



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE SEMİNAL PLAZMA ISI ŞOKU PROTEİNİ 27 (HSP27) DÜZEYİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zelife KOÇOĞLU

Samsun
Ocak-2020



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE SEMİNAL PLAZMA ISI ŞOKU PROTEİNİ 27 (HSP27) DÜZEYİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zelife KOÇOĞLU

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN**

**Samsun
Ocak-2020**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Zelife KOÇOĞLU tarafından Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN Danışmanlığında hazırlanan “İdiyopatik erkek infertilitesi ile seminal plazması şoku proteini 27 (HSP27) düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 24/01/2020 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ramazan AŞÇI,
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye : Doç. Dr. Gizem Dönmez YALÇIN,
Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN,
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

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

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde engin bilgi ve birikimiyle verdiği her türlü destekten dolayı, değerli Danışman Hocam Sayın Dr. Öğr. Ü. M. Alper ARSLAN' a

Yüksek lisans eğitimim süresince, verdikleri emeklerinden dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Nurten KARA' ya, Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ' e

Hastalara tanı konulmasında ve aynı zamanda hasta gruplarının oluşturulmasında emeği geçen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ramazan AŞÇI'ya

İş hayatım ve tez çalışmam boyunca her türlü kolaylığı sağlayan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Özgür Korhan TUNÇEL' e ve değerli çalışma arkadaşlarım Esmâ ARSLAN ve Mehtap GÜNER'e

Hasta ve kontrol grupları için örneklerimin toplanmasında ve örneklerin analiz edilmesinde büyük emeği olan Biyolog Gökhan ZENGİN' e, yüksek lisans arkadaşım Selin KAYA' ya

Manevi desteklerinden dolayı yüksek lisans arkadaşlarım, Esmâ Gökçen ACAR' a, Habibe Nur ATMACA'ya,

İstatistiksel analiz kısmındaki yardımlarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Ömer ÖZEN'e

İlham kaynağım, mutluluğum, evlatlarım, Feyza ve Dila KOÇOĞLU'na, başucu kitabım, en özel destekçim olan sevgili eşim Öğr. Gör. Suat KOÇOĞLU' na ve beni bu günlere getiren, canım abilerim İhsan ve İsmail YILDIZ'a canım annem Lütfiye YILDIZ'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, **PYO. TIP. 1904.19.013** proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE SEMİNAL PLAZMA ISI ŞOKU PROTEİNİ 27 (HSP27) DÜZEYİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Çalışmamızda idiyopatik oligoastenoteratozoospermi (OAT) tanısı alan infertil erkeklerde seminal plazma ısı şok proteini 27 (HSP27) düzeyi değişiminin ve farklı semen parametreleri ile arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmaya Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Polikliniği'nde idiyopatik infertilite tanısı konulan yaşları 20-50 arasında değişen OAT sendromlu erkek hastalar katıldı. Güç analizi hesaplamasına göre (%95 güven ve %99,5 test gücü), 20 sağlıklı (kontrol grubu) ve 20 hasta çalışmaya dahil edildi. Seminal plazma örneklerinde spektrofotometrik sandviç ELISA yöntemiyle iki grup için seminal plazma HSP27 protein konsantrasyonları ölçüldü. HSP27 düzeyi ile semen parametreleri arasındaki korelasyonlar analiz edildi. Sonuçlar istatistiksel olarak SPSS programında değerlendirildi.

Bulgular: Seminal plazmada ölçülen HSP27 konsantrasyonu ortalaması, hasta grubunda $23,01 \pm 5,93$ ng/ml, kontrol grubunda ise $28,47 \pm 8,47$ ng/ml olarak ölçüldü. OAT grubunun kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu tespit edildi. (Mann Whitney U Testi, $p=0,013$). HSP27 protein miktarı ile semen parametreleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde, OAT grubunda HSP27 ile vitalite arasında anlamlı pozitif yönde orta derecede bir korelasyon ($r=0,537$ $p=0,015$), kontrol grubunda ise HSP27 ile sperm konsantrasyonu arasında anlamlı negatif yönde orta derecede bir korelasyon saptandı ($r=-0,525$, $p=0,018$).

Sonuç: Bu çalışmayla literatürde ilk kez, OAT tanısı konulan infertil erkeklerin seminal plazmasında HSP27 konsantrasyonu ve bunun çeşitli semen parametreleriyle olan ilişkisi incelenmiştir. HSP27 protein konsantrasyonunun OAT grubunun kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu, OAT grubunda HSP27 ile vitalitenin anlamlı pozitif korelasyonu ve de kontrol grubunda HSP27 ile sperm konsantrasyonunun anlamlı negatif korelasyonu saptanmıştır. Bulgularımız ekstrasellüler HSP27'nin idiyopatik erkek infertilitesi patogenezinde rolü olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi; OAT; HSP27; ısı şoku proteini; ELISA

Zelife KOÇOĞLU, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi- Samsun, Ocak-2020

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN IDIOPATHIC MALE INFERTILITY AND SEMINAL PLASMA HEAT SHOCK PROTEIN 27 (HSP27) LEVEL

Aim: This study is aimed to determine the seminal plasma heat shock protein 27(HSP27) level of in infertile men diagnosed with idiopathic oligoasthenotratzoospermia (OAT) and its relationship with different semen parameters.

Material and Methods: Infertile male patients who were admitted to the Department of Urology at Ondokuz Mayıs University Hospital and diagnosed with idiopathic OAT syndrome were enrolled in this study. Based on the power analysis (at 95% confidence interval and 99.5% test power), the study included 20 patients and 20 healthy men (control group) of ages between 20 and 50. Seminal plasma HSP27 protein concentrations in semen samples were determined for both groups by using spectrophotometric sandwich ELISA method. The correlations between HSP level and different semen parameters were analyzed. The results were evaluated statistically by SPSS program.

Results: The mean concentration of HSP27 protein in the seminal plasma was found to be 23.01 ± 5.93 ng/ml in the patient group and 28.47 ± 8.47 ng/ml in the control group. OAT syndrome was found significant lower than control groups (Mann Whitney U test, $p=0.013$). When the relationship between the semen parameters of the OAT group and HSP27 protein level was analyzed, there was significant in medium degree correlations were found between HSP27 level and vitality ($r=0.537$ $p=0.015$) at OAT group in positive direction. In the control group, there was a significant negative correlation between HSP27 and sperm concentration ($r=-0.525$, $p=0.018$).

Conclusion: This study, for the first time in literature, investigates the concentration of the HSP27 in the seminal plasma of infertile men diagnosed with OAT syndrome and its relationship with various semen parameters. HSP27 protein concentration was significantly lower in OAT group compared to controls, significant positive correlation between HSP27 and vitality in OAT group and significant negative correlation between HSP27 and sperm concentration in control group. Our findings suggest that extracellular HSP27 may play a role in the pathogenesis of idiopathic male infertility.

Keywords: Male infertility; OAT; HSP27; heat shock protein; ELISA

Zelif KOÇOĞLU, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University- Samsun, January-2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF	: Apoptoz indükleyici Faktör
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
Bcl-2	: B-cell leukemia/lymphoma-2
ATP	: Adenozin Trifosfat
AZF	: Azospermi Faktör Bölgesi
CARD	: Kaspaz Aktivasyon Alım Alanı
CFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör Protein
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
DISC	: Ölüm indükleyen Sinyalleşme Kompleksi (Death-inducing signaling complex)
DHT	: Dihidrotestosteron
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi
ER	: Endoplazmik Retikulum
FADD	: Fas- İlişkili Ölüm Alanı İçeren Protein
FASL	: Fas Ligand
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GER	: Granüllü endoplazmik retikulum
HSPA2	: Isı şoku proteini A2 (Heat-shock protein A2)
GRP	: Glukozla Düzenlenen Protein
JDP	: J-domain protein
HSF	: Isı Şoku Faktörü
HSP	: Isı Şoku Proteini
HSE	: Isı Şoku Elementi
IAP	: Apoptoz Protein İnhibitörü
MA	: Olgunlaşma Duraklaması (Maturation Arrest)
OAT	: Oligoasthenoteratozoospermi
SMAC	: Second mitochondria-derived activator of caspase (İkinci Mitokondri Türevli Kaspaz Aktivatörü)

SKH	: Spermatogonyal K�k Hücre
PAS	: Periyodik Asit – Schiff
ROS	: Reaktif Oksijen T�rleri
CARD	: Kaspaz Bağlayıcı Domeyn
TNF	: T�mor Nektoz Faktörü
TRAIL	: TNF İlişkili Apoptoz İnd�kleyici Ligand
TNFR	: T�mor Nektoz Faktör Resept�r�
TRAIL	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
WHO	: Dünya Sağlık �rg�t�
XIAP	: X-bağlı apoptozis protein inhibitörü (X-linked inhibitor of apoptosis protein)
SERPINH1	: Serpin Family H Member 1
P38MAPK	: p38 mitojenle aktiveřtirilen protein kinaz
ERK	: Hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz
PKC	: Protein kinaz C

İÇİNDEKİLER TABLOSU

1. GİRİŞ.....	10
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1. Erkek İnfertilitesi	13
2.1.1 Epidemiyoloji ve etyoloji.....	13
2.1.2. Oligoasthenoteratozoospermi (OAT) Sendromu	17
2.1.3. Erkek İnfertilitesinde Genetik Nedenler	17
2.1.4. Erkek Üreme Sistemi	18
2.1.5. Erkek Genital Sisteminin Embriyolojik Gelişimi	24
2.1.6. Sperm Oluşumu ve Fizyolojisi	25
2.2. Apoptoz	36
2.2.1. İntrinsik/Mitokondriyal Yolak	39
2.2.2. Ekstrinsik Yolak	40
2.2.3. Spermatogenez ve Apoptoz	45
2.3. Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins)	47
2.3.2. Apoptoz, HSP27 ve Erkek İnfertilitesinin Birlikte Değerlendirilmesi	60
3. MATERYAL-METOT.....	64
3.1 Materyal	64
3.1.1 Hastaların Seçimi	64
3.1.2. Örneklerin Hazırlanması	64
3.1.3. ELISA Kitinin Özellikleri.....	65
3.1.4. Kullanılan Diğer Materyaller	65
3.2. Metot	65
3.2.1. İstatistiksel Değerlendirme	68
4. BULGULAR	69
5. TARTIŞMA.....	86

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
7. KAYNAKLAR.....	86
8. EKLER.....	103
9. ÖZ GEÇMİŞ.....	109



1. GİRİŞ

Fertilite, erkek ve kadın üreme sistemlerinin anatomik ve fizyolojik olarak normal çalışmasıyla işleyen fizyolojik bir süreçtir. Erkek veya kadının, üreme sisteminde herhangi bir sebeble bozulma ortaya çıkması fertiliteyi olumsuz yönde etkiler ve infertiliteye yol açar (Ferlin ve ark. 2006). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) , infertiliteyi, minimum bir yıl boyunca korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olunamaması olarak tanımlar. İnfertilite vakalarının yaklaşık %50'si erkek kaynaklıdır (Ferlin ve ark., 2006). Genetik çalışmalar, mutasyon taramaları, hayvan modelleri ve son yıllardaki temel araştırmalar, spermatogenez aşamasındaki herhangi bir bozulma ve erkek infertilitesinin genetik sebeplerinin yüksek prevalansını (%10-15) göstermektedir. Erkek infertilitesinin birden fazla sebebi vardır ve karmaşık gen-çevre etkileşimlerinden kaynaklanması nedeniyle belirlenmesi zor olduğu için infertilitenin genetiği üzerine yapılan çalışmalar oldukça karmaşıktır (Leaver RB,2016).

Erkek infertilite vakalarının %90'ı gibi büyük bir kısmında düşük sperm sayısı, kötü sperm kalitesi veya her ikisi birden mevcuttur. Anatomik sorunlar, hormonal dengesizlikler ve genetik defektler diğer nedenlerdendir. Genetik nedenlerin yanı sıra bir erkeğin genel sağlık durumu, yaşam tarzı seçimi, sosyal durumu, iş ortamı gibi diğer etkenler de kişinin fertilitesi üzerinde yoğun bir etki göstermektedir (Yang Y ve ark., 2015). Endokrin hastalıklar, enfeksiyon ve inflamasyona bağlı hastalıklar, varikosel, kriptorşidizm, travma, testiküler tümör, kistik fibroz ve obstrüktif bozukluklar infertilite ile ilişkili olduğu bilinen diğer faktörlerdendir. Tüm bu faktörlerin dışında kalan vakalar idiyopatik erkek infertilitesi olarak tanımlanmaktadır ve tüm infertilite vakalarının %31'ini oluşturmaktadır (Jungwirth ve ark., 2012). İdiyopatik infertilite tanısı alan erkeklerin yaklaşık üçte biri idiyopatik azospermi, diğer üçte ikisi ise idiyopatik oligoastenoteratozoospermi olarak sınıflanmaktadır (Jungwirth ve ark., 2012). Tanıda semen analizi kullanılır ve bu analizde toplam sperm sayısı, konsantrasyonu, morfolojisi, canlılığı, motilitesi, vitalitesi ve semen pH'sı gibi parametreler bir arada değerlendirilir. Semende hiç sperm olmaması durumu azospermi, az sayıda sperm bulunması durumu oligozoospermi olarak tanımlanır. Sperm motilitesinin düşük olması durumu astenozoospermi, morfolojik incelemede abnormal formlarda bulunan sperm sayısının yüksek olması durumu ise teratozoospermi olarak adlandırılır. Ejakülatında sperm bulunan infertil erkek hastalarda sıklıkla bu anomalilerin üçüne de aynı anda rastlanır ve bu durum oligoastenoteratozoospermi (OAT) sendromu olarak tanımlanır. Dünya Sağlık

Örgütü (WHO)'nın açıkladığı 2010 yılı referans değerlere göre, semen analizi sonucu sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml'nin, progresif motil sperm yüzdesi %32'nin ve normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %4'ün altında olan hastalar OAT olarak tanımlanır (Cooper ve ark., 2010).

Apoptoz, spermatogenezde, embriyogenezin sonuna doğru en uygun germ/Sertoli hücresi oranını düzenlerken, yetişkin yaşamda da çeşitli fizyolojik ve çevresel etkenler nedeniyle hasar görmüş germ hücrelerin seminifer epitelden temizlenmesinde görev alır (Aitken ve Baker, 2013). Apoptoz, Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek kapasitede erkekgametlerinin üretimini ve normal proliferasyon seviyelerini kontrol eder (Sakkas ve ark., 1999).

Isı şok proteinleri, stres proteinleri de denilen ısışoku tarafından indüklenen ve hücrede çok iyi korunmuş bir protein ailesidir (Parcellier ve ark., 2003). HSP'lerısıgibi fiziksel ajanlar, çeşitli farmasötikleri veya çevresel kirleticileri kapsayan kimyasal ajanlar, virüsler, bakteriler ve ökaryotik parazitler gibi patojenlerin oluşturduğu moleküler hasara karşıhücresel yanıt olarak sentezlenmektedir (Hightower ve Ryan, 1997).

Isı şok proteinlerinin küçük moleküler ağırlığa sahip alt ailesine ait olan HSP27 hem sitoplazma hem de nükleusta yer alır. Bu protein, termotoleransın yanı sıra epitel hücrelerinin diferansiyasyonunun düzenlenmesinde, yara iyileşmesi sırasında keratinositlerin migrasyonunda, apoptozun engellenmesinde ve hücrelerin enflamatuvar mediyatörlerin sitotoksitesinden korunmasında rol oynamaktadır. Ayrıca limitli de olsa ısı denatürasyonu karşısında enzimleri koruma yeteneğine sahiptir. HSP27, kaspaz aktivasyonunu engelleyerek, sinyal iletimyolağında düzenleme yaparak veya hücreleri korumada şaperonluk yaparak apoptozu engellemektedir (Garrido C ve ark.,2006).

Literatürde HSP27'nin erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu çalışma sayısı çok azdır. HSP27 normal spermatogenez görülen insan testislerinde hücre tipine spesifik olarak farklı ekspresyon paterni gösterir. HSP27 ekspresyonu Sertoli hücrelerinde ve spermatogonyada yüksek seviyede iken, spermatositlerde orta düzeydedir ve spermatozoada ise hiç yoktur. Bunun aksine, maturasyon arrest görülen infertil erkeklerde HSP27 ekspresyonunun spermatogonya ve spermatositlerde çok düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir (Adly ve ark., 2008).

İnsandaki tüm seminal plazma proteinlerinin bugüne dek en kapsamlı analizinin yapıldığı çalışmada 923 farklı protein tanımlanmıştır (Pilch ve Mann, 2006).

Spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçümü yapılmıştır. HSP27 de seminal plazmada bulunan ısı şoku proteinlerinden birisi olarak tespit edilmiştir (Pilch ve Mann, 2006). Yukarıda da özetlendiği gibi bugüne dek literatürde Hsp27 ve erkek infertilitesi ile ilgili yapılmış çalışmalar daha ziyade azospermik hastalarda testiküler doku ve spermatozoada bulunan Hsp27 üzerinedir. Ekstrasellüler Hsp27'nin seminal plazmaya nasıl taşındığı, seminal plazmada nasıl bir işlev gördüğü, bununla bağlantılı olarak infertil erkeklerde Hsp27 düzeyinin seminal plazmada nasıl değiştiği literatürde henüz araştırılmamıştır.

Bu tez çalışmasının amacı, OAT tanısı konulan infertil erkeklerde seminal plazmada HSP27 protein düzeyini ve diğer semen parametreleriyle olan ilişkisini belirlemektir. Bu çalışma ile **literatürde ilk kez** OAT sendromlu infertil erkeklerin seminal plazma HSP27 protein seviyelerinin ve bunun sperm konsantrasyonu, morfolojisi, motilitesi, vitalitesi gibi diğer semen parametreleriyle olan ilişkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek İnfertilitesi

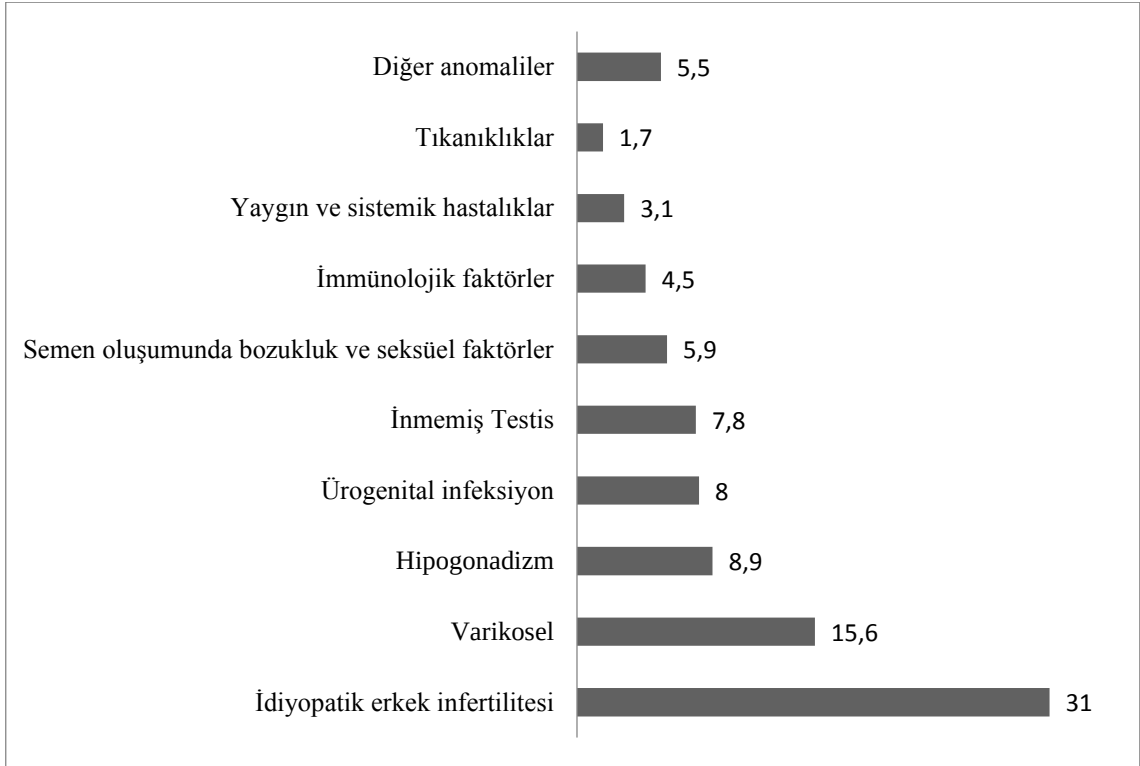
Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın tanımına göre ise infertilite (kısırlık), 1 yıl veya daha uzun süreyle düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrasında gebelik elde edememe durumu olarak tanımlanmıştır (Zegers-Hochschild ve ark., 2009).

