.04 - 146 -173

03/10/2016

Konu : Araştırma Projeniz hk.

Doç. Dr. Gülay ÇİFTÇİ
OMU Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

2016/27 numaralı **Kolesterol *Lactobacillus acidophilus*'un ratlarda testikular fonksiyona etkisinin araştırılması** konu başlıklı Projeniz; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun **29.08.2016** tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açtlarından uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılara ait olmak kaydıyla ve 6 aylık dönemler halinde Çalışma Raporu verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür


Prof. Dr. Feriŕat KOLBAKIR
HADYEK Baŕkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Elif TUNA

Doğum Yeri: Trabzon

Doğum Tarihi: 14.08.1991

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans - Ondokuz Mayıs Üniversitesi / Fen Fakültesi /
Biyoloji Bölümü (2013)
Yüksek Lisans - Ondokuz Mayıs Üniversitesi /
Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı
(2017)

Çalıştığı Kurum ve Yıl: Monitor Medikal Araştırma ve Danışmanlık Şirketi
Klinik Araştırma Saha Koordinatörü (Şubat-2017)

E-posta: eliftuna_91@hotmail.com