Eşlerden herhangi birinin, üreme sisteminde herhangi bir sebeble bozulma ortaya çıkması fertilitiyi olumsuz yönde etkiler ve infertiliteyle sonuçlanır (Ferlin A ve Foresta C, 2014). Erkek infertilitesi günümüzde gelişmiş toplumlar başta olmak üzere tüm dünyada giderek artangüncel ve kompleks bir üreme sağlığı sorunudur (Agarwal ve ark., 2015).

2.1.1 Epidemiyoloji ve etyoloji

Çiftlerin yaklaşık %25'i 12 ay içerisinde gebelik elde edememektedirler, bunların da %15'i infertilite sebebiyle tedavi arayışında olup, %5'i istemelerine rağmen çocuksuz kalabilmektedir. İnfertilite hem erkeği hem de kadını etkileyen fizyolojik ve psikolojik bir durumdur (Poongotha J ve ark., 2009). İstemelerine rağmen çocuk sahibi olamayan infertil çiftlerin %50'sinde erkeğe ait nedenler saptanır. İnfertilite, her iki eşin de subfertil ya da fertilitelerinin azalmış olması durumlarında belirgin duruma gelir (Carrell D T ve Hammoud S S, 2010).

Erkek faktörü tüm infertilite vakalarının %50'sini oluşturur. Erkek infertilitesinin bilinen etiyolojileri arasında varikosel, hipogonadizm, ürogenital infeksiyon, inmemiş testis, semen oluşumunda bozukluk ve seksüel faktörler, yaygın ve sistemik hastalıklar, tıkanıklıklar ve diğer anomaliler yer alır. Erkek infertilitesinin sebepleri arasında artmış oksidatif stres (OS) de yer almaktadır (Kamel 2010). Erkek infertilitesi çevresel kirlilik, reaktif oksijen türevleri, genetik anormallikler veya endokrin bozuklukları da içeren birden fazla faktörle açıklanabilir.



Şekil1. Erkek infertilitesi ile ilişkili faktörlerin dağılımı (Dündar C, 2013'den uyarlanmıştır).

İnfertiliteyi oluşturan faktörlerin oransal büyüklüklerine göre en önemli olanları, idiyopatik erkek infertilitesi %31, varikosel %15,6, hipogonadizm %8,9, ürogenital enfeksiyonu %8'dir (Dündar C, 2013) (Şekil 1).

Erkek fertilitasını etkileyen sebepler (Tablo-1) hastanın değerlendirilmesinde alınacak ayrıntılı anamnez, fiziki muayene ve sonrasında laboratuvar testleri ve radyolojik tetkikler ile değerlendirilebilir.

Tablo1.Erkek infertilitesinde etiyoloji (Kim HH ve ark., 2010).

SPERM ÜRETİMİNDE ANORMALLİK
Primer testiküler yetmezlik (hipergonadotropik hipogonadizm)
Genetik anomalliler (Klinefelter sendromu, Y kromozom mikrolelesyonları vb)
Sekonder testiküler yetmezlik
Hipogonadotropik hipogonadizm
Kriptorşidizm
Atrofi (orşit)
Eksojen androjen kullanımı
Varikosel
SPERM FONKSİYON ANORMALLİKLERİ
Anti-sperm antikorlar
Enfeksiyon
Varikosel
Sperm DNA fragmantasyonu
Sperm-servikal mukus etkileşimi
Zona pellusidaya bağlanma/ sperm penetrasyonu
Akrozom reaksiyonu
Biyokimyasal (reaktif oksijen türevleri)
DUKTAL SİSTEM OBSTRÜKSİYONU
Vazektomi
Konjenital vas deferens yokluğu
Epididimal obstrüksiyon (konjenital ya da kazanılmış)
Ejakulatuar kanal obstrüksiyonu (konjenital ya da kazanılmış)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) parametrelerine göre semen analizi terminolojileri ve nedenleri aşağıdaki gibi tanımlanmıştır:

Aspermi: Ejakulat yokluğu durumudur. Aspermi sebepleri arasında retrograd ejakülasyon, vasküler nedenler, hormonal nedenler ve ereksiyon bozuklukları bulunmaktadır.

Azospermi: Ejakulatta sperm yokluğu durumudur. Azosperminin sebepleri arasında genetik bozukluklar, hormonal değişiklikler, germinal aplazi, bilateral vas deferens yokluğu ve ejakulatör kanallarda tıkanıklıklar sayılabilir.

Hipospermi: Ejakulatin volümünün 1,5 ml'den az olması durumudur. Hipospermi sebepleri arasında prostat, seminal vezikül ve vas deferensin enfeksiyonu, travma ve

tümörlerinin yanı sıra; androjen eksikliği, ejakülatör kanalların tıkanıklıkları ve retrograd ejakülasyon da sayılabilir.

Oligozoospermi: Sperm sayısının 15 milyon/ml' nin altında olması durumudur.

Hafif Oligozoospermi: Sperm sayısının 5- 15 milyon/ml' nin arasında olması durumudur.

Şiddetli Oligozoospermi: Sperm sayısının 5 milyon/ml' nin altında olması durumudur. Oligozoospermi idiyopatik olabilir veya sistemik enfeksiyonlar, kromozomal bozukluklar, inmemiş testis, ilaçlar, kronik sistemik hastalıkları da sebepleri arasında sayılabilir.

Astenozoospermi: İleri hareketli spermatozoa'nın < %40 olması ya da ileri hızlı hareketli olanların < %32 olması durumudur. Birden fazla konjenital sebeple veya enfeksiyon, ilaç, ısı nedeniyle de oluşabilir.

Teratozoospermi: Normal spermatozoa morfolojisinin < %4 olması durumuna denir. Teratozoospermiye neden olanlar arasında kromozomal bozukluklar, toksik maddeler, seminal kanallarda deformasyon ve epididim enfeksiyonu bulunmaktadır.

Astenoteratozoospermi: Spermilerin motilite ve morfolojik olarak normal sınırların altında kalması durumudur.

Oligoastenoteratozoospermi: Spermilerin sayı, motilite ve morfolojik olarak normal sınırların altında olmasıdır.

Nekrozoospermi: Ejekulatta %25' ten fazla ölü sperm hücresi bulunması durumudur. İdiyopatik olabilir veya toksik maddelerle temas, Kartagener Sendromu ve cinsel ilişki sıklığında azalma da sebepleri arasında sayılabilir.

2.1.2.Oligoasthenoteratozoospermi (OAT) Sendromu

Erkek fertilitesinde azalma; ürogenital bozukluklardan, genital sistem enfeksiyonlarından skrotal ısı artımından, endokrin bozukluklardan, genetik hastalıklardan ve immünolojik faktörlerden kaynaklanabilir (Safarinejad M R, 2011). İnfertilite tanısı konulmuş hastaların %31'inde sorumlu bir faktör bulunmaz ve idiyopatik erkek infertilitesi olarak tanımlanır. Böyle erkekler fertilitte problemiyle ilgili olabilecek geçmişe ait bir hikaye vermeksizin, normal fizik muayene bulguları ve endokrin laboratuvar sonuçlarıyla başvururlar (Özmen F ve ark., 2009). Semen analizinde elde edilen veriler değerlendirildiğinde, spermatozoa sayısında azalma (oligozoospermi), motilite azalması (astenozoospermi) ve morfolojik incelemede çok sayıda anormal form (teratozoospermi) görülür. Genellikle bu bozukluklar bir arada olur ve OAT sendromu şeklinde tanımlanır (Poongotha J ve ark., 2009).

İnfertil erkeklerin sperm analizleri, azoospermi, oligozoospermi, teratozoospermi, astenozoospermi, nekrospermi ve pyospermi gibi birçok anormal durumda ortaya çıkabilmektedir. İnfertilite kliniğinden yardım isteyen erkeklerin yaklaşık %30'nda oligozoospermi veya etiyolojisi bilinmeyen azoosperminin olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle erkek infertilite nedenlerini belirlemek hastalığın tedavisi açısından önemli bir gerekliliktir (Carrell D T ve Hammoud S S, 2010; Safarinejad M R ve ark., 2011).

2.1.3.Erkek İnfertilitesinde Genetik Nedenler

Genetik nedenler, oligozoospermi ve azoospermi olan erkeklerde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri olarak ifade edilmiştir. Erkek infertilitesi genetik hastalıkların %15-30'unu oluşturmaktadır (Krausz ve ark., 2015).

Kromozom Bozuklukları

Kromozom bozuklukları infertil erkeklerin yaklaşık %6'sında görülür. Azoospermik erkeklerde prevalans %15'e kadar çıkabilmektedir (Song ve ark., 2016).

İnsanlarda erkek infertilitesi genellikle kromozom anomalileri ile alakalıdır. Klinefelter sendromu (XXY) ve özgül translokasyonlar erkek infertilitesi nedenleri arasındadır (Irvine DS,2001). Androjen reseptörü nokta mutasyonları ve CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regülatör) geni mutasyonları sıklıkla konjenital vaz deferens anomalileri ve spermatogenik bozukluklar ile ilişkili olan iki önemli gen defektidir (Dohle G R ve ark.,1999). Erkek infertilitesinde en çokkarşılaşılan durumlar ise sperm kromozomu anomalisi, mayoz mutasyonları veya testiküler mikroçevreden kaynaklanan bir diploididir (Poongotha J ve ark. , 2009).

Y Kromozomu Mikrodelesyonları

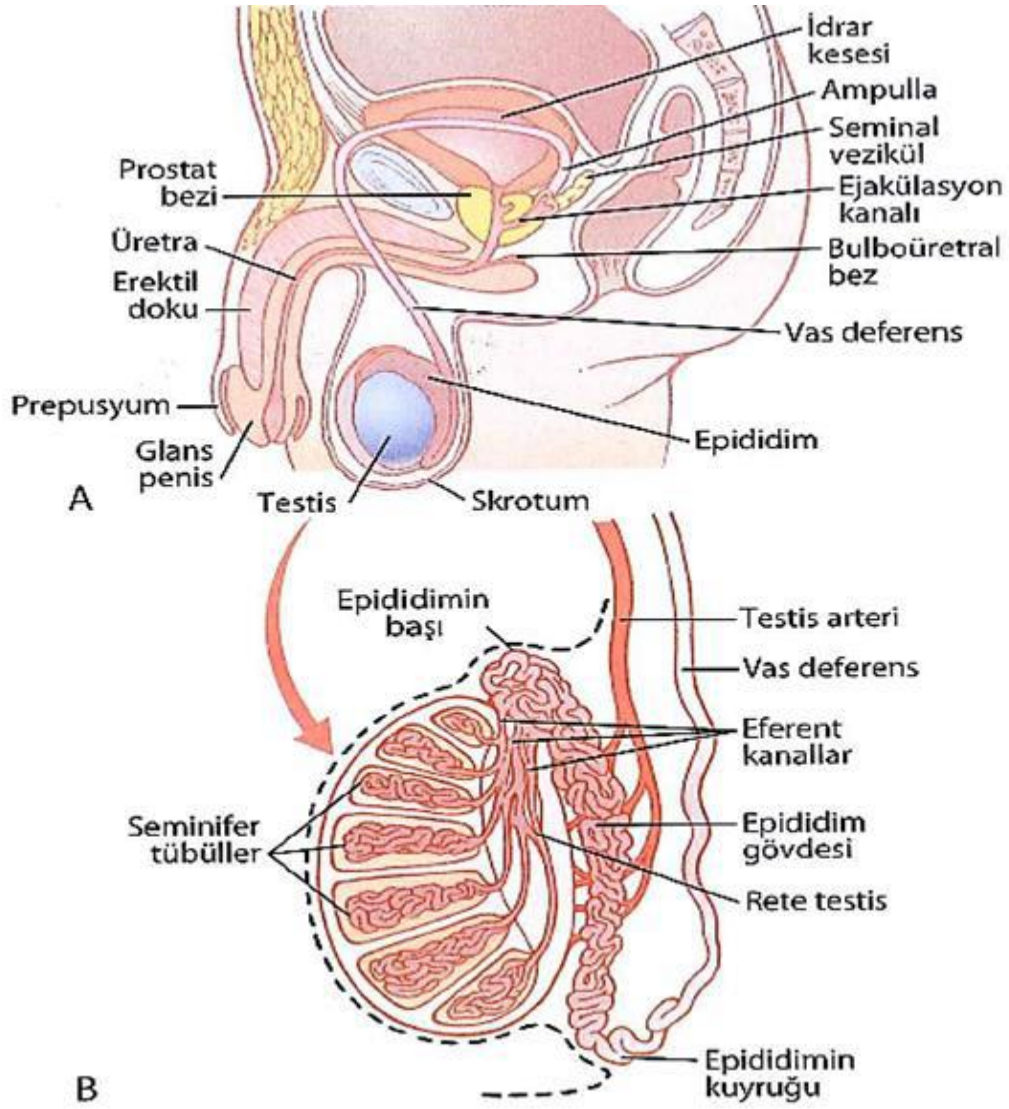
Erkek infertilitesi ile alakalı en önemli patogenetik kusurlarından biri Y kromozomu (Yq) uzun kolunun mikrodelesyonlarıdır. Ykromozomu kökenli infertilitesi olan erkeklerde hiçbir belirti yoktur, ancak fiziksel muayenede küçük testisler ve/veya kriptorşidizm ve varikosel gözlelenebilmektedir (Esteves S C ve Agarwal A, 2011).Ejakulattaki sperm sayısına göre genetik problemlerin sıklığı Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2.Ejakulattaki sperm sayısına göre genetik problemlerin sıklığı (Sanlı M, 2014)

Tanı	Kromozom Abnormalite Riski	Y kromozom Mikrodelesyon Riski
Oligospermi (5 milyon/ ml)	%2-7	%6-8
Non-obstruktif Azoospermi	%15	%13

2.1.4. Erkek Üreme Sistemi

Erkek genital sistemi, skrotum içinde asılı bulunan iki adet testis, penis, epididimis, genital kanallar ve yardımcı üreme gonadlardan oluşmaktadır (Aşçı ve ark 2013) (Şekil 2).



Şekil 2. Erkek genital sistemi, testis ve epididim ayrıntılı yapısı (Hall 2015)

Erkek Üreme Sistemi Anatomisi

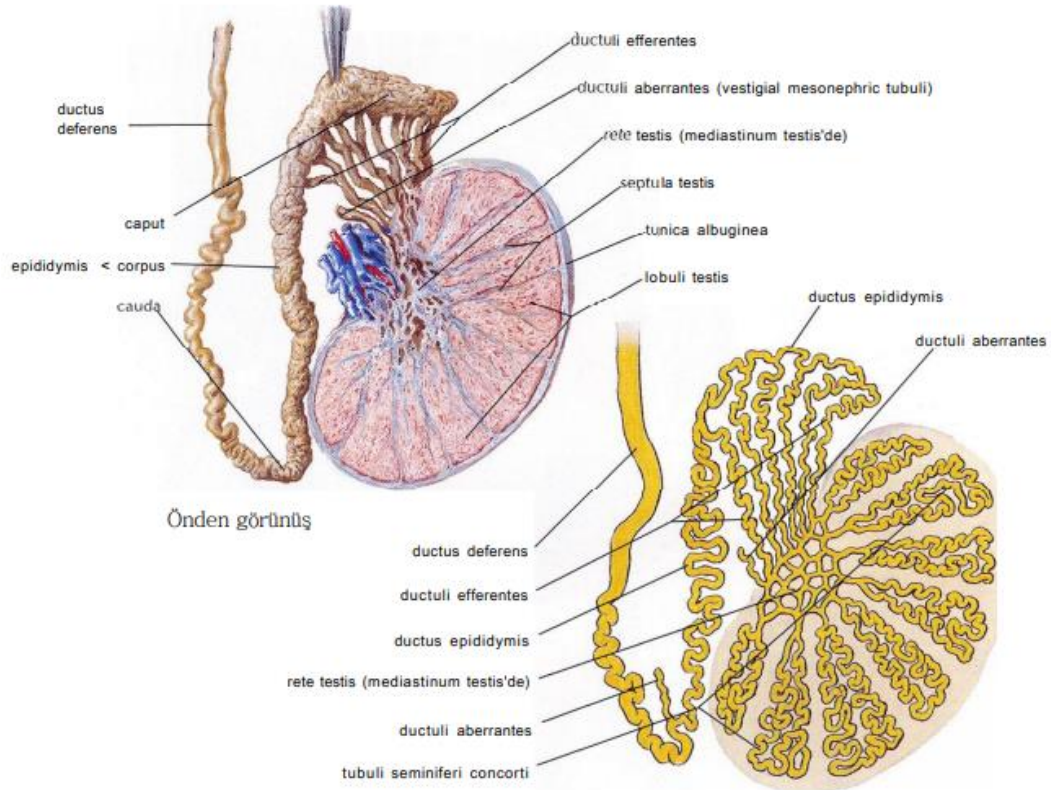
Erkek üreme sistemi organları dış ve iç genital organlar olarak ikiye ayrılır. Dış genital organlar penis ve skrotumdan oluşurken, iç genital organlar testis, epididim, spermatik kord, duktus deferens (vaz deferens), seminal keseler, ejakulator kanallar, prostat ve bulboüretal (Cowper) bezler ve ejakülattan oluşur (Kırıcı Y ve Yıldız S, 2013).

İç Genital Organlar

Testis, spermatozoa üretimi ve androjen (testosteron) salınımından sorumludur. Testislerin şekli ovaldir, erişkin testisi 4,5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığındadır (Gardner ve James 2001). Spermatogenez esnasında sıcaklığın 37°C'nin

altında olması gerekir. Skrotumda yaklaşık 34°C'lik bir testiküler sıcaklık korunur. Her testis, testiküler arter yoluyla beslenir. 3°C'lik düşüş farkı zıt yönlü akım sıcaklık değişim mekanizması ile sağlanır. Bu mekanizma ise; testiküler arter ve testisten abdominal venlere kanı taşıyan pampiniform venöz pleksus ile sağlanır (Ross ve Pawlina 2014).

Testisler skrotuma hareket ederken bir miktar da peritonu birlikte taşırlar. Bu yapı tunika vaginalis'i oluşturur. Tunika vaginalis, testisin skrotum içerisinde hareketli kalmasını sağlar. Testisin en dış tabakasında bağ dokusundan oluşan tunika albuginea bulunmaktadır. Tunika albuginea'nın alt tarafında zengin damarlardan oluşmuş tunika vasküloza bulunmaktadır. Tunika albuginea'nın iç bölümü kalınlaşarak septaları oluşturur. Septaların bölümleri piramit şeklinde ve yaklaşık 250 tanedir. Bu bölümler testiküler lobüller olarak adlandırılır (Gardner ve James 2001). Testiküler lobüllerin içinde 1-4 adet seminifer tübüller vardır. Seminifer tübüllerin bağ dokusunda Leydig hücreleri bulunmaktadır. Bu durumda seminifer tübüllerin fonksiyonu; hem testosteron üretmek hem de spermatozoaları üretmektir (Junqueira ve ark 2009)(Şekil 3).



Şekil 3. Testis Yapısı ve Seminifer Tübüller (Netter F.H., 2015)

Seminifer Tübül

Seminifer tübüller; Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatitler) den oluşmuştur (Aşçı ve ark 2013). Seminifer tübüller yaklaşık olarak 30 cm uzunluğunda ve 900 tanedir (Hall 2015). Seminifer tübüllerde; myoid hücreler, fibroblastlar ve kollajen lifler bulunur. Myoid hücrelerin fonksiyonu olgunlaşmamış, hareketsiz spermleri testise ulaştırmaktır (Aşçı ve ark 2013) (Şekil 3).

Sertoli (Destek) Hücreleri

Sertoli hücreleri; spermatogonik hücreleri destekleme, besleme ve korumada görevlidir. Spermiyogenezin sonunda oluşan atıkları fagosite etmede, olgun spermiyogenez sürecinde spermatidlerin seminifer lümenine hareketini sağlamakta, seminifer tübül lümenine protein ve iyon açısından zengin sıvı salgılamakta rol alır (Aşçı ve ark 2013). Sertoli hücreleri, ön hipofiz bezinden salgılanan FSH (Folikül Uyarıcı Hormon)'a cevap verirler. FSH, testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesine sahip androjen bağlayıcı protein (ABP)'i düzenlemekte görevlidir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda Sertoli hücrelerinin hücre zarında bulunan ER- α ve ER- β sayesinde 17- β estradiol bağlanmaktadır. Böylelikle testiküler gelişim, hemostazis ve proliferasyon mekanizmaları düzenlenmektedir (Lucas ve ark.,2011).

Leydig hücreleri

İntertübüler alanda bulunan kan damarları ve lenfatik sinüzoidlerle yakın ilişkide olan Leydig hücreleri testosteronu sentezleyerek kan ve lenf kapillerlerine boşaltıp endokrin sekresyon yaparlar. Leydig hücreleri diğer tüm steroid üreten hormonlar benzeri bolca lipid damlacıkları, düz endoplazmik retikulum ve tübüler kristal mitokondriyonlara sahiptir (Kierszenbaum A. L, 2006). Embriyoda testosteron ve diğer androjenler erkek fetüsün gonadlarının gelişimi için önemlidir. Pubertede ise spermiyum üretiminin ve aksesuar bezlerin salgılanmasının başlaması ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi için gereklidir (Gartner L.P.,2016).

Duktus Deferentes

Ductus, epididimin kuyruk kısmında kalınlaşarak ductus deferens olarak tanımlanır. Spermlerin büyük bir kısmı ductus deferenste depo edilir. Epididim ductus deferenste yaklaşık olarak bir ay gibi bir süreyle fertil kalabilir. Eğer bu süre içerisinde ejakülasyonla atılmazsa, dejenere olur ve vücut tarafından absorbe edilir(Ozan H, 2005).

Duktili eferentes

Epididimise 20 adet kıvrımlı duktali eferentes adı verilen kanallarla açılır. Bu kanallar yalancı çok katlı prizmatik epitel, prizmatik veya kübik hücrelerden oluşmaktadır. Hücre boylarının eşit olmaması nedeniyle epitel yüzeyi girintili çıkıntılı olarak görülür. Spermin bu kanallar boyunca ilerlemesi silyumların hareketi ve kas tabakası sayesinde gerçekleşir (Gartner LP ve ark.,2016).

Epididimis

Duktali eferentes ve duktus epididimisten oluşmuş bir organdır. Duktus epididimis yaklaşık 4-6 metre uzunluğunda, tek ve oldukça kıvrımlı bir tüpsü yapıdadır. Bu uzun yapı, çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile birlikte epididimisin kuyruk ve gövdesini oluşturur (Junqueira L Cve ark.,1998). Epididimis testisin arka üst yüzü boyunca uzanmaktadır; baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşur. Duktali eferentes epididimisin baş kısmında bulunur.

Prostat bezi

Prostat bezi, pelviste mesanenin altında yer alır ve üretranın ilk parçasını sarar. Prostat, düz kas yapıdadır, fibroelastik bağ dokusundan bir kapsül ile sarılmıştır. Prostat bezi ürünlerini uzun boşaltım kanalları aracılığıyla prostatik üretraya doğru salgılar (Gartner LP, 2016). Prostat bezi, dikey, transvers ve ön-arka çapların ölçüleri sırasıyla 25-30, 40 ve 25 mm'dir. Ön ve arka yüzeyler, aşağı ve dışarı bakan iki yanal yüzey, bir taban ve bir tepeden oluşur (Williams ve ark., 1995; Rouvière ve Delma, 2002; Kierszenbaum, 2007; Ross ve Pawlina, 2007).

Seminal vezikül

Mesanenin arkasında yer alan ve kıvrımlı yapısıyla yaklaşık uzunlukları 15 cm olabilen bir çift tübüler bezdir. Kanalları duktus deferensin ampullasıyla birleşip duktus ejakulatoryusu oluşturur. Seminal vezikülden salgılanan sıvı spermiyumları aktive eden früktoz, sitrat ve prostoglandinlerden zengindir (Kierszenbaum A. L, 2006). Seminal veziküller androjene bağımlıdır.

Bulboüretal bezler(Couper bezleri)

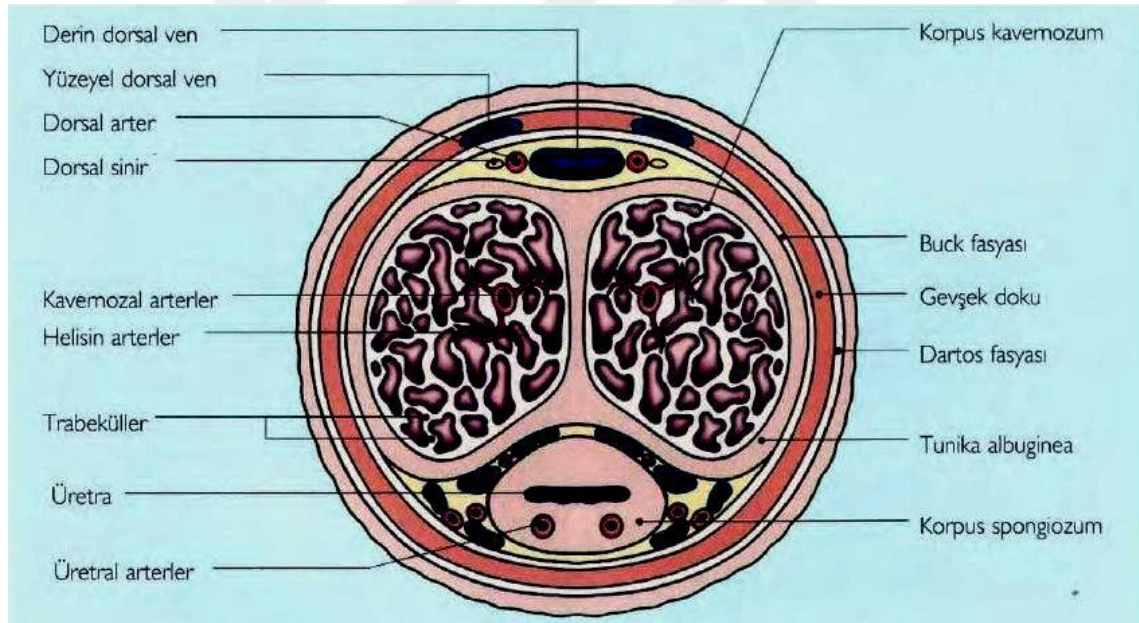
Bulboüretal bezler, Couper bezleri olarak da adlandırılan mercimek boyutunda prostatın altında üretra boyunca yer alan iki adet küçük tübüloalveoler bezdir. Üretrada tamamlamak için her bezden 4 cm uzunluğundaki kanalları, penil üretra ile birleşir. Bezler, cinsel uyarılma sırasında yağlayıcı olarak işlev gören, üretrada kalmış olabilecek

asidik idrar kalıntısını nötralleştirme işlevi gören saydam bir salgı üretirler. Bu salgı galaktoz, galaktozamin ve siyalik asitçe zengindir (Kierszenbaum A L,2006).

Dış Genital Organlar

Penis

Penis, idrarın ve semenin vücudun dışına atılmasını sağlayan organdır. Mesaneden başlayan ve penis içerisinde ilerleyen üretra, idrarı ve semeni dışarıya taşır (Eşrefoğlu M, 2016). Penis; serbest şekilde skrotum üzerinde bulunan korpus penis ve perinide yer alan dıştan izlenmeyen radiks penis olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Penisglans penis, üçte iki distal üretra, bir çift korpus kavernozum, korpus spongiozum, iskiokavernoz ve bulbospongioz kasları içermektedir (Mundy AR HJC, 2005). Penis tabakaları dıştan içe doğru; deri, süperfisiyal tabaka (dartos tabakası),buck fasyası, tunika albuginea, korpus kavernozum ve korpus spongiozumdan olacak şekilde sınıflandırılmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. Penisin enine kesiti (Kadıoğlu A ve ark., 2006)

Skrotum; içerisindeki iki testis, sperm kanallarının bir kısmı ve çok sayıda damar yapısı içeren bir yapıdır. Büyüklüğü ve şekli yaşa göre değişiklik gösterir. Yeni doğan 6 döneminde sert ve pubise yakın konumdadır. Erişkinde ise daha yumuşak ve büyük; yaşlılarda gevşek ve sarkık bir hal alır (Snell 1998).

Skrotum derisi çok incedir ve melanin pigmenti fazlalığı sebebiyle kahverengidir. Üzerinde az sayıda kıl folikülü ve ter bezleri vardır. Yağ dokusu muhtevası düşüktür. Bu özelliği ısı regülasyonunda önemli bir işlev kazandırır (Sancak ve Cumhuriyet, 1999). Skrotumda düz kas (m.dartos) lifleri bulunur. Elastik liflerden zengin, yağ dokusundan yoksun olan bir tabakadır. Scrotum ısı normal vücut iç ısından 3-4° düşüktür (33,9°). Bu farklılık eşey hücrelerinin gelişmesi için uygun ortama sahip olma gereksiniminden kaynaklanır. Dış ortam sıcak ise m. dartos'un etkisiyle deri gevşer ve alanı genişletmek amacıyla düzleşir. Tersine dış ortam soğuk ise m. dartos kasılarak deriyi büzer (Snell 1998; Sancak ve Cumhuriyet, 1999).

2.1.5 Erkek Genital Sisteminin Embriyolojik Gelişimi

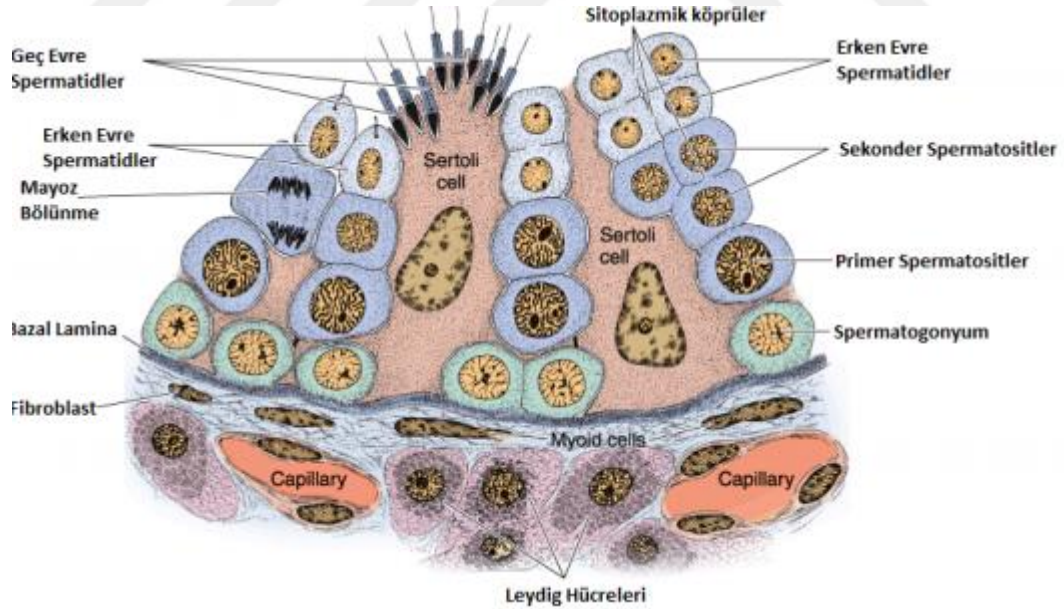
Sertoli hücreleri, Mülleryan İnhibe Edici Faktör ve Androjen Bağlayıcı Proteini (ABP) salgılayarak Leydig hücrelerine dönüşecek olan mezenkim hücrelerinin testise geçişini sağlar ve erkek germ hücrelerinin mayoz döngüsüne girmesini inhibe eder. Leydig hücreleri de testosteron üretimini sağlar. Testosteron, testis ve genital dokularda bol miktarda bulunan 5 α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülerek, erkek üretrası, prostat, penis ve skrotum gelişimini ve testislerin skrotuma inişini sağlar (Carlson, 2009).

2.1.6 Sperm Oluşumu ve Fizyolojisi

Spermatogenez

Spermatogenez, seminifer tübüllerinde gerçekleşir (Gardner ve James 2001) ve spermatogonyal kök hücre (SKH) havuzundaki germ hücrelerinin farklılaşp sperm oluşturması sürecidir (Aşçı ve ark 2013). Spermatogenez sürecinde germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozomlu diploid halden 23 kromozomlu haploid hale geçerler ve 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresi ile birleşerek 46 kromozomlu yeni bir zigot oluştururlar. Her aşamada hücreler spermatogonya, spermatosit, spermatid gibi farklı isimler alırlar. (Liu M ve ark., 2004).

Seminifer tübül içinde spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncülü hücreler bulunur. Farklılaşma evresini tamamlayan hücreler seminifer tübül içerisine bırakılır. Testisin farklı kesimlerindeki farklı alanlarında gelişimin değişik evrelerindeki sperm üretimi devam eder ve farklılaşan hücreler gözlemlenebilir (Sharpe RM ve ark., 1994) İnsan vücudundaki en karmaşık hücresel farklılaşma olaylardan birisi olan spermatogenez, yaklaşık olarak 64 gün sürer. Olgun spermatozoanın ejakülatta görülmesi 74 gün alır (Aras D., 2009)(Şekil 5).



Şekil 5. Spermatogoniumdan olgun sperm oluşumu süreci (Ross MH ve Poulina W, 2014)

Spermatogenez 3 evrede oluşur;

Birinci evre (Spermatogonyal): Spermatogonyal kök hücrelerinin mitoz bölünme geçirdiği safhadır. Bu safha embriyonik dönemde gerçekleşir.

İkinci evre (Spermatosit): Germ hücrelerinin (spermatosit) mayotik evre sonunda haploid kromozomlu spermagametleri oluşturduğu evredir.

Üçüncü evresi ise (Spermatid): Spermatidlerin morfolojik olarak değişikliğe uğraması sonucunda matür ve fonksiyonel spermatozoa haline gelmesidir (Strauss ve Barbieri 2013).

Spermatogonial faz

Spermatogoniumlar, bazal kompartmanda bazal lamina ile ilişkisi olan diploid spermatogenik hücrelerdir(Gartner LP. ve ark.,1997). Spermatogoniumlar mitotik hücre bölünmeleri geçirirler. Sertoli hücreleri ile arasındaki sıkı bağlantıların altında yer alırlar ve bu sebeple kan-testis bariyerinin dışında kalırlar (Ross ve ark. 2003). Morfolojik olarak 3 tip spermatogonial hücre tanımlanmıştır:

Koyu Tip A Spermatogoniumlar: 12 µm çapındadır, ovoid çekirdekli yuvarlak şekillidir ve heterokromatinden zengin hücrelerdir. Seminifer tübüllerdeki kök hücre rezervini oluştururlar. Mitozla bölünerek diğer Koyu tip A spermatogoniumlar ve Açık tip A spermatogoniumları oluştururlar(Ross ve ark. 2003).

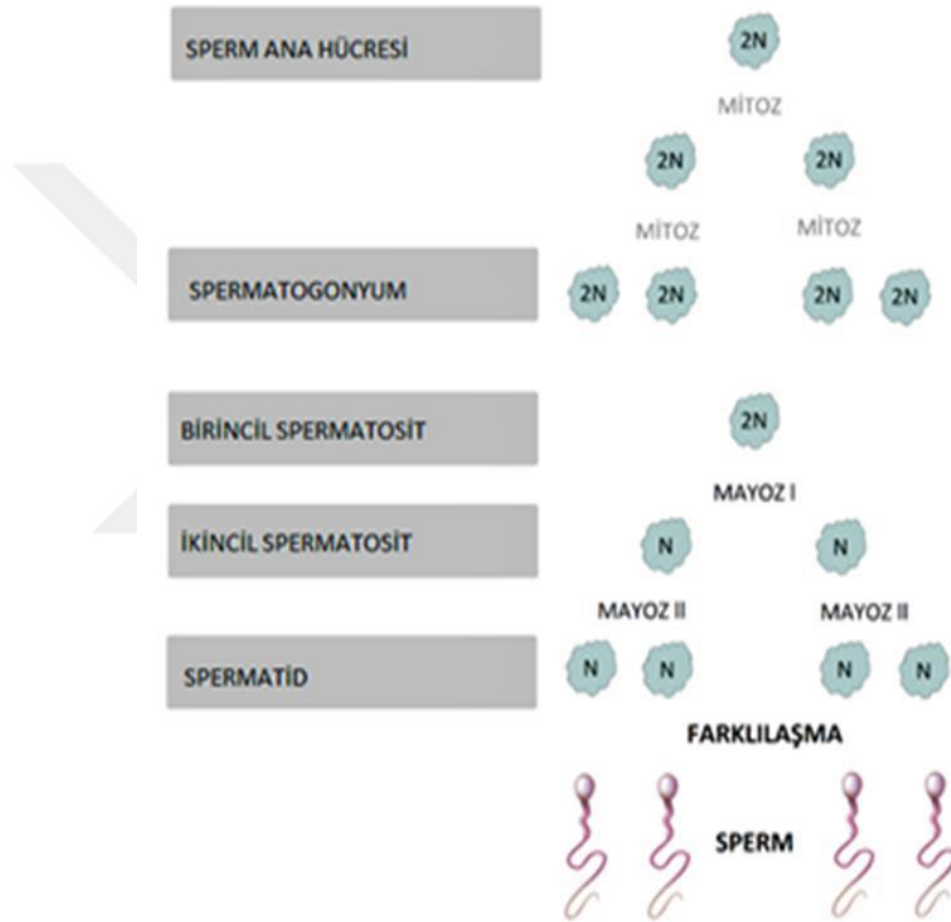
Açık Tip A (Aa) Spermatogoniumlar: Açık renk boyanan çekirdekleri oval şekillidir ve ince granüler kromatine sahiptir. Granüllü endoplazmik retikulum(GER), mitokondri ve az sayıda Golgi aygıtı içerir (Gartner LP. ve ark.,1997). Aa spermatogoniumlar, proliferasyon esnasında testosteronla uyarılır. Mitoz bölünme geçirerek sayılarını arttırıp tip A ve tip B spermatogoniumları oluştururlar (Gartner LP. ve ark., 1997).

Tip B Spermatogoniumlar: En fazla bulunan spermatogonium tipidir. Bazal lamina üzerinde olmalarına rağmen bazal lamina ile bağlantıları daha azdır. Sentrik çekirdekleri yuvarlak şekildedir(Ross ve ark. 2003). Çekirdekte bir veya iki adet koyu boyanan çekirdekçik vardır. Mitoz geçirerek primer spermatositleri oluştururlar, çapları yaklaşık olarak 18 mikronolan primer spermatositlere dönüşürler(Ross ve ark. 2003).

Spermatosit faz (Mayoz)

Mayoz bölünmenin I. aşamasında profaz evresinde primer spermatositler 4d DNA, 46 (44+XY/XX) taşıyan kromozomlara sahiptirler. İnsanda spermatogenezin en uzun safhası profaz evresidir. Yaklaşık olarak 22 gün sürer. Profaz I evresinde crossing over

gerçekleşir, bunu takiben metafaz, anafaz, telofaz ve son olarak da sitokinez gerçekleşir. İlk mayoz bölünmenin tamamlanmasının ardından kromozom sayısı ($2N$ 'den $1N$ 'ye) ve DNA miktarı ($4d$ 'den $2d$ 'ye) düşer. Mayoz I sonucunda sekonder spermatositler meydana gelir. Böylece hücre başına ($22+X$ veya $22+Y$, $2d$ DNA miktarı) düşer. İkinci mayozda replikasyon olmadığından dolayı oluşan hücreye spermatid adı verilir ve her bir spermatid $1N$ kromozom sayısı ve $1d$ DNA miktarına sahiptir. Spermatidler seminifer lümene yakın, küçük ebatlı hücrelerdir (Strauss ve Barbieri 2013, Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 6).

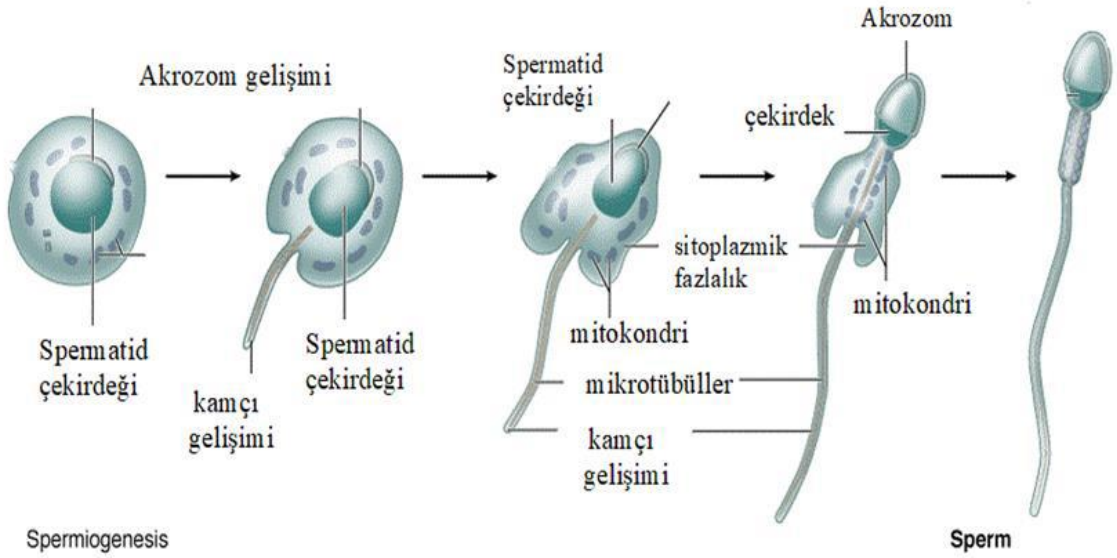


Şekil 6. Spermatogenez aşamaları (Gök 2017'den uyarlanmıştır).

Spermiyogenez

Spermatidler, son safhada farklılaşma sürecine girerler ve bu sürece de spermiyogenez denir. Bu süreç dört evreye ayrılır (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 7). İlk evreye Golgi evresi adı verilir. Sitoplazmada belirgin Golgi, mitokondri, bir çift sentriol, birçok serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum bulunur. Bu evre spermatid çekirdeğinin yanında Golgi kompleksinde kümelenen PAS (periyodik asit– Schiff) granüllerin bulunması ile spesifiktir. Bu granüller birleşerek akrozom veziküllerini oluştururlar. Akrozomal vezikülün pozisyonu, spermin ön kutbunu açığa çıkarır. Bu evrede sentriyoller akrozoma zıt ekseninde, spermin arka kutbuna taşınırlar. Sentrioller, dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübüllerinin birleşmesi sonucunda sperm kuyruğunun aksonemini meydana getirir (Strauss ve Barbieri 2013, Ross ve Pawlina 2014).

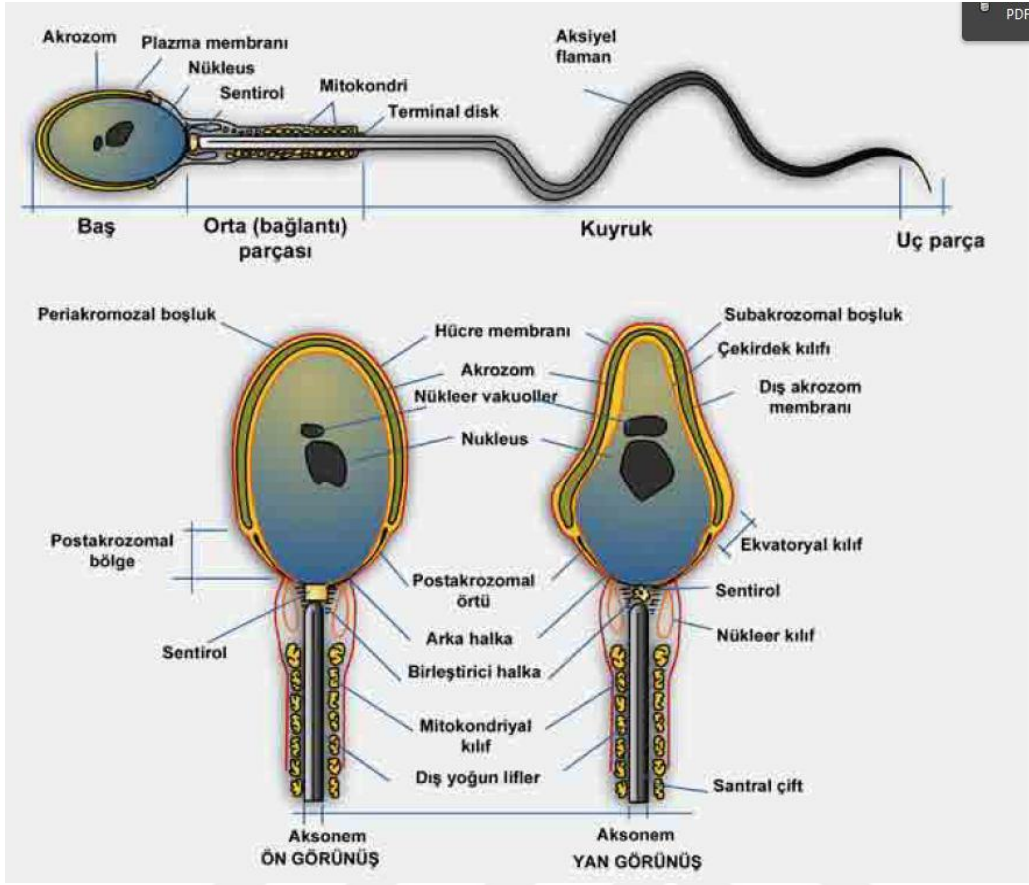
İkinci safha Kep evresidir. Akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısının üzerine yayılır ve nüklear içerik yoğunlaşır (Ross ve Pawlina 2014). Üçüncü evre ise Akrozom evresidir. Bu evrede akrozom vezikülleri iyice genişler. Akrozom veziküllerinin içinde hidrolitik enzimler (hyaluronidaz, noraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteazlar) ihtiva ederler. Akrozom enzimlerinin işlevi, ovumun kumulus kompleksini ve zona pellusidasını geçmektir. Spermin akrozomunda bulunan bir serin proteinaz olan ve zona pellusidanın tanınması ve bağlanması ile alakalı olduğu düşünülen akrozin proteini bulunmaktadır. Bu protein *Acr* geni ile kodlanmaktadır. *Acr* geni çıkarılmış (knockout) fare modellerinin de fertil olduğu tespit edilmiştir. Ancak akrozin proteini içermeyen farelerin spermatozoasında fertilizasyon süreci gecikmektedir. Mitokondriyonlar orta bölümde kaba fibrillerin etrafını heliks halde sarmalar (Strauss ve Barbieri 2013, Ross ve Pawlina 2014). Son safha maturasyon (olgunlaşma) evresidir. Flagellumun etrafındaki fazla sitoplazma azalır, matür spermatozoon meydana gelir. Rezidüel cisimcik olan fazla sitoplazma Sertoli hücreleri vasıtasıyla fagosit edilir. (Ross ve Pawlina 2014). Spermatidler spermiyasyon safhasında seminifer tübül lümenine salıverilirler. Bu safhada Sertoli-spermatid bağlantı kompleksleri ortadan kalkar ve spermatidler Sertoli hücrelerinden bağımsız hale geçer. Sertoli-Spermatid bağlantı komplekslerinde $\beta 1$ integrin reseptörü vardır. Spermatidler Sertoli hücrelerinden ayrılırken, integrin bağlı kinazlar aktif hale geçer. Testisteki spermiyasyon hızı ejakülattaki sperm hücrelerinin sayısını belirler (Ross ve Pawlina 2014).



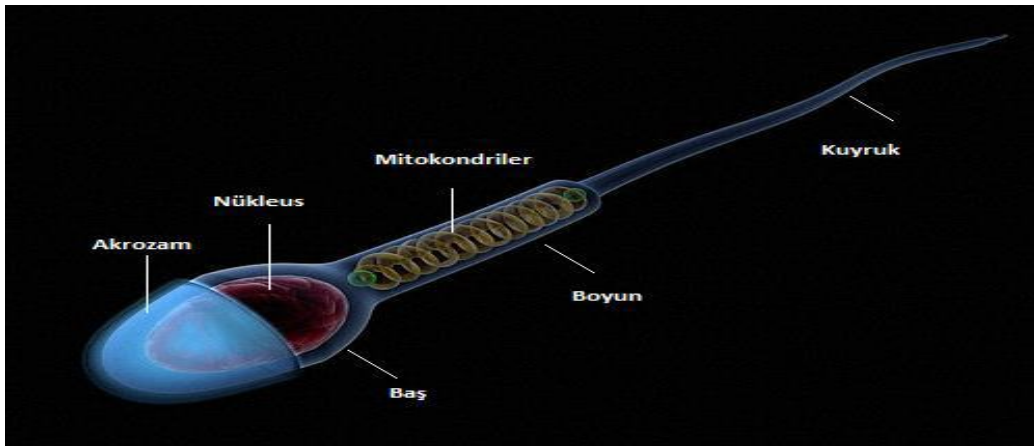
Şekil 7. Spermiyogenez (Kahn ve Brannigan 2017).

Olgun Sperm Yapısı ve Fizyolojisi

Bir sperm hücresinin hacmi bir ovumdan yaklaşık olarak 85.000 kat daha azdır. Erkeklerde her gün yaklaşık olarak 100-300 milyon sperm üretilirken, kadınlarda ise ayda en çok iki yumurta üretimi görülmektedir. Bir sperm hücresinin uzunluğu yaklaşık olarak 60 μm 'dir. Baş kısmının boyu 3-5 μm , eni 2-3 μm 'dir (Rogers 2010). Her spermatozoon bağlayıcı parça ile birleşmiş baş ve kuyruk kısmından oluşmaktadır (Strauss ve Barbieri 2013) (Şekil 8 ve9).



Şekil 8. Spermin Yapısı (Akbal C, 2012)



Şekil 9. Sperm Mikroskopik Anatomisi

(Reproductive Technologies, Inc. Sperm BankOf California, 2014, Cynthia).

Kuyruk orta, esas ve son bölüm olmak üzere üç bölümden oluşur. Baş kısmı çekirdek ve çekirdeği çevreleyen akrozomdan oluşmuştur. Baş ile kuyruğu bağlayan bağlayıcı bölümün içinde bir çift sentriol bulunur. Distal sentriolden aksonem meydana gelir. Kuyruğun orta parçasında bir mitokondri, 9+2 mikrotübül yapısında aksonem bulunur. Kuyruğun en uzun bölümü esas olup, A Kinaz proteinler ile keratinleri bulundurlar. Esas parça fibröz kılıfla sarılıdır. Fibröz kılıfta ATP'yi hidrolize eden glikolitik enzimler, A Kinaz proteinleri ve motiliteyi sağlayan keratinler vardır (Strauss ve Barbieri 2013).

Seminifer tübüllerinde sperm hareketsiz olup, dölleme yeteneğine sahip değildirler. Düz tübüller Sertoli hücreler ile kaplıdır. Buradan da rete testise girer, boşaltım kanalının ilk parçası olan ductus efferente ve ductus epididimisin baş kısmına geçer (Ross ve Pawlina 2014). Sperm hücreleri karakteristik motilitesini birkaç günde geçtiği epididimiste elde eder (Strauss ve Barbieri 2013). Burada bazı değişiklikler kazanır. Bu değişimler;

- Nükleus yoğunlaşır, spermin baş boyutu azalır.
- Rezidüel cisimcikler atılır,
- Dış akrozomal membranda dekapasitasyon işlemleri meydana gelir.

Sperm hücre motilitesinin başlaması siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) sayesinde oluşmaktadır. Sperm, erkek üreme sisteminde birkaç hafta canlı kalabilirken, dişi üreme sisteminde ise 2-3 gün canlılığını sürdürebilir. Matür spermler, spesifik motilite yeteneğine sahip ve fertildir. Sıvı ortamda dakikada 1-4 mm hızda hareket yeteneğine sahiptir. Sperm aktivitesi, nötral ve hafif alkali bir ortamda artarken, asidik ortamda azalır hatta hızlı ölmelerine sebep olur. Sıcaklık arttıkça sperm aktivitesi, sperm ömrünü önemli ölçüde düşürür (Gök 2017). Dişi üreme kanalında fertilize edebilme yeteneğini sürdürür. Ayrıca burada kapasitasyon adı verilen sperm membranındaki glikokaliks (glikokonjugatlar) yapının uzaklaştırılması gerçekleştirilir (Ross ve Pawlina 2014).

Semenin Genel Özellikleri

İlk kez Anton van Leewenhoek (1632-1723) tarafından yapılan mikroskopta erkek üreme hücresi tespit etmiş ve bu hücreleri ‘animalcules’ ya da ‘spermatick worms’ olarak adlandırmıştır. 1820 yılına kadar bilim insanlarının çoğu spermatozoayı parazit olarak tanımlamışlardır. Spermatozoanın adını ilk kez Baer 1827 yılında kullanmıştır. Sonrasında ise, İsveç bilim insanı Albert von Kolliker (1841) tarafından spermatozoanın parazit olmadığı ve testislerde gelişen hareketli otolog hücreler olduğu belirtilmiştir (Clarke 2006).

Semenin pH değeri yaklaşık olarak 7,5’tir. Semen, seminal vezikülerden gelen salgı (neredeyse %60), vas deferensten gelen salgı, sperm (toplamın yaklaşık %5’i), prostat bezinden gelen salgı(yaklaşık %30) ve mukus bezlerinden gelen sıvılardan (%5) oluşur (Hall 2015).

İnsan semeni analizlerinin standardize edilmesi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ilk kez 1980 yılında el kitabı hazırlamıştır.Bu el kitabı, o zamandan itibaren üç kez güncellenmiş ve birçok dile çevrilmiştir. 2010 yılında yayınladığı kılavuzda, bir yıl korunmasız aktif cinsel hayat sürdüren ve bu sürede çocuk sahibi olan erkeklerin semen parametreleri esas alınarak, bu parametrelerdeki alt referans değerleri gösterilmiştir (Cooper ve ark., 2010) (Tablo 3).

Tablo 3.Semen morfolojisinin WHO Kriterleri'ne (2010) göre değerlendirilmesi

Referans Değerler	WHO (2010)
Semen hacmi (ml)	1.5 (1,4-1,7)
Total sperm sayısı (10 ⁶ /ejakulat)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Total motilite (%)	40 (38-42)
Progresif motilite (%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı spermatozoa, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar /%)	4
pH	7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (10 ⁶ /ml)	< 1.0

Semen Analizi

Semen analizi şu aşamalardan oluşur:

İlk 5 dakika içinde: Alınan örneğin likefiye olması için inkübatöre (37°C) alınması

30-60 dakika arasında:

Semen görünümü ve likefaksiyonun değerlendirilmesi

Semen hacminin ölçülmesi

Semen pH'ının ölçümü

Mikroskopik inceleme, sperm sayısı ve motilitesini değerlendirebilmek için dilüsyon ve ıslak preparatın hazırlanması

Sperm canlılığının değerlendirilmesi (motil spermilerin oranı düşük ise)

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için semen yaymasının hazırlanması

Semenin Toplanması

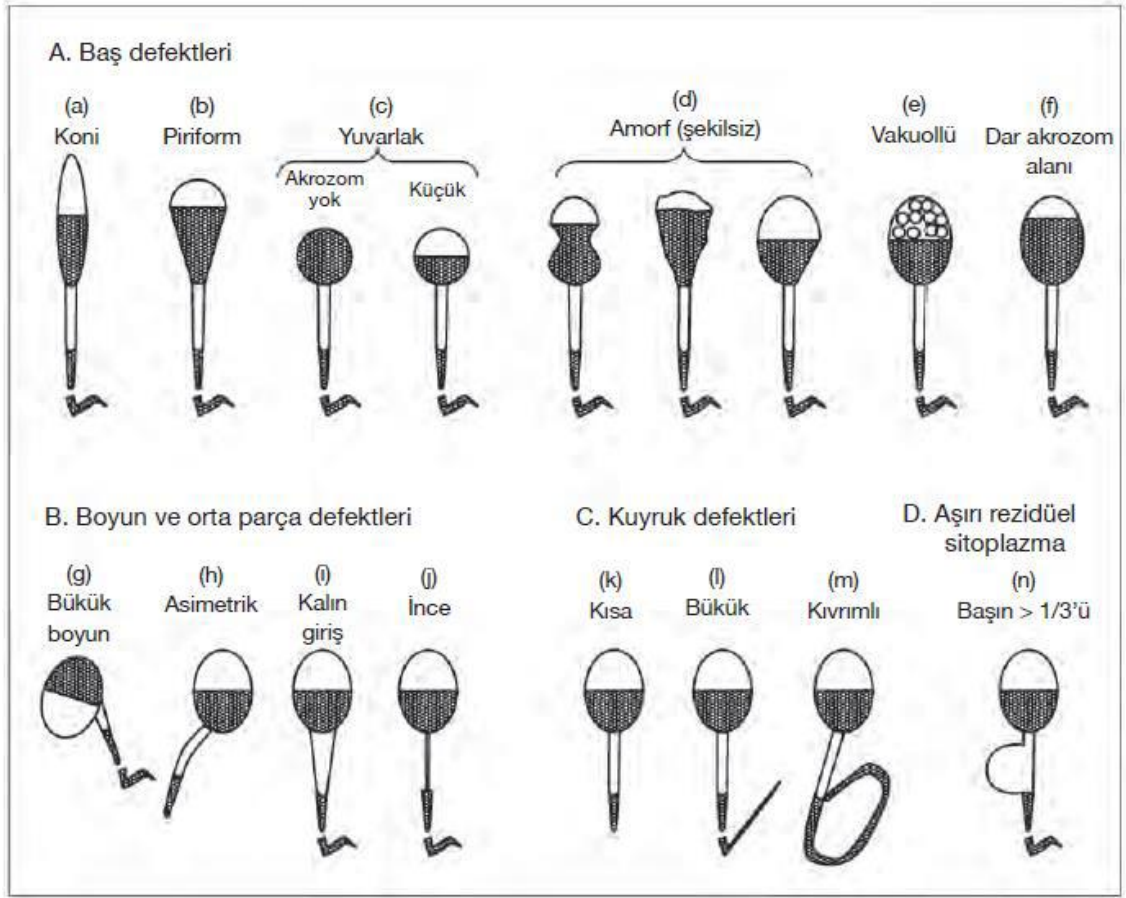
Semenin ortam sıcaklığındaki değişikliklere maruz kalmaması için numunenin laboratuvarın yakınındaki özel bir odada verilmesi gerekir. Numune 2-7 günlük cinsel perhizden sonra alınmalıdır. Numune mastürbasyonla elde edilmelidir. Erkek bireye, semen örneğinin toplanması ile ilgili net yazılı ve sözlü bilgi verilmelidir (Jeyendran 2003). Tetkik yapılacak erkek hastanın adı, doğum tarihi ve örnek numarası, perhiz süresi, toplanma tarihi ve saati kaydedilmelidir. Numune (semen) örneği, cam veya plastikten yapılmış temiz, geniş ağızlı bir kap içine alınmalıdır (Jeyendran 2003).

Sperm Morfolojisi

Sperm morfolojisi, bir erkeğin fertilité potansiyelini en iyi biçimde gösteren parametredir (Bostofte ve ark 1982). Dünya sağlık örgütü (WHO) kriterlerine göre toplam sperm morfolojisinin en az %30'unun normal olması gereklidir (Aggerholm ve ark 2008). Kruger kriterlerine göre (sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılır) normal morfolojinin %4'den az olduğunda gebelik oranlarının düşük olduğu belirtilmiştir (Tablo 4). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 el kılavuzunda, normal sperm morfolojisi için kabul edilen alt sınır, Kruger kriterlerine göre %4'tür (WHO 2010) (Tablo 4).

Tablo 4. Kruger kriterlerine göre normal sperm morfolojisi (Aşçı ve ark, 2013)

Baş	Uzunluk 4-5 mikron Genişlik 2,5-3,5 mikron
Akrozom	Başın %40-70'ini oluşturmali
Orta Parça	Genişlik 1 mikron Uzunluk baş uzunluğunun 1,5 katı kadar
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış ve kırık içermeyen yapıda
Sitoplazmik damlacık	Baş alanının %50'sinden az



Şekil2. İnsan spermatozoasının bazı anormal formlarının şematik resmi (Aşçı ve ark., 2013)

Sperm anormal formların tipleri (Şekil 10)

Baş defektleri: Büyük ya da küçük, konik, piriform, yuvarlak, amorf, çift başlı veya bunların kombinasyonu

Boyun ve orta kısım defektleri: Başın asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın ya da düzensiz olması, ince olması veya bunların kombinasyonu

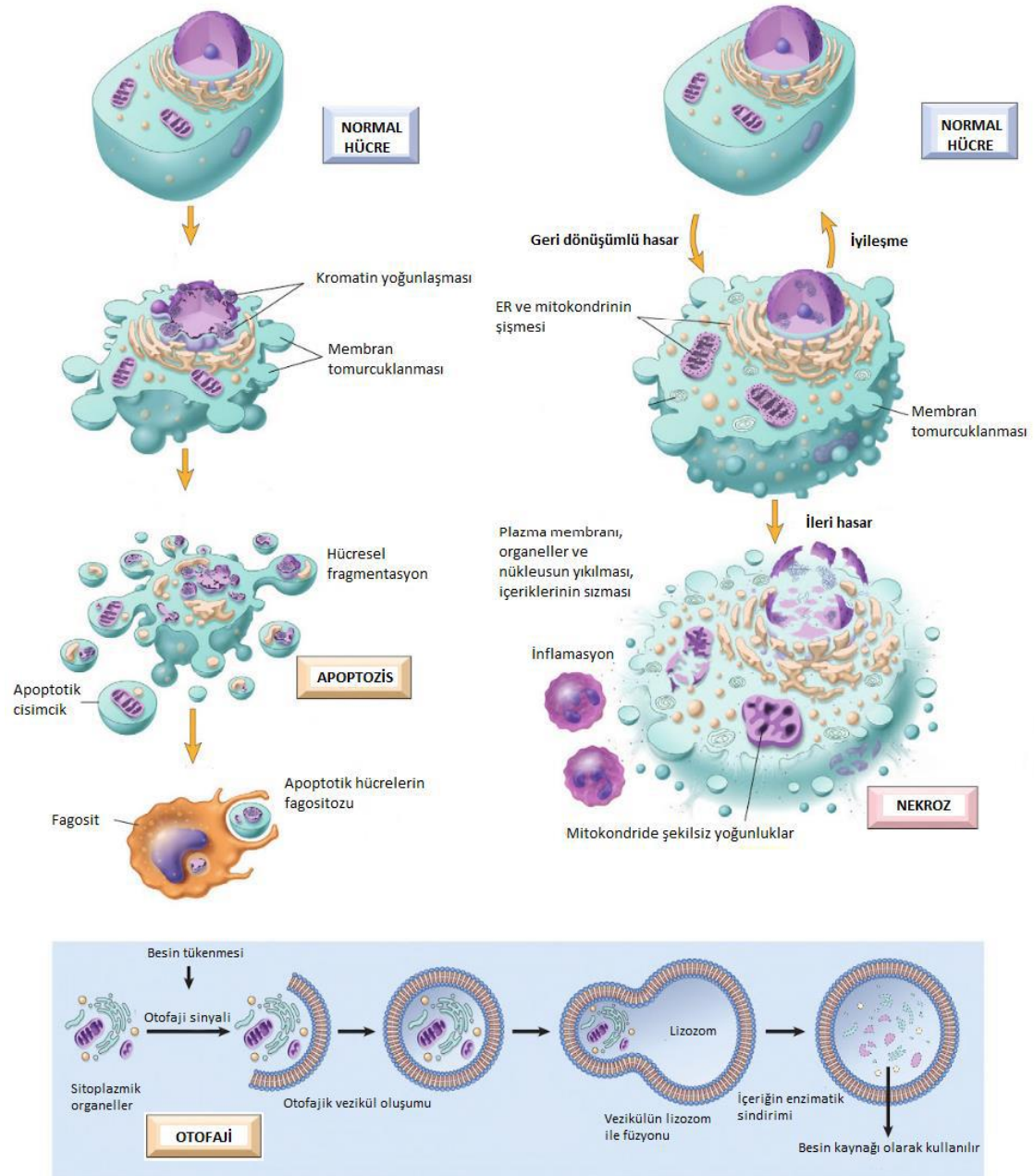
Kuyruk defektleri: Kısa, birden çok, kırık, keskin açılı, koil şekilli, düzensiz ve bunların kombinasyonları

Fazla sitoplazma kalıntısı: Spermatogenik süreçte üretilen anormal spermatozoa ile ilgilidir. Büyük miktarda düzensiz sitoplazma içerir ve orta kısım defektleri ile ilgilidir. Spermin morfolojik incelemesinin spermatogenez kalitesinin ve fertilitenin duyarlı bir göstergesi olduğu ortaya konulmuştur (Ford WC, 2010).

2.2. Apoptoz

Hücre ölümü, apoptoz, nekroz ve otofaji olmak üzere üç temel mekanizma ile gerçekleşmektedir (Nikoletopoulou ve ark. 2013). Apoptoz, Yunancada apo (ayrı) ve ptozis (düşen) kelimeleri ile oluşmuş, sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen bir sözcüktür. İlk defa Kerr ve ark. (1972) tarafından yapılan deneysel bir çalışma ile gösterilmiş olup, ‘fizyolojik hücre ölümü’ ifadesi ile tanımlanmıştır (Kerr ve ark. 1972). Apoptoz ya da programlı hücre ölümü, yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, düzensiz gelişmiş, enfekte ya da hasarlı hücreler gibi organizmada artık gereksinim duyulmayan hücrelerin özel mekanizmaların kontrolü altında programlı olarak ölümüdür. Bozulmuş apoptotik mekanizma, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklardan kansere kadar birçok patolojik süreçle ilişkilendirilmiştir (Cory ve Adams 2002, Adams 2003, Cory ve ark. 2003, Tait ve Green 2010).

Diğer hücre ölüm şekli olan nekroz, akut bir hasar sonucunda hücrenin şişmesi, patlaması ve diğer hücrelere zarar verir. Apoptotik mekanizmasıyla hücre, nekrozdan farklı olarak, komşularına zarar vermeyecek şekilde ölüme gider. Hücre büzülür, yoğunlaşır, hücre iskeleti yıkılır, çekirdek zarfı dağılır ve çekirdek DNA’sı parçalara ayrılır. Apoptoz, nekrozun zarar verici etkilerini engellemekte ve ölen hücreye ait organik bileşenlerin sindiren hücre tarafından yeniden kullanımını sağlamaktadır (Alberts ve ark. 2008). Otofajik mekanizmada ise apoptoz ve nekrozdan farklı olarak sindirilecek hücresel yapıları çevreleyen otofagozom, lizozom organeliyle birleşir ve içerik monomerlerine ayırır (Shintani ve Klionsky 2004). Otofaji, sitozolik protein ve organellerin hücrenin kendisi tarafından fagosite edildiği katabolik bir süreçtir (Wang ve ark. 2018)(Şekil 11).



Şekil 3. Apoptoz, nekroz ve otofaji mekanizmaları arasındaki morfolojik farklılıklar (Kumar ve ark. 2013)

Programlı hücre ölümü, gelişim ve farklılaşmayı şekillendirir. Erişkin dokularda, hücre ölümü hücre bölünmesini tam olarak dengeler(Alberts ve ark. 2008).Apoptozdan sorumlu hücre içi işlevsel mekanizmaların tüm hayvan hücrelerinde benzer olduğu görülmektedir. Omurgalılarda apoptotik süreçte primer etkili olan proteinler kaspazlardır. Kaspazlar, prokaspaz olarak sentezlenirler, belirli kısımlarının kesilip uzaklaştırılmasıyla aktif kaspaz halini alırlar. Kaspazlar, aktifleştikten sonra diğer ön kaspazları etkinleştirirler. Etkinleşen kaspazların bazıları hücre içindeki diğer kilit proteinleri keser(Alberts ve ark. 2008). Örneğin bazıları çekirdek laminlerini keserek çekirdek laminasının dönüşümsüz yıkımına sebep olur. Bazıları ise DNA yıkıcı bir enzimi etkisiz hale getiren bir proteini keserek DNAaz'ın serbest kalmasına ve çekirdek içinde DNA'yı kesmesine neden olurlar. Böylece hücre kendini programlı bir şekilde yıkar ve ölü hücre başka hücre tarafından hızlıca alınıp sindirilir. Apoptotik yolaktakibu proteaz kaskadı geri dönüşümsüzdür (Alberts ve ark. 2008). Apoptotik süreçte kaspaz aktivasyon sürecinde başlatıcı sinyale bağlı iki temel yolak vardır(Strasser ve ark. 1995, Adams 2003). Bu yolaklardan ilki ekstrinsik yolak olup, bu yolakta hücre zarındaki ölüm reseptörlerine (Tümör nekroz faktör; TNF ve FAS) ölüm ligandları (TNF ve FAS) bağlanmaktadır (Strasser ve ark. 2000). Diğer yolak ise yetersiz sitokin desteği, DNA hasarı veya oksidatif hasar gibi hücre içi bir stres durumu ile tetiklenen intrinsik veya mitokondriyal yolaktır(Adams 2003). Dış mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması ökaryotik hücrelerdeki apoptotik sürecin kritik safhalarındandır (Wang 2001, Adams 2003). Dış mitokondriyal membran aynı zamanda intrinsik ve ekstrinsik yolakların geçişidir. B-cell leukemia/lymphoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinlerin protein-protein ya da protein-membran etkileşimleriyle apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynar(Leber ve ark. 2010, Shamas-Din ve ark. 2013). Bcl-2 protein ailesi apoptotik sürecin merkezinde yer almakta, pro-apoptotik ve anti-apoptotik etkiye sahip (Lovell ve ark. 2008) 30 üyeden meydana gelmektedir (Kalkavan ve Green 2018). Kaspaz aktivasyonunun ana düzenleyicileri olan Bcl-2 protein ailesi, hücrenin yaşamasına karar verir (Cory ve Adams 2002). Fonksiyonları ve yapılarına göre Bcl-2 protein ailesi genel olarak üç gruba ayrılmaktadırlar (Kvansakul ve ark. 2008, Hardwick ve Youle 2009, Shamas-Din ve ark. 2013). Bu gruplar; Bax alt grubu, Bik alt grubu ve Bcl-2 alt grupları olarak sınıflandırılırlar (Kvansakul ve ark. 2008, Hardwick ve Youle 2009, Shamas-Din ve ark. 2013).

Bax ve Bak, dış mitokondriyal membranda oligomerleşir ve sonucunda dış mitokondriyal membran geçirgenliğine aracılık eden kompleks yapısal değişimler geçirirler. Bu olayla birlikte, mitokondride membranlar arası alanda bulunan sitokrom-c ve Smac/diablo (Smac; second mitochondria-derived activator of caspase) gibi apoptotik faktörler sitoplazmaya salınır (Wei ve ark. 2001, Annis ve ark. 2005, Shamas-Din ve ark. 2013). Bu değişimler, BH3 proteinlerinden olan tBid, Bim ve Puma tarafından başlatılır. Bu proteinler Bax ve Bak proteinlerinin pro-apoptotik aktivitelerini indüklediği için aktivatörler olarak adlandırılırlar (Wei ve ark. 2000, Kim ve ark. 2009, Shamas-Din ve ark. 2013). Üçüncü grup ise, yapısında homoloji bölgelerinden 4'ünü içeren Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik fonksiyona sahip proteinlerden oluşur. Bu proteinler, pro-apoptotik etkiye sahip proteinlere bağlanırlar. Bad ve Noxa ise duyarlaştırıcı BH3 proteini (sensitizer BH3 proteins) olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinler Bcl-2 ve Bcl-xL'a bağlanmaktadır. Böylece anti-apoptotik proteinlerin tBid ve Bim gibi aktivatör proteinlere bağlanmasına engel olarak Bax/Bak aktivasyonuna destek olurlar (Lovell ve ark. 2008, Shamas-Din ve ark. 2013).

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik özelliğe sahip Bcl-2 aile üyelerinin membrana bağlanmaları yapısal olarak yeniden düzenlenmelerini sağlamaktadır. Bu yapısal farklılıklar, apoptozdaki rollerini değiştirmektedir (Yethon ve ark. 2003, Kim ve ark. 2004, Annis ve ark. 2005, Dlugosz ve ark. 2006, Peng ve ark. 2006).

2.2.1. İntrinsik/Mitokondriyal Yolak

İntrinsik ya da mitokondriyal apoptotik yolak omurgalılarıdaki en yaygın apoptotik mekanizmadır. Bu mekanizma, DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği, endoplazmik retikulum stresi ve ROS birikimi gibi hücrel stres faktörlerine yanıt olarak aktifleşmektedir (Green ve Llambi 2015).

Mitokondriaracılı apoptozda en önemli aşama mitokondriyal membranlar arası alanda bulunan sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıdır (Ow ve ark. 2008). Bu süreç, dış mitokondriyal membranda oligomerleşerek geçirgenliğe katkıda bulunan pro-apoptotik proteinlerin (Bcl-2-associated X protein; Bax ve Bcl-2 antagonist or killer; Bak) oluşturmuş olduğu porlar aracılığıyla meydana gelir. Salınan sitokrom c sitoplazmada bulunan apoptotik proteaz aktive edici faktör (apoptotic protease activating factor; Apaf-1) monomerlerine bağlanarak bu monomerlerin oligomerleşmesine ve heptamerik dATP bağımlı bir sinyal platformu haline dönüşmesine sebep olur (Li ve ark. 1997, Tait ve Green 2010). Ayrıca, Apaf-1 N-terminal kaspaz bağlayıcı domainleri (N-terminal caspase recruitment domains; CARD) ortaya çıkacak şekilde yapısal olarak değişir. Apoptozomolarak adlandırılan bu aktif kompleks yapıya pro formdaki başlatıcı kaspazlardan kaspaz-9 dahil olur. Yapıya katılarak dimerize olan kaspaz-9 aktifleşir (Li ve ark. 2017). Aktif kaspaz-9'un hedefi, sonlandırıcı kaspazlardan, kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi harekete geçirmektir. Pro formdaki bu kaspazlar, aktif kaspaz-9 tarafından kesilerek aktif forma geçişi sağlanmaktadır (Tait ve Green 2010, Green ve Llambi 2015)(Şekil 14).

2.2.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik yolak, hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerine [TNF reseptör süper ailesinden tümör nekroz faktör reseptörü 1 (TNFR1), TNF-ilişkili apoptozis uyarıcı ligand reseptörü (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor; TRAIL-R) ve Fas (Apo-1/CD95) reseptörü] kendi ligandlarının (sırasıyla TNF ligand, TRAIL ve FASL/CD95L) bağlanmasıyla başlamaktadır (Dickens ve ark. 2012). Bu bağlantı sitoplazmada bulunan inaktif formdaki başlatıcı kaspazlardan kaspaz-8 ya da kaspaz-10'un adaptör bir protein vasıtasıyla (Fas-associated death domain; FADD) reseptör-ligand kompleksine dahil olmasına sebep olur. Oluşan bu kompleks ölüm uyarıcı sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex; DISC) olarak tanımlanır. Bu yapıya dahil olan kaspaz-8 veya kaspaz 10, dimerizasyon ve otoaktivasyon neticesinde aktif forma geçer. Başlatıcı kaspaz olan kaspaz 8 veya kaspaz 10, sonlandırıcı kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi keserek aktif hale getirir. Bu şekilde ekstrinsik yolak üzerinden direkt kaspaz kaskadının aktifleştirilmesiyle apoptoza giden hücreler Tip 1 hücreler (T lenfositler gibi) olarak isimlendirilirler.

Fakat, dış mitokondriyal membran geçirgenliğinden bağımsız şekilde gerçekleşen bu ekstrinsik yolak, her zaman hücre ölümünü tetiklemek için yeterli değildir (Jost ve ark. 2009, Kalkavan ve Green 2018). Bazı durumlarda, aktifleşen kaspaz-8, pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyelerinden Bid olarak bilinen, Bcl-2 homoloji 3 (BH3) ile etkileşen domaine sahip ölüm antagonistini (BCL-2 homology 3 (BH3)-interacting domain death agonist; BID, a BH3 domain-only protein) (Tait ve Green 2010) keserek onu tBid (truncated) formuna dönüştürür. tBid, Bax ve Bak'ı aktif hale getirerek dış mitokondriyal membran geçirgenliğini uyarır. Bu aşamadan sonraki safhalar, intrinsik yolakta olduğu şekliyle devam eder ve hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 12) (Tait ve Green 2010). Bu ekstrinsik yolak üzerinden apoptoza uğrayan hücreler de Tip 2 hücreler (hepatositler ve pankreatik hücreler gibi)dir (Jost ve ark. 2009, Kalkavan ve Green 2018). Yin ve arkadaşlarının (1999) yapmış oldukları çalışmada yabanıl tip farelerde Fas ligandı enjeksiyonu neticesinde apoptozun uyarıldığı, Bid eksikliği oluşturulan grupta ise apoptoza direnç olduğu rapor edilmiştir (Yin ve ark. 1999).

SMAC, kaspaz-3 ve kaspaz-7 inhibitörü sitozolik X-bağlı apoptozis protein inhibitörü (X-linked inhibitor of apoptosis protein; XIAP) proteini ve diğer IAP (inhibitor of apoptosis protein) proteinlerinin nötralizasyonunu sağlamaktadır. SMAC'ın IAP'lar üzerindeki inhibitör etkisi, yapısındaki N-terminal AVPI motifinin BIR2 ve BIR3 domainleriyle etkileşime girmesiyle oluşur. OMI/HtrA2 (48KdA) SMAC'a benzer şekilde IAP'ların nötralizasyonu ile alakalı başka bir mitokondriyal membranlar arası alan proteindir. SMAC ve OMI'nin eksiklikleri apoptozu engellememektedir. Endonükleaz G ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi diğer mitokondriyal membranlar arası alan proteinleri de dış mitokondriyal membran geçirgenliği sonucunda sitoplazmaya bırakılırlar. Bunların kaspaz bağımsız hücre ölümüyle ilgili olduğu düşünülmektedir (Kalkavan ve Green 2018).

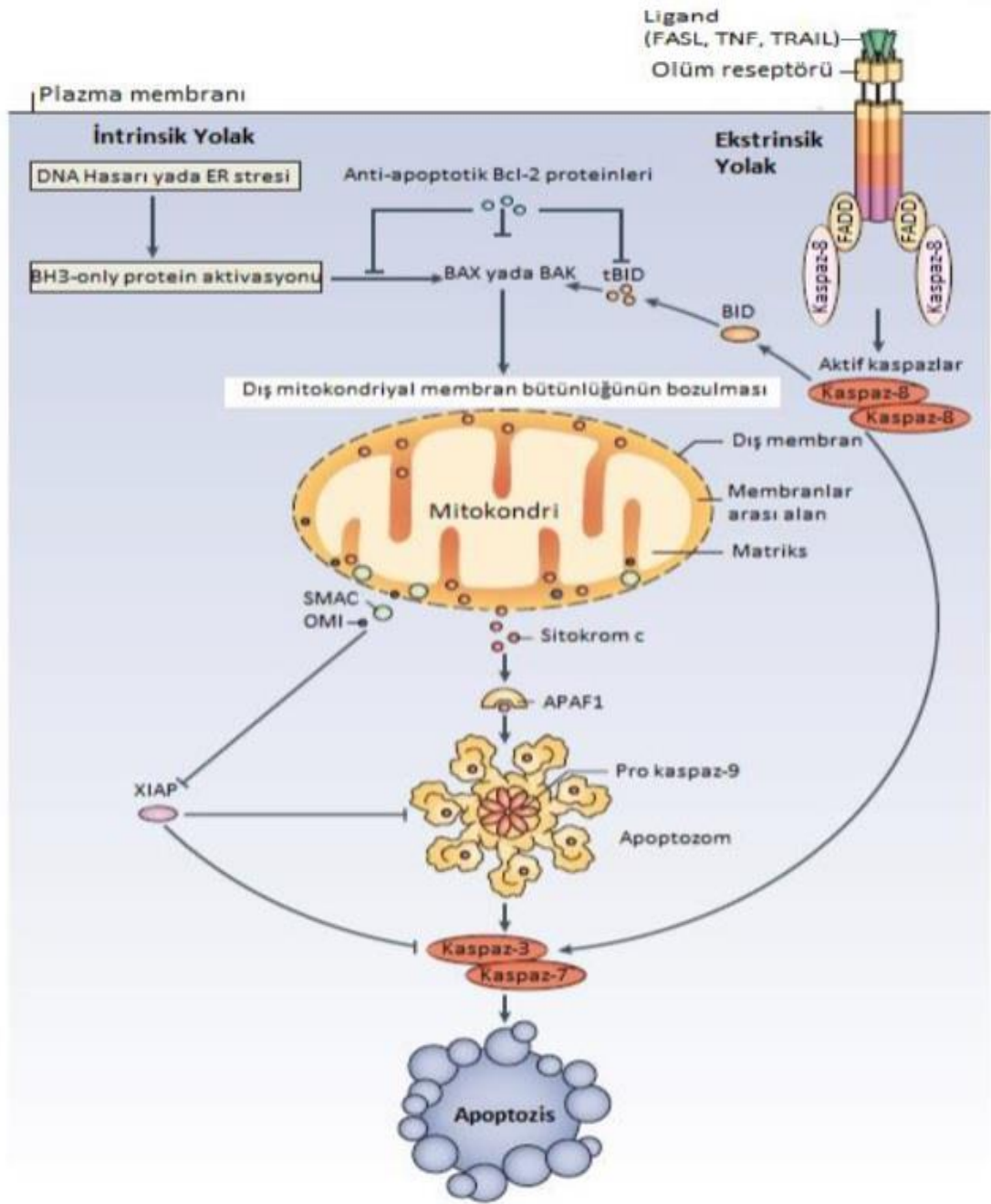
p53 Proteini, Hücre Döngüsü ve Apoptoz Yolağıyla İlişkisi

p53, 393 aminoasitten meydana gelen bir proteindir (Koçak ve ark. 2011). 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yaklaşık 20 kilobaz'lık bir alanda 11 ekzondan oluşan bir gen tarafından kodlanmaktadır. Bu gen Tumor protein 53 (TP53) olarak adlandırılmaktadır (Varley ve ark. 1997, Koçak ve ark. 2011). p53 proteini, hücre döngüsünün kontrol edilmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma, programlı hücre ölümü, DNA tamiri ve genomik kararlılığın sağlanması gibi daha birçok hücresel olayda görevlidir (Harris 1996). p53 bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin

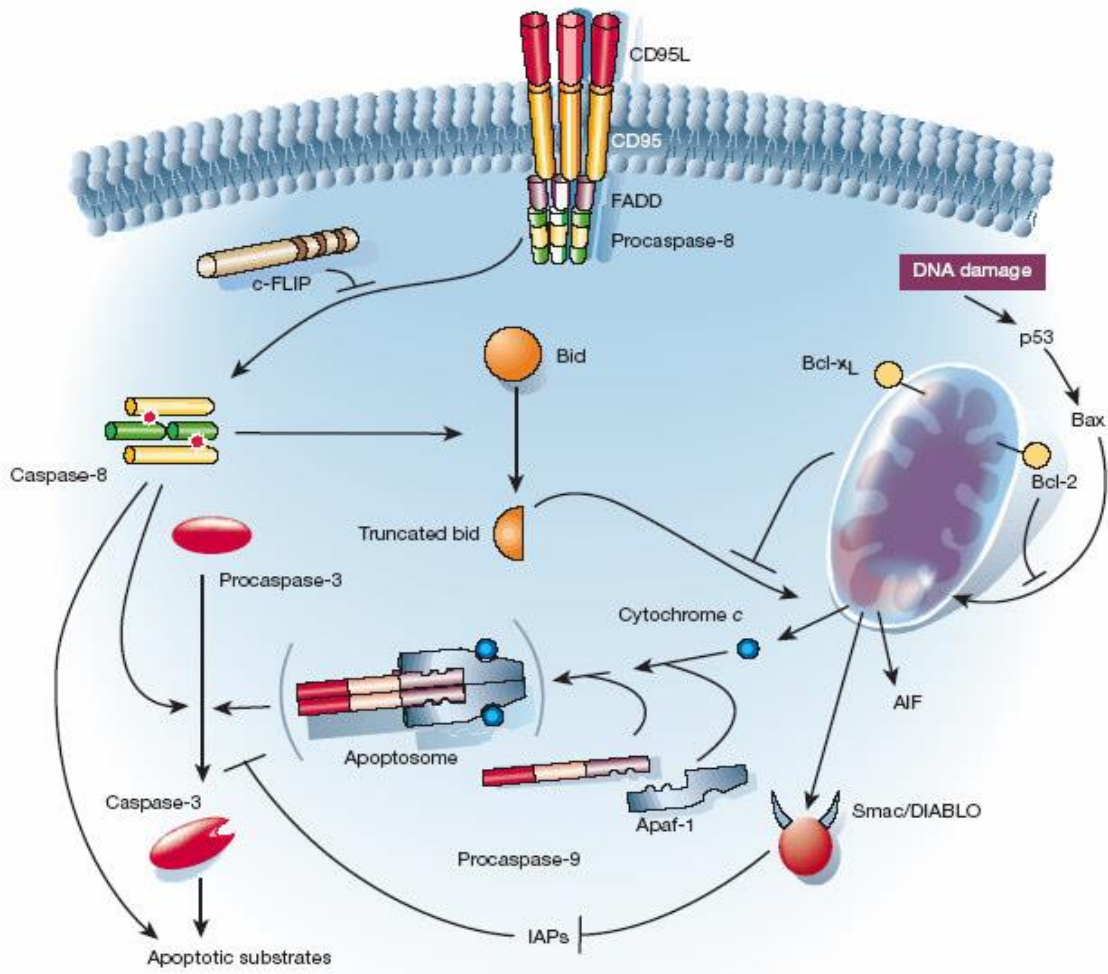
transkripsiyonlarını düzenleyerek veya diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşime girerek gerçekleştirmektedir (Koçak ve ark. 2011). p53 proteini, hücrenin yaşaması veya ölmesi ile ilgili yollarda merkezi konumda bulunmakta olup, hücrenin mevcut durumuna göre yaşamasına veya ölmesine karar veren en önemli proteinlerden biridir (Velculescu ve El-Deiry 1996). Hücrede gerçekleşen hasara bağlı olarak p53 proteini kararlı hale gelir ve hücre döngüsünü durdurur. Böylelikle hücrede hasarın tamiri yapılır. Hasarın tamiri mümkün değilse hücreyi apoptoza yöneltir (Koçak ve ark. 2011).

p53 proteini hücre hasarı oluştuğunda, bir transkripsiyon faktörü olarak DNA'ya bağlanır ve p21 (WAF2/Cip1) gen ekspresyon seviyesini uyarır. p21 proteini, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde görevli siklin bağımlı kinazların işlevini engelleyerek, hücre döngüsünü G1 safhasında durdurur (Harris 1996). Eğer hasar tamir edilemezse, p53 proteini BCL-2 interacting killer (Bik) proteinini indükleyerek hücreyi apoptoza yöneltir (Mates ve ark. 2008).

Bik proteini, Bcl-2 protein ailesinin, pro-apoptotik etkiye sahip, sadece BH-3 homoloji bölgesini içeren üyelerindendir (Willis ve Adams 2005, Chinnadurai ve ark. 2008). Hücrelerde genotoksik stres ve p53 overekspresyonu gibi stres durumlarına cevap olarak uyarılır (Mathai ve ark. 2005). Bik proteininin p53 aracılığıyla indüklenmesi, mitokondriyal apoptotik yolağın ileri aşamaları için önemlidir. Aktifleşen Bik, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasını ve kaspaz-3 aktivasyonu ile sonuçlanan intrinsik yolağın aktifleşmesini sağlar (Mates ve ark. 2008) (Şekil 12 ve Şekil 13).

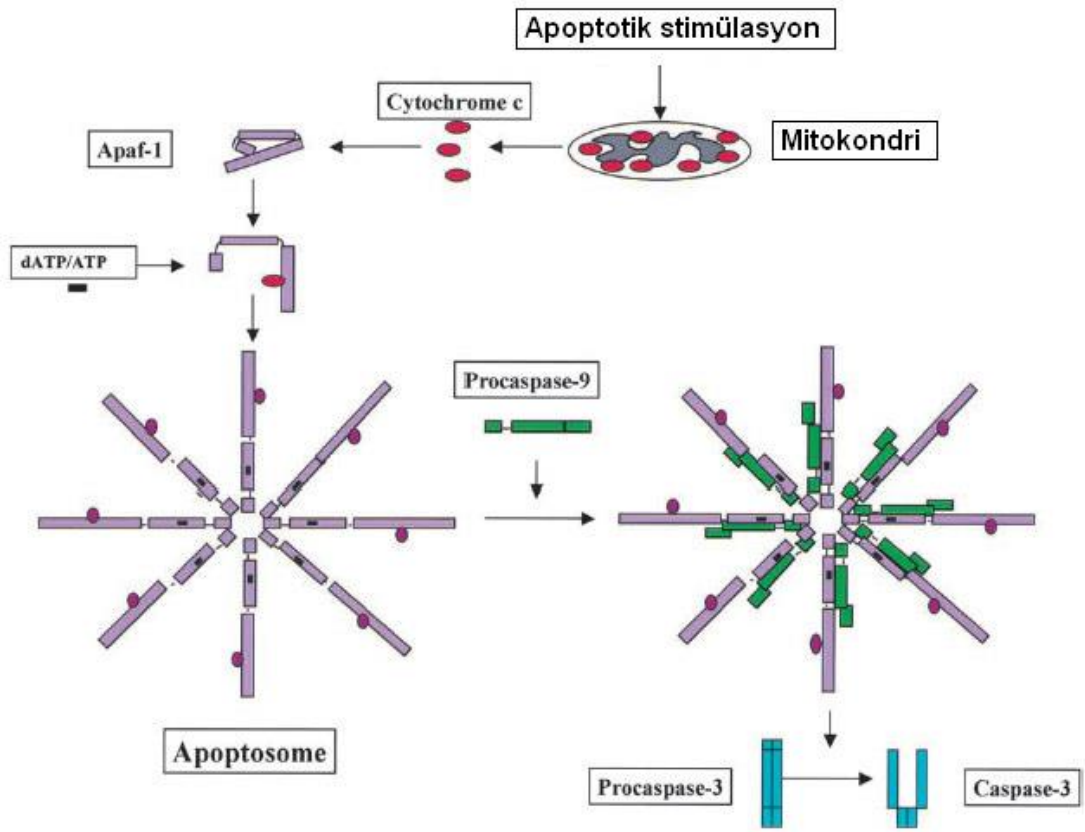


Şekil 12. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar (Tait ve Green 2010)



•Hengartner M.O. (2000): The Biochemistry Of Apoptosis Nature | Vol 407'den uyarlanmıştır.

Şekil 13. Apoptozis Mekanizmaları (Hengartner MO, 2000)



Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 15:2922–2933'den uyarlanmıştır.

Şekil 14. Apoptozom oluşumu (Yan N ve Shi Y, 2005)

Sitokrom c, apaf-1'i aktive eder ve ATP varlığında, multimerik kompleks olan apoptozomu oluşturur. Sitokrom c, mitokondriyal elektron iletim sisteminin önemli bir parçasıdır. Mitokondri iç ve dış membranının arasında bulunur. Kaspaz aktivasyonunda geçerli bir kofaktördür. Bcl2 ailesi proteinlerin salınımını sağlar (Yan N ve Shi Y, 2005).

2.2.3. Spermatogenez ve Apoptoz

Spermatogenez esnasında hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu spermatozoa oluşumunda önemli fonksiyona sahiptir. Sonucunda spermatozoa potansiyel sayısı yaklaşık olarak %75'i kadar azalır. Testiküler germ hücre apoptozu fizyolojik ve devamlı olarak meydana gelir (Seli E ve Sakkas D, 2005). Apoptozun normal spermatogenez sürecinde iki önemli fonksiyonu vardır. Bunlardan birincisi, Sertoli hücreleri aracılığıyla desteklenebilecek sayıda germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoanın azaltılmasında seçici rol oynamaktır (Host E ve ark., 2001; Sakkas D ve Moffat O, 2002). Spermatozoada

apoptozun varlığı yapılan araştırmalarda (Sun JG ve ark., 1997, Lopes S ve ark., 1998, Sakkas D ve ark., 1999, Irvine DS, 2000) birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir. (Sun JG ve ark., 1997; Lopes S, 1998; Sakkas D ve ark., 1999; 2002; Lachaud C ve ark., 2004; Moustafa M.H ve ark., 2004). Bu araştırmacılar somatik hücredeki kapsamlı DNA hasarına neden olan endojen endonükleazların aktivasyonu ile üreme havuzundan defektli germ hücrelerinin eliminasyonu gerçekleştireceği görüşündedir. Sakkas ve arkadaşları apoptotik eliminasyon hatası sonucu ejakulattaki spermatozoonda belirtilen apoptozu ‘abortif apoptoz’ olarak adlandırmıştır. Yazarlar bu hücrelerin apoptozdan kaçtığını öne sürmüşlerdir (Sakkas D ve ark., 1999; Sakkas D ve Moffat O, 2002 ; Aziz N ve ark., 2007). Apoptozun spermatogenez kontrol sistemlerinin çalışmamasının sonucu olabileceği görüşleri de literatürde mevcuttur (Aitken RJ ve Krausz C, 2001). Yapılan bir araştırmada DNA karşısında apoptozun, hatalı genetik kodun embriyoya geçmesini engelleyen son basamak olduğu konusunda görüş bildirilmiştir (Singh NP ve ark., 2003). Erkek üreme sisteminde lökositlerin etkisi fazladır, fakat seminal lökositlerin işlevi hala netlik kazanamamıştır. Ürogenital kanallarda enfeksiyon gözlenmediğinde; seminal lökositlerin asıl fonksiyonlarından birizari , apoptotik spermatozoaları yok etmek olabilir (Ricci G ve ark., 2002). Spermatozoa apoptozu ve spermatozoa DNA’sında hasar, erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apoptozla ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur. p53, p21, CD95 (Sakkas D ve ark., 1999) , kaspaz-3 (Weng SH ve ark., 2002; Paasch U ve ark., 2003), kaspaz 1-8 (Paasch U ve ark., 2003), Bcl-2 , Bcl xL (Cayli S ve ark., 2004, Seli E ve Sakkas D, 2005) ve Fas düzeyleri gibi farklı yollarla saptanabilmektedir. Son araştırmalar antiapoptotik rol sergileyen ve spermatozoa matürite işareti olarak kabul edilen HspA2 adlı protein ve erkek fertilitesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Isı şoku proteini A2 (Heat-shock protein, HspA2) bir spermatozoa matürite işareti olan Hsp70 şaperon protein ailesinin üyesi testis spesifik bir proteindir. Hsp70-2 bloke edilen farelerde mayoz duraksamasına ek olarak karakteristik apoptotik DNA patern bozulmasıyla germ hücre apoptoz artışı görülür. Yapılan araştırmalarda testiste HspA2 gen ekspresyonu oligozoospermik grupta normozoospermik gruba göre daha düşük bulunmuştur (Cedenho AP ve ark., 2006). İnsan ejakulatında düşük seviyede HspA2 tespit edilmiştir. Hsp70’in apoptozda çalışma mekanizması, apoptotik enzimler olan kaspaz-3 ve-9’un salınmasıyla gerçekleşir. Böylece HspA2, apoptotik sürecin olası bir inhibitörüdür (Huszar G ve ark., 2000)

2.3. Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins)

İlk kez keşfi, 1962 yılında F. Ritossa tarafından yapılmıştır. Isı Şok Proteinleri (HSP), 30 dakika süreyle 37°C ısıya maruz bırakılıp; daha sonra 25°C ısıya düşürülen *Drosophila Melanogaster* (sirke sineği) tükrük bezi hücrelerindeki kromozomal kümelenmelerde tanımlanmıştır (Milani ve ark., 2002). Sonrasında birçok araştırmacı, HSP'lerin prokaryotlar, mayalar ve bitkilerden ökaryotlara kadar bütün organizmalarda bulunan yüksek derecede korunmuş bir protein ailesi olduğunu belirlemiştir (Milani ve ark., 2002).

Rat embriyo hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, hücre içi moleküller olarak bulunan HSP'lerin hücre dışına da salındığı belirtilmiştir (Hightower LE ve Guidon PT, 1989). HSP'lerin keşfinden sonra; iskemi, hipoksi, basınç artışı, ağır metaller, serbest oksijen radikalleri, protein kinaz C, etanol, aminoasit ve glukoz analogları, inflamasyon, sodyum arsenit, sitokinler ve enfeksiyon varlığı gibi stresin yoğun olduğu durumlarda HSP artışı gözlenmiştir. HSP ekspresyonunun artışı, büyüme, gelişme ve farklılaşma gibi normal fizyolojik durumlarda da uyarılabilir (Rylander MN ve ark., 2005, Terzioğlu E, 1999).

Isı şok proteinleri genel olarak molekül ağırlıklarına göre adlandırılırlar. Her bir HSP bir çok özelleşmiş fonksiyona sahiptir ve hücre içinde çeşitli lokalizasyonlarda bulunurlar (Rylander MN ve ark., 2005) (Tablo 5). Isı şok proteinleri, hücre içinde, şaperonluk olarak tanımlanan, hücre içi polipeptitlerin taşınması, katlanması, bağlanması ve yıkılması ile oligomerik proteinlerin toplanma, birleşme ve ayrılmasında görev alırlar (Pockley AG, 2003).

HSP'lerin şaperon aktivitelerine ek olarak, çok sayıda koruyucu işlevleri de vardır. Özellikle HSP70 ve HSP27'nin apoptozisi engellediği ve böylelikle öldürücü uyarılara maruz kalan hücrelerde sağkalımı arttırdığı tespit edilmiştir (Rylander MN ve ark., 2005).

Isı şok faktörleri ısı şok elementi (HSE) olarak bilinen hedef DNA dizilerinin tanınmasından sorumludur. Normal şartlar altında HSF'ler HSP'lere bağlıdır ve aktif değildir. Isı şoku gibi stres mevcudiyetinde, HSF'ler HSP'lerden ayrılır, protein kinaz veya diğer serin/treonin kinazlar HSF'leri fosforile eder, sitozolde HSF'lerin trimer formları oluşur. Daha sonrabu HSF timerleri nükleusa transloke olur ve HSP70 genindeki HSE sekanslarına bağlanır. Bağlanmayı takiben HSF'ler asetilasyona uğrar ve HSP mRNA transkripsiyonu gerçekleşir. Yeni sentezlenen HSP mRNA'ları nükleustan sitoplazmaya çıkar vesitoplazma içinde yeni HSP proteinleri sentezlenir. Isı şoku yanıtı, stres koşullarının ortadan kalkmasından sonra HSP'lerin yeniden HSF'ye bağlanıp onu inaktif halde tutmasıyla sonlandırılmış olur (Pirkkala Lve ark.,2001).



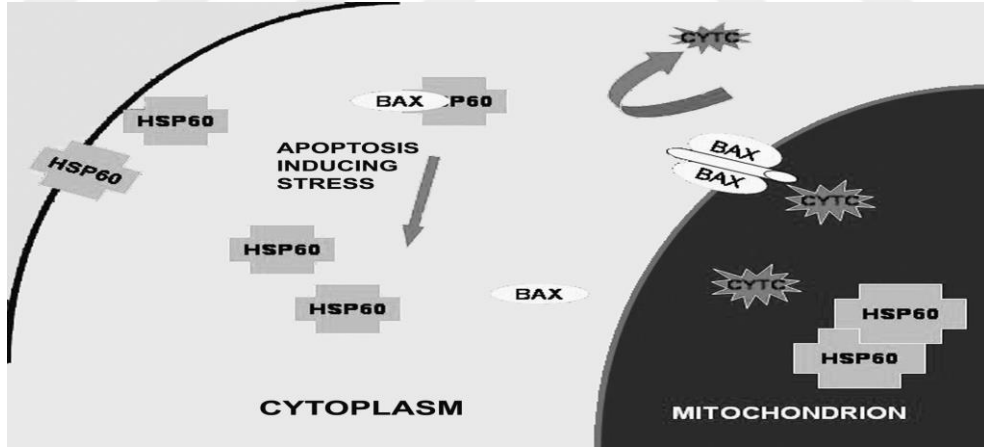
Tablo 5. HSP ailelerinin hücredeki lokalizasyonu ve fonksiyonları (Rylander MN ve ark., 2005)

HSP Ailesi ve üyeleri	Şaperon Üyeleri	Hücre içi lokalizasyonları	Hücre içi fonksiyonları
Küçük HSP ailesi	HSP27 α A ve α B cristalinler	Sitoplazma Sitoplazma	Hücre büyümesinde rolü Hücre iskeletistabilizasyonu ve aktin dinamiğinin sağlanması Polipeptit birikmesini önler
HSP40	HSP40	Sitoplazma/Nükleus Mitokondri	Hsp70 aktivitesinin düzenlenmesi, kollojenin işlenmesi veya sekresyonu
HSP60	HSP60	Mitokondri	Proteinlerin düzgün katlanması
HSP70	HSC70 HSP70 Big-GRP78 GRP75	Sitoplazma/Nükleus Sitoplazma/Nükleus Endoplazmik Retikulum Mitokondri	katlanmamış yapıların stabilize edilmesi; immünoglobulinlerin birleştirilmesi;protein salgısı;Termotolerans
HSP90 HSP100	HSP90 HSP104 GRP94	Sitoplazma Sitoplazma Endoplazmik Retikulum	Termotolerans Denatüre proteinlerin birikimini önler

HSP60

HSP60 (60-kDa HSP) ailesi, çoğunluğunu oluşturan mt-HSP60 ve %15 kadarı da st-HSP60'dan meydana gelmektedir. st-HSP60 aktin ve tübülün gibi hücre iskeleti proteinlerin katlanmalarında rol oynar (Gupta S ve Knowlton AA, 2002). HSP60, mitokondriyal proteindir ve sitozolde önemli miktarda bulunur. Kalpte, bu sitosolik HSP60, Bax, Bak ve Bcl-XL ile kompleks oluşturur, ancak Bcl-2 ile kompleks oluşturmaz. HSP60 ekspresyonundaki azalma apoptozu hızlandırır, ancak mitokondriyal fonksiyonunu değiştirmez. HSP60'ın ayrıca pro-kaspaz3 parçalanmasını hızlandığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, HSP60 hücrede apoptozda karmaşık bir role sahiptir. Normal şartlar altında Bax'a bağlanması, apoptozda önemli bir düzenleyici rolü olduğunu düşündürmektedir (Gupta S ve Knowlton A A, 2005).

HSP60 ve Bax, sitozolde bir kompleks oluşturur. Hipoksi sırasında bu kompleks ayrılır, Bax mitokondriye taşınır ve HSP60 plazma modülüne taşınır. Bax'ın mitokondriye hareketi, sitokrom c'nin salınmasına ve aşağı akış kaspaz kaskadının aktivasyonuna neden olur. Anlaşılır olması için sadece Bax gösterilir, ancak hem Bak hem de Bcl-XL'nin sitosol içindeki HSP60 ile de kompleks olduğu gösterilmiştir (Gupta S ve Knowlton A A, 2005) (Şekil 15).



Şekil 15. HSP60 ve BAX ve apoptozu indükleyen stresin etkisi

HSP70

HSP70, bütün HSP ailelerinin içinde en çok araştırma yapılmış olan proteindir. Sitozolik HSP70 temel olarak iki formda bulunur: stresle düzeyi artan HSP72 (HSP70 olarak bilinir) ve konstitütif olan HSP73. HSP70'in en farklı özelliklerinden biri de HSP60 ile birlikte hücre dışı ortamda bulunabilmesidir (Otaka M, ve ark., 2006).

Protein katlanmasındaki görevleri içinde, yeni üretilen proteinlerin katlanması, yanlış katlanmış ya da agregasyona uğramış proteinlerin yeniden katlanması, salgısal proteinlerin hücre zarına translokasyonu ve düzenleyici proteinlerin aktivitelerinin kontrolü vardır. HSP70 bu etkilerini ATP vasıtasıyla peptidlerin hidrofobik segmentleri ile etkileşerek göstermektedir (Mayer MP ve Bukau B, 2005). HSP70 faaliyetlerinin regülasyonu HSP70 gen kontrolü, ko-şaperonilişkileri ve diğer şaperon sistemlerle ilişki halinde olmaları ile düzenlenir. Yeni üretilen proteinlerin çökmesini koşaperon olan J-domain protein (JDP) ile beraber koordine ederler (Mayer MP ve Bukau B, 2005). Bu kompleks, yeni üretilen proteini hidrofobik uçlarından sararak hücre içi etkileşimlere karşı korur. Bu özellik sadece HSP 70 ailesine aittir. Yapılan araştırmalarda çöken proteinlerin HSP70-HSP100 işbirliği ile çözülebilir hale getirildiği ve sonra tekrar katlanmaya uğradıkları tesbit edilmiştir (Mayer MP ve Bukau B, 2005).

HSP70 hücresel protein metabolizmasını düzenlemek için polipeptid bağlayıcı olarak rol oynar (Shaner L ve Morano KA, 2007). HSP70 ısı şokunun, apoptotik uyarının, tümör nekroz faktörünün, büyüme faktörü yokluğunun, oksidatif stresin, kemoterapik ajanların, seramid ve radyasyonun etkilerine karşı hücreleri korur. HSP70, ısı şokunda ya da seramid uyarılmalı apoptoziste kaspaz-3 ve SAPK/JNK aktivasyonunu engeller (Fan CY ve ark., 2003). HSP70'in bu hücreyi koruyucu özellikleri sebebiyle kanser araştırmalarında HSP70 inhibitörlerine olan alaka son zamanlarda artmıştır. HSP70'in bazı önemli görevleri arasında hücresel kompartmanlar içine proteinlerin taşınması, sitozol, mitokondri ve endoplazmik retikulumda proteinlerin katlanması, stabil olmayan proteinlerin yıkımı, protein komplekslerinin bozulması, düzenleyici proteinlerin kontrolü, hatalı katlanmış proteinlerin geri katlanması, mitokondri içine öncü proteinlerin translokasyonu sıralanabilir (Li CY ve ark., 2000).

HSP90

HSP90, hücredeki bütün proteinlerin % 1-2'sini meydana getiren etkili bir şaperon molekülüdür (Banerji U, 2009). Endoplazmik retikulumda en çok bulunan ısı şok proteinidir. İnsanlarda, sitoplazma içerisinde HSP90- α ve HSP90- β olmak üzere iki formu vardır. HSP90 moleküler yapı bakımından 3 etkili bölgeden oluşur; 1) ATP bağlayan NH₂-terminal bölge (24-28 kDa), 2) İstemci protein bağlayan orta bölge (38-44 kDa), 3) Dimerizasyondan sorumlu -COOH terminal bölgesi (11-15 kDa) (Banerji U, 2009). HSP90 benzeri proteinler ligand eksikliğinde hormon reseptör bağlayıcı etki gösterirler. Bu moleküller steroid reseptörlerine bağlanarak, steroid reseptörlerin nükleer DNA'ya bağlanmasını inhibe ederler. Böylelikle steroid reseptörler ile DNA arasında zamanından önce oluşacak bir etkileşim önlenmiş olur (Russell R ve ark., 1999).

HSP27

HSP27 (27-kDa HSP), küçük HSP ailesinin bir üyesidir (Leonardi R ve ark., 2001). Genel olarak 12-43 kDa ağırlığında olan bu grup özellikle insan göz lensinde bulunan α -crystallin ile yapısal benzerlik gösterir (Sun Y, Mcrae TH, 2005; Nakamoto H. ve Vigh L, 2007). Her ne kadar bir çok molekül bu gruba dahil olsa da ortak noktaları α -crystallin domaini adı verilen 100 aminoasitlik ortak bir yapı içermeleridir. Hem sitoplazma hem de nükleusta yer alır. Bu protein, termotoleransın yanı sıra epitel hücrelerinin diferansiyasyonunun düzenlenmesinde, yara iyileşmesi sırasında keratinositlerin migrasyonunda, apoptozisin engellenmesinde ve hücrelerin enflamatuvar mediyatörlerin sitotoksitesinden korunmasında rol oynamaktadır (Leonardi R ve ark., 2001; Takahashi-Horiuchi Y ve ark., 2008). Hücrenin birçok değişik bölgesinde yerleşmişlerdir ve değişik görevleri vardır. Daha çok hücre iskelet yapısı ve zarlarla etkileşerek koruyucu olarak görev yaparlar.

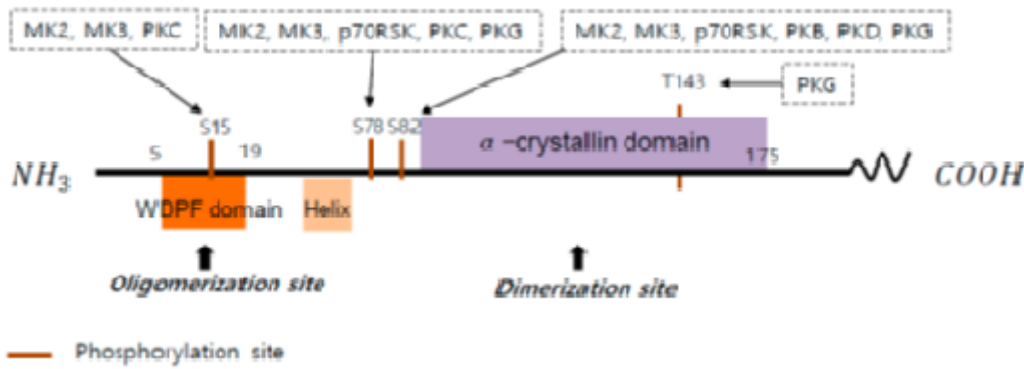
Küçük HSP'ler moleküler şaperonlar arasında en çeşitli yapıdadır. HSP27 yüksek oranda korunmuş bir α -kristalin alanı içerir. İnsanlarda α -kristalin alanı dimer oluşumunda önemli bir rol oynar. α -kristalin yapısı dinamiktir ve stresli koşullar altında hızlı alt birim değişiminden etkilenir. (Choi S K ve ark., 2019) HSP27, hücrelerde multimerik kompleksler oluşturmak ve denatüre veya toplanmış proteinleri stabilize etmek ve orijinal hallerine döndürmek için bir şaperon görevi görür. HSP27 ve monomerik formun oligomerik konformasyonu dinamik olarak meydana geldiğinden, protein homeostazi için oligomerlerin veya monomerlerin gerekli olup olmadığını ve ne yaptıklarını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

HSP27, sHSP'lerden farklıdır, çünkü kovalent disülfür bağlı homodimerler oluşturabilir (Bagneris ve ark., 2009; Hochberg ve ark., 2014). Önceki çalışmalar, hücrel stres koşulları altında (Almeida-Souza ve ark., 2010), hücrede Hsp27'nin disülfür bağlı dimerlerinin oluşabileceğini göstermiştir. Bu koşullar altında, Hsp27'nin kuaterner dinamikleri α - β -kristaline göre önemli ölçüde farklılık gösterebilir, çünkü Hsp27'nin değişimi α - β -kristalin için daha kolay, kovalent olmayan monomer değişiminin aksine kovalent bağlı bir dimer formundadır (Baldwin ve ark., 2011). Hsp27'nin N-terminal bölgesi, çok sayıda serin rezidüsünde in vivo fosforilasyona uğrar (Ito ve ark., 1997; Lambert ve ark., 1999 , Arrigo, 2011) ve 15, 78 ve 82 MAPKAPK-2 ve MAPKAPK-3 kinazlar fosforilasyona aracılık eder (Arrigo, 2011 , Landry ve ark., 1992). Bu bölgelerdeki fosforilasyon, hücrel stres tarafından indüklenir ve böylece bu serin tortularının üçünde veya HSP27'defosforile edildiğinde HSP27'nin kuaterner yapısında değişikliklere yol açar (Lambert ve ark., 1999).

HSP27'nin fosfo-uyarıcı formları, oligomer boyutunda bir azalma (Lambert ve ark., 1999), geliştirilmiş şaperon aktivitesi ve T4L lizoziminin stabilize olmayan formlarına bağlanma kabiliyetinin arttığını gösterir (Hayes ve ark., 2009 , McDonald ve ark., 2012 , Rogalla ve diğerleri, 1999, Shashidharamurthy ve ark., 2005). Bununla birlikte, bugüne kadar bu üç serin rezidüsünün her birinde fosforilasyonun HSP27 oligomer boyutu, oligomer dağılımı ve şaperon fonksiyonu üzerindeki spesifik etkileri üzerine kapsamlı bir araştırma yapılmamıştır.

X-ışını analizi HSP27'nin kristalin alanını ortaya çıkarmıştır; bununla birlikte, HSP27'nin oligomerik proteininin kararlı bir kristalini elde etmek zor olduğu için tüm moleküler yapı hala bilinmemektedir. Bu nedenle, HSP27'nin amino asit dizisinden ikincil bir yapı sarmalı ve ipliği çıkarılmıştır. Tam bir üçüncül yapı henüz elde edilmemiştir(Choi S K ve ark., 2019). HSP27 zayıf korunmuş, düzensiz N-terminaline ve oldukça esnek, değişken C-terminaline sahiptir. HSP27'nin yapısını pH ve sıcaklık gibi koşullara bağlı olarak değiştirmesi muhtemeldir. Çok özel koşullar altında üçüncül bir yapı elde etmek mümkün olabilir. α -kristalin yapısı oligomerizasyon ve çözünürlük için önemlidir. HSP27, protein katlama-yeniden katlama mekanizmalarında yer alan ATP'den bağımsız bir moleküler şaperondur(Choi S K ve ark., 2019)(Şekil 16).HSP27, hücrelerde ve dokularda bazal seviyelerde bulunur ve büyük oligomerler şeklinde düzenlenir (Lelj-Garolla B ve Mauk AG,2006).

Isı artışı, oksidatif stres ve diğer tüm ekstraselüler stres ajanlarının varlığında, p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz (P38MAPK) kaskadı stimüle edilir. Bunu takiben MAPKAP kinase 2 ve 3 aktive olur ve HSP27 N-ucunda yer alan üç serin rezidü sayesinde fosforilasyona uğrar. HSP27 esas olarak 3 bölgede, yani Ser15, Ser78 ve Ser82'de fosforile edilir ve fosforilasyon, protein kinaz C (PKC) β , hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz (ERK) dahil çeşitli protein kinazlar tarafından katalize edilir (A.P. Arrigo ve ark., 2005). Bu şekilde strese hızlıca yanıt oluşturulur. Son çalışmalar Hsp27'nin protein kinaz C'nin delta izoformu tarafından da fosforillenebileceğini göstermiştir (Ebrahimi M ve ark., 2009) (Şekil 16).



Şekil 16. HSP27'nin yapısı (Choi S K ve ark., 2019)

HSP27'nin yapısı, N-terminal alanı, α -kristalin alanı ve C-terminal alanından oluşur. N-terminal alanı, büyük oligomerizasyon için gerekli olan bir WDPF motifi içerir. C-terminal alanı, türler arasında yüksek oranda korunan ve küçük oligomerizasyon oluşumunda rol oynayan bir α -kristalin motifi içerir. HSP27'nin fosforilasyon alanları; S15, S78, S82 ve T143 olarak belirtilir. S15, p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) ile aktive edilmiş protein kinaz 2 (MK2) ve 3 (MK3) ve protein kinaz C (PKC) ile fosforile edilebilir. S78, MK2, MK3, ribozomal S6 kinaz (p70RSK), PKC ve protein kinaz G (PKG) ile fosforile edilebilir. S82, MK2, MK3, p70RSK, protein kinaz B (PKB), protein kinaz D (PKD) ve PKG ile fosforile edilebilir (Choi S K ve ark., 2019) (Şekil 16). Daha önce yapılan çalışmalarda S78 ve S82'nin HSP27'nin oligomerizasyonunda rol aldığı, ancak S15'in etkilerinin az olduğu belirlenmiştir (Lambert H ve ark., 1999; Gusev N B ve ark., 2002).

HSP27, 1000 kDa'ya kadar oligomerler oluşturabilir ki bu, istemci proteinin yetkin, bağlayıcı bir durumu olan HSP27'nin şaperon aktivitesini modüle etmede merkezi

bir rol oynayan çok dinamik bir süreçtir (Katsogiannou, M ve ark, 2014) (Şekil 17). Son çalışmalara göre, HSP27'nin dimerik formu, diğer istemci proteinlere artan bağlanma ile kendini gösteren şaperon aktivitesinin merkezinde yer almaktadır (Freilich R ve ark., 2018) HSP27'nin ani ve geçici fosforilasyonunun kanser hücrelerinde kemoresans başlattığı bildirilmektedir (Stope M B ve ark., 2014)



Şekil 17. HSP27'nin komformasyonel yapısı(Choi S K ve ark., 2019).

Fosforilasyon farklı durumlar arasında konformasyonel yapısal değişime neden olmuştur. HSP27, fosforlanmamış olduğunda büyük oligomerler olarak bulunur. Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz (MAPK) yolundaki spesifik serin kalıntıları, HSP27 daha küçük oligomerlere geçer. HSP27 konformasyonel yapısı aktif olarak değişir ve proteostazın korunmasına katkıda bulunur(Choi S K ve ark., 2019). Küçük HSP'ler şaperon etkilerini ve çözünürlüklerini moleküllerindeki serbest karboksil uç sayesinde korurlar (Sun Y, Mcrae TH, 2005). Yine aynı karboksil grup küçük HSP'lerin birbirine bağlanmasını sağlar. Küçük HSP ökaryotların mikrofılaman, mikrotübül ve aktin gibi hücre iskelet yapıların ve α -crystallin ile etkileşerek bu yapıların ısı, oksidatif stres ve kimyasal ajanlara karşı korunmasını sağlarlar. HSP27, HSP25, HSPB9 ve HSP20'nin stres durumunda hücre çekirdeğine geçtiği gösterilmiş, ancak bu moleküllerin transkripsiyon faktörü olarak mı bir fonksiyona sahip oldukları, ya da çekirdekçiği mi korudukları tam olarak aydınlatılamamıştır (Leonardi R ve ark., 2001). Mutasyona uğramış formları ise Parkinson ve Alzhemier hastalığının patofizyolojisinde rol oynar. Kanserlerde tümörün agresifliğini azaltırlar ancak kemoterapiye direnç gelişiminde de rol oynamaktadırlar. Isı ile önceden indüklenen bu gruba ait HSP'ler kalp, beyin ve böbrekte iskemi- reperfüzyon hasarına karşı koruyucudurlar. HSP27 ve 32'nin intestinal hücrelerde iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir

(Leonardi R ve ark., 2001). Isı denatürasyonu karşısında enzimleri koruma yeteneğine sahiptir (Liberek K ve ark., 2008).

İntraselüler HSP27 diğer şaperonlar gibi ısı ve benzeri stres koşulları altında ekspresyon düzeyini artırır ve hücrede proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olarak agregasyonları önlemede rol alır. HSP27, bir protein şaperonu ve bir antioksidan olarak işlev gören, apoptozun engellenmesi ve aktin hücre iskeletinin yeniden şekillenmesinde rol oynayan bir proteindir (Jakob U ve ark., 1993).

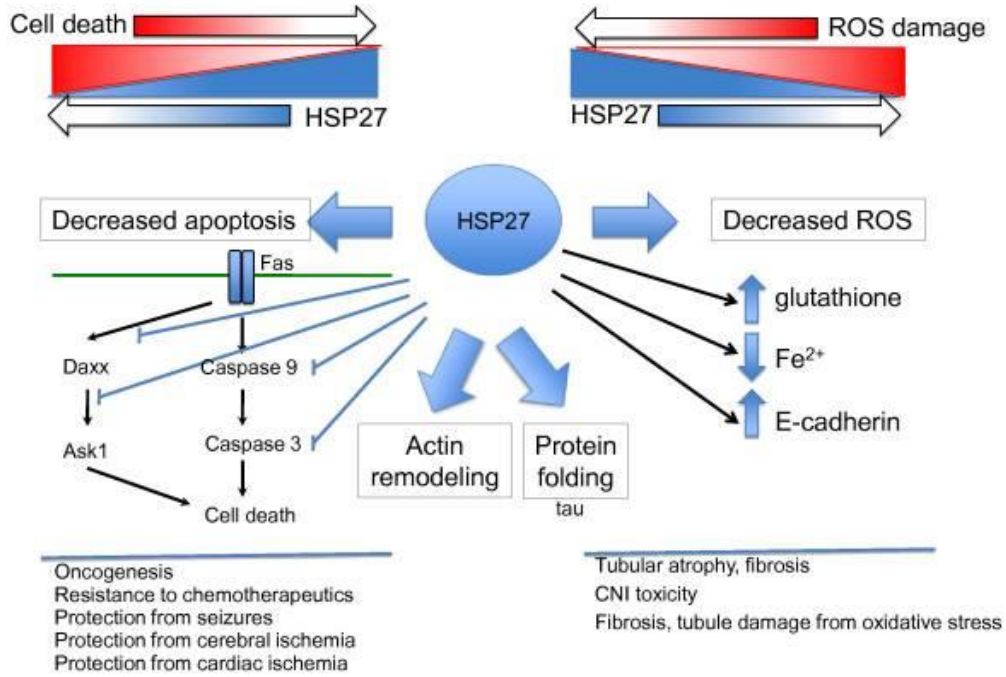
Stres altındaki hücrede birkaç dakika içerisinde artmış fosforilasyon düzeyi gösterilebilir. Stres ajanı ortadan kalktığında ise molekül hızlıca en basit formuna geri döner. Ayrıca hücre büyüme ve farklılaşmasında kritik basamaklarda ani ve hızlı ifade artışı da gözlenmiştir. Fosforilasyondan sonra HSP27 kendini daha küçük oligomerler, sıklıkla dimerler ve tetramerler halinde yeniden düzenler ve diğer proteinlerle etkileşime girebilir (Charette SJ ve Landry J, 2000). Fosforilasyon durumundaki bu basit değişiklik, HSP27'nin fonksiyonlarının çoğunu düzenler (Vidyasagar A ve ark., 2012). Örneğin, Fas-FasL aracılı apoptoz sırasında, DAXX'ı bağlayan ve böylece DAXX'in Ask1'e bağlanmasını ve takiben apoptoz kaskadını bloke etmesini önleyen fosforile HSP27'dir (Rogalla T ve ark., 1999). Aktin filament regülasyonu durumunda, HSP27'nin fosforilasyon durumu çift role sahiptir. Fosforile HSP27, filament dejenerasyonunu önler ve polimerizasyonu destekler, fosforlanmamış HSP27 ise aktin kapama proteini olarak işlev görür (Huot J ve ark., 1996; Guay J ve ark., 1997).

Alfa-kristalin domeynlerin karşılıklı etkileşimleri HSP27 dimerizasyonunu sağlar ve ardından N-ucu domeyni aracılığıyla HSP27 hücrede dinamik homo-oligomerler oluşturur. Bu multimerik kompleksler ATP-bağımsız olarak yanlış katlanan proteinlerin agregasyonunu önler ve onları doğru katlanma için Hsp70 gibi daha büyük şaperonlara yönlendirir (Arrigo, 2017). HSP27 N-ucu fosforilasyonu oligomerizasyon sürecini tersine çevirir ve HSP27 dimerlerinin oranını artırır. Ancak sürecin çok dinamik olması sebebiyle HSP27'nin asıl şaperon fonksiyonunu hangi aşamada gösterdiği üzerine literatürde çelişkili yayınlar mevcuttur (Rogalla ve ark., 1999; Jovcevski ve ark., 2015). Buna rağmen, HSP27'nin en güçlü şaperon aktivitesini fosforile dimer aşamasında iken gösterdiğine dair kanıtlar daha güçlü görünmektedir (Jovcevski ve ark., 2015).

HSP27 ile ilgili yapılan son araştırmalarda, proteinin ısı şokundan başka hücresel stres koşullarına da cevap verdiği ortaya çıkarılmıştır. Hücre içi glutatyon düzeylerini

yükselterek ve hücre içi demir düzeylerini düşürerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzeylerini düşürerek bir antioksidan işlevi görür (Arrigo AP ve ark., 2005). HSP27, apoptozun hem mitokondriyal bağımlı hem de bağımsız yollarıyla etkileşime girerek kimyasal stres koşulları altında bir anti-apoptotik ajan olarak görev alır.

Ekstrasellüler HSP27'nin hücre dışında üstlendiği görevler henüz tam anlamıyla ortaya konulamamış olsa da, bugüne dek yapılan çalışmalar eHSP27'nin Toll-benzeri reseptörlerle (TLR) etkileşip bu sinyal iletim yolağını aktive ederek sitokin salınımını uyardığını ve immün yanıtı düzenlediğini göstermiştir (Batulan ve ark., 2016). İnsan makrofajlarıyla yapılan bir araştırmada rekombinant eHSP27'ye maruz bırakılan makrofajlarda artmış NF- κ B transkripsiyonel aktivasyonu ve buna bağlı olarak hem pro- (IL-1 β , TNF- α) hem de anti-inflamatuvar (IL-10, GM-CSF) sitokinlerin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (Salari ve ark., 2013). Sahip olduğu bu immün düzenleyici fonksiyonun, eHSP27'nin özellikle ateroskleroz gelişimine karşı gösterdiği koruyucu etkiye önemli bir katkı sağladığı düşünülmektedir. İmmün etki dışında eHSP27'nin yine TLR sinyal iletim yolağı ve NF- κ B aktivasyonu üzerinden ICAM-1, MCP-1 ve VEGF gibi proteinlerin ekspresyonunda artışa neden olarak vasküler endotelial hücre migrasyonu ve proliferasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Thurinifer ve ark., 2013; Jin ve ark., 2014).



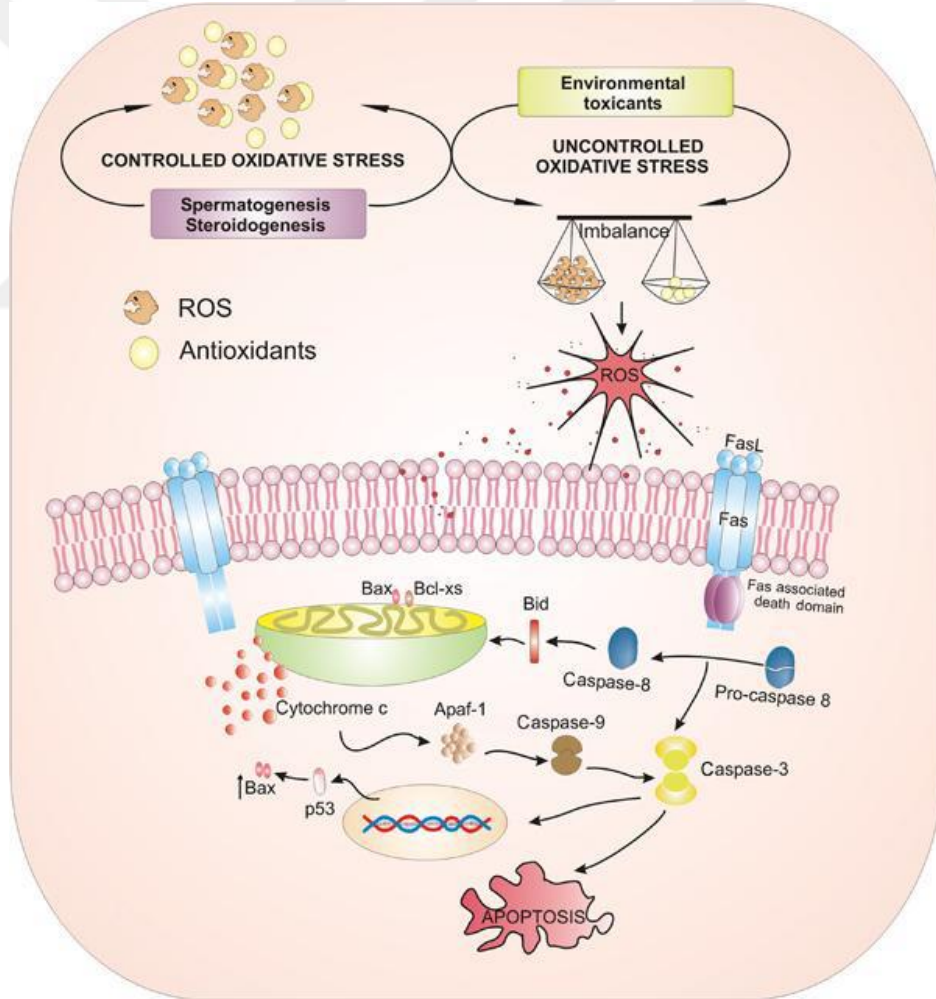
Şekil 18.HSP27'nin bazı hastalık mekanizmalarındaki fonksiyonları (Vidyasagar A ve ark., 2012)

Kanser hücrelerinde çok miktarda bulunurlar ve tümör oluşumunda majör rol oynarlar. Öte yandan HSP27'nin yüksek ifadenmesi genotoksik ilaçlar ve oksidanlar tarafından senesensin baskılanmasıyla sonuçlanır. Burada HSP27'nin rolü Hsp70'e benzemektedir. HSP27'nin antiapoptotik ve antisenesentik etkilerinin yanı sıra bu şaperon metastaz ve hücre göçünde de majör rol oynar. HSP27'nin hücre göçündeki rolü aktin hücre iskeletiyle etkileşimiyle açıklanır. HSP27'nin periapikal enflamatuvar lezyonlarda ve liken planusta epitel hücrelerinden lokal olarak salındığı gösterilmiştir (Sugerman PB ve ark., 1995; Suzuki T ve ark., 2002; Tavassol F ve ark., 2008). İyileşmekte olan yara dokusu, özefajit ve bazı deri lezyonlarında da HSP27 ekspresyonu artış göstermektedir. Bu durum HSP27'nin yüksek ekspresyonunun enflamatuvar stresli durumlara karşı koruyucu fonksiyon gösterebileceğini işaret etmektedir (Tavassol F ve ark., 2008). HSP27'nin ekspresyonu malign veya preneoplastik lezyonların malign

transformasyonu ile ilişkilidir, fakat bu ekspresyon düzeyi hücre tipleri ve dokular arasında farklılık göstermektedir (Sugerman PB ve ark., 1995; Ciocca DR ve Calderwood SK, 2005). Leonardi ve arkadaşları (Leonardi R ve ark., 2002) HSP27 ekspresyonunun normal ve enflamatuvar oral mukoza epitelinde artış gösterdiğini ancak oral displazide bu ekspresyonun çok düşük seviyelerde tespit edildiğini bildirmişlerdir. Oral skuamöz hücreli karsinomada ise HSP27 ekspresyonunun zayıf diferansiye alanlarda düşük, iyi diferansiye alanlarda yüksek düzeyde bulunduğunu belirtmişlerdir. Displazide HSP27'nin düşük ekspresyonu, bu dokuları mutajenik etkilere karşı daha hassas hale getiriyor olabilir ve bu durum epitelyal displazinin skuamöz hücreli karsinomaya transformasyonu olasılığını yükseltebilir. Bu nedenle özefagusun skuamöz epitelinde olduğu gibi oral mukozada da HSP27'nin bolca bulunması, oral mukozayı çeşitli zararlı faktörlere karşı koruyan hücresel mekanizma olabilir. Sonuç olarak, bu proteinin ekspresyon düzeyi malign transformasyon için erken uyarıcı olabilir (Leonardi R ve ark., 2002). Yüksek HSP27 düzeyinin, meme kanseri ve over kanserlerinde kötü prognozla ve kemoterapi rezistansı ile alakalı olduğuna dair çalışmalar vardır (Mese H ve ark., 2002).

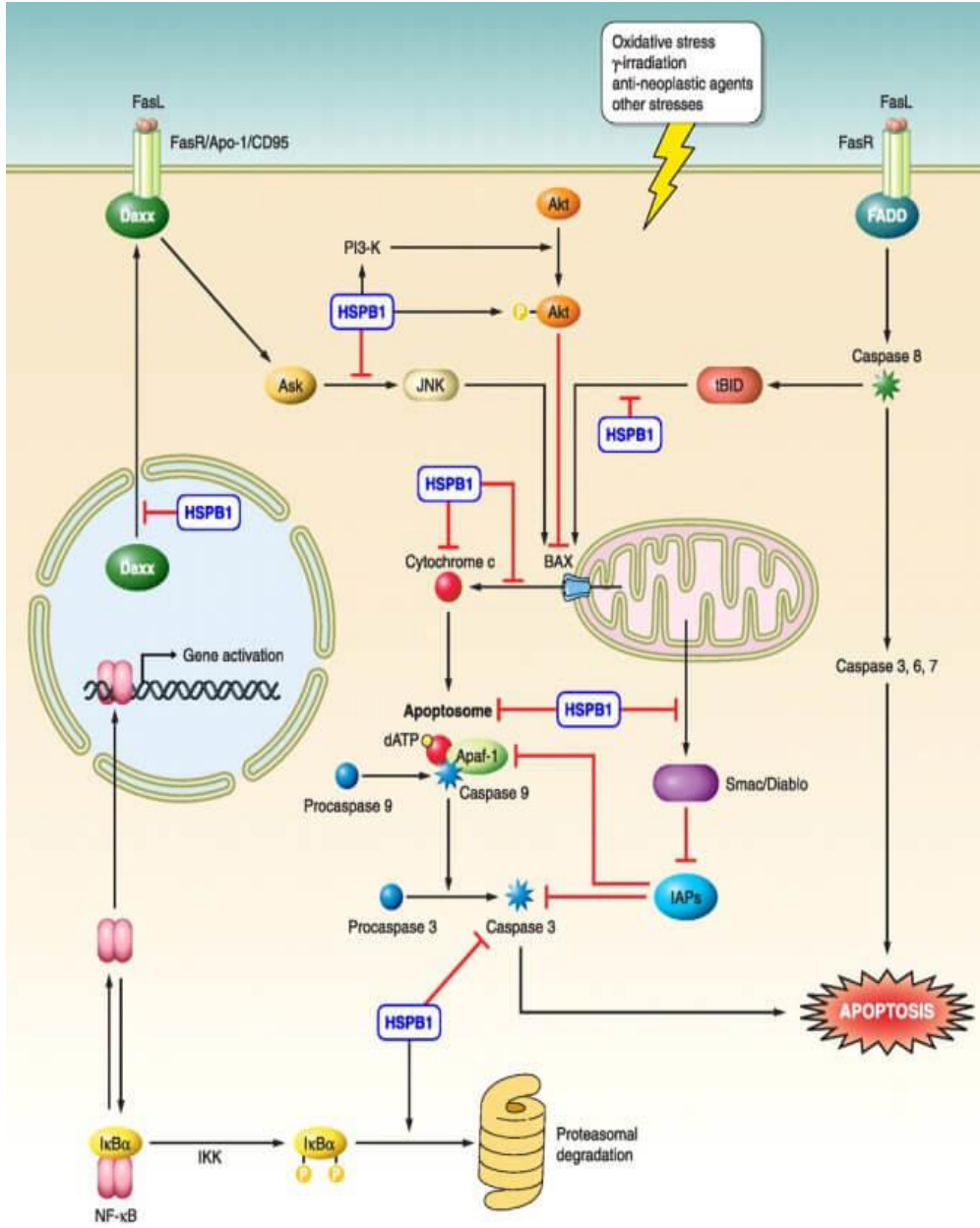
2.3.2. Apoptoz, HSP27 ve Erkek İnfertilitesinin Birlikte Değerlendirilmesi

Apoptozun spermatogenezde iki rolü vardır; birincisi germ hücre popülasyonunu Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıya indirilmesi ve ikincisi anormal spermatozoaların seçilerek yok edilmesidir. Yaşam boyu apoptozis ile yaşlanmış, enfekte, hasarlı veya mutasyona uğramış hücreler seçilerek yok edilmektedir. Normal şartlarda erkek potansiyel germ hücrelerinin yaklaşık yarısı spermatogonia ve spermatosit aşamasında yitirilmektedir. Apoptoz esnasında hücreler küçülür, hücre zarı parçalanır, hücre iskeleti tekrar düzenlenir, nükleer yoğunlaşma ve intranükleosomal DNA fragmentasyonu oluşur. DNA hasarı ve parçalanması, apoptotik hücre ölümünü yansıtan en iyi biyokimyasal markerdir ve teşhis amaçlı kullanılmaktadır (Kaufmann SH ve Hengartner MO, 2001) (Şekil 19).



Şekil 19. Erkek üreme sistemi üzerindeki apoptotik sistem(Mathur ve Cynthia, 2011)

Isı şok proteinleri kaspaz aktivasyonunu inhibe ederek apoptozu bloke edebilirler. HSP27, HSP70, HSP60 ve HSP90'ın aşırı sentezlenmesi apoptozu engelleyebilir. Farklı hücre modellerinde HSP'lerin yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini engellediği ve serbest radikaller ile DNA hasarına neden olan hücresel stres durumlarında apoptozu inhibe ettikleri gösterilmiştir. (Lanneau D ve ark., 2008) Bunun aksine HSP27, HSP70, HSP60 ve HSP90'ın yeterli düzeyde sentezlenmemesi hücrelerin apoptotik uyarılara duyarlılığını artırır. Bazı hücrelerde HSP70 kaybı herhangi bir ek stres faktörü olmaksızın kaspaz-3 aktivasyonu ile başlatılan apoptotik süreç için yeterlidir. Böylece HSP'ler doğrudan ya da dolaylı olarak kaspaz aktivasyonunun modülasyonu ile apoptozda görev almaktadır. HSP'ler intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolları, üç noktada anahtar proteinlerle etkileşime girerek bloke edebilir (Lanneau D ve ark., 2008). Bu noktalar; mitokondriden önceki süreçte sinyal yollarının düzenlenmesi, mitokondride gerçekleşen apoptojenik moleküllerin salınmasının kontrolü, post mitokondriyal süreçte apoptozom oluşumunun kontrolüdür (Lanneau D ve ark., 2008). Küçük HSP'ler, en çok da HSP27, şaperon aktivitesine ek olarak bir dizi fonksiyon sergiler. Kaspaz aktivasyonuna müdahale eder (Charette SJ ve ark., 2000). Oksidatif stresi modüle eder (Mehlen P ve ark., 1996). Hücre iskeletini düzenler. Oksidatif stres altında sitokrom c salınımını inhibe ederek antiapoptotik etki gösterir. HSP'lerin apoptozu engelleme yetenekleri, çeşitli antikanser ilaçlar ve diğer uyarılar tarafından indüklenir ve kanser terapisinin etkinliğini sınırlandırabilir (Jaattela M., 1999). Apoptoz, fizyolojik bir süreçtir, fakat aşırıya kaçması durumunda sperm sayısında azalma ve infertiliteye neden olabilmektedir. Bu durum toksik kimyasallara ya da radyasyona maruziyet sonucunda da meydana gelmektedir (Paasch U ve ark., 2004). Spesifik kaspaz proteinazları (cysteinyll aspartate-specific proteinases), apoptoz regülasyonunda önemli fonksiyona sahiptir. Seminifer tübül epitelinde inaktif proenzimler olarak eksprese edilen ve proapoptotik sinyallerle aktive olan birçok proteinazın varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan kaspaz-3 en önemlisidir. Kaspazlar tarafından aktive edilen DNAaz'lar DNA fragmentasyonundan sorumludur. Bcl-2 ailesi proteinleri (bcl-x, bcl-w, bax, bak, bid, bad), tümör süpresör p53 proteini, nükleer faktör kappaB ve ısı şok proteinlerinin (HSP) apoptozu düzenlemede görevli oldukları gösterilmiştir (Paasch U ve ark., 2004)



Şekil 20. Apoptozun HSP27 ile düzenlenmesi (Mymrikov, E. V ve ark, 2011)

HSP27, sırasıyla küçük veya büyük oligomerik formunun sitokrom C veya ölüm alanı ile ilişkili proteine (DAXX) bağlanması yoluyla hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolları inhibe eder. HSP27, BH3 etkileşen alan ölüm agonisti (BID) tarafından aktive edilen Bcl-2 ile ilişkili X proteininin (BAX) aktivitesine bağlı olarak kaspaz 9'u inhibe eder. HSP27 ayrıca protein kinaz C delta tipi (PKC δ) ile etkileşime girer ve kanser

tedavisine direnç gösterir. Ayrıca, β hücreleri inhibitörü, alfa ($\text{Ik}\beta\alpha$) içinde HSP27 ve nükleer faktör kappa hafif polipeptid gen arttırıcı arasındaki etkileşim, aktif β hücrelerinin ($\text{NFk}\beta$) nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısının aktivasyonunda rol oynar (Parcellier A ve ark., 2003). Hücre iskeleti bütünlüğünü korumak için zorunlu olan ve hücre sağ kalımını desteklemeye yardımcı olabilecek mikrotübül aktin proteini ile etkileşime girebilir (Choi S K ve ark., 2019) (Şekil 20). 2008 yılında yapılan bir çalışmada HSP27 ekspresyonu, immüno Floresan yöntemleri kullanılarak 30 insan testiküler biyopsi örneğinde (normal spermatogenez, olgunlaşma arresti ve only-Sertoli cell sendromu, her biri 10 vaka) incelenmiştir (Adly M A ve ark., 2008). Biyopsiler infertilite araştırması yapılan hastalardan elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar; normal spermatogenez gösteren insan testislerinin seminifer epiteli hücre tipine özgü HSP27 ekspresyonuna sahip olduğunu, Sertoli hücreleri, spermatogonia ve Leydig hücrelerinin sitoplazmasında HSP27 ekspresyonunun kuvvetli olduğunu göstermiştir. Olgunlaşma arresti gösteren testislerde, HSP27 ekspresyonu Sertoli hücrelerinde kuvvetli, spermatogoniada zayıf çıkmıştır. Sertoli hücrelerinde HSP27 ekspresyonu kuvvetli gözlenmiş ancak spermatidlerde ve Leydig hücrelerinde hiç tespit edilememiştir (Adly M A ve ark., 2008).

Hatalı genetik bilginin embriyoya geçmesini engelleyen son basamak apoptozdur. Spermatozoa apoptozu, erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicisidir.

HSP27 testis gelişimi ve spermatogenezin regülasyonunda önemli bir işleve sahiptir, ancak HSP27 ile infertilite üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte idiyopatik erkek infertilitesi dünya çapında büyük ve güncel bir problemdir ve tedavisi için yapılan çalışmalar henüz yeterli bir düzeye ulaşamamıştır.

3. MATERYAL-METOT

3.1 Materyal

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu B.30. 2. ODM.0.20.08/488 nolu izni ile gerçekleştirilmiştir (Ek 3).

3.1.1. Hastaların Seçimi

Yapılan tez çalışmasına Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Polikliniğine başvuran idiyopatik infertilite tanısı alan oligoastenoteratozoospermik (OAT) erkekler dâhil edildi. OAT tanısı, üroloji kliniğinde yer alan androloji laboratuvarında yapılan semen analiziyle konuldu. Literatür taramaları dikkate alınarak yapılan güç analizi hesaplamasına göre (%95 güven ve %99,5 test gücü), çalışmaya yaşları 20-50 arasında değişen 20 hasta ve 20 sağlıklı (kontrol grubu) erkekler dâhil edildi. Kontrol grubuna son 2 yılda doğal yolla çocuk sahibi olan fertil bireyler katıldı. Çalışmaya dahil olan her gönüllüye çalışma hakkında bilgi verilerek etik kurul tarafından onaylanan “Gönüllü Olur Formu” imzalatıldı (Ek 1). Muayene ve yapılan testler sonucunda genetik bozukluklar, hormonal bozukluklar, varikosel, kriptorşidizm, lökositospermi ve diğer ürogenital enfeksiyonlar, obstrüktif bozukluklar, testiküler kanser, kanser kemoterapisi öyküsü ve testiküler travma teşhisi konulan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

3.1.2. Örneklerin Hazırlanması

Yapılan çalışma için hastalardan ve kontrollerden 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası steril semen toplama kaplarına ejakülatlar toplanarak semen analizi yapıldı. Analizden hemen sonra toplama kabındaki örnekler önceden etiketlenmiş 15 ml’lik tüplere aktarıldı ve 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Seminal plazmayı içeren süpernatant kısmı alikotlanarak 1,5 ml’lik tüplere aktarıldı. Pellet ve süpernatant tüpleri deney aşamasına kadar -80°C’de saklandı.

3.1.3.ELISA Kitinin Özellikleri

Bu çalışma için temin edilen ELISA kiti (SunREd, Katalog no: 201-12-1787), insanda çalışılan örneklerde HSP27 konsantrasyonunun serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılardaki in vitro kantitatif tayininde kullanılmaktadır. Kitin hassasiyeti 0,314 ng/ml, okuma aralığı 0,5-100 ng/ml'dir. Kit, Sandviç Elisa Metodu prensibi ile çalışılır.

3.1.4.Kullanılan Diğer Materyaller

Mikropipet (Finnpipette, Thermo Fisher) (Şekil 22)

Steril Santrifüj tüpleri (1,5 mL ve 2 mL)

Steril Santrifüj tüpleri (15 mL ve 50 mL)

Steril Tek kullanımlık pipet uçları

Steril distile su

Emici kâğıt

37°C inkübatör (Dedeoğlu)

Santrifüj cihazı (Sanyo, MSE)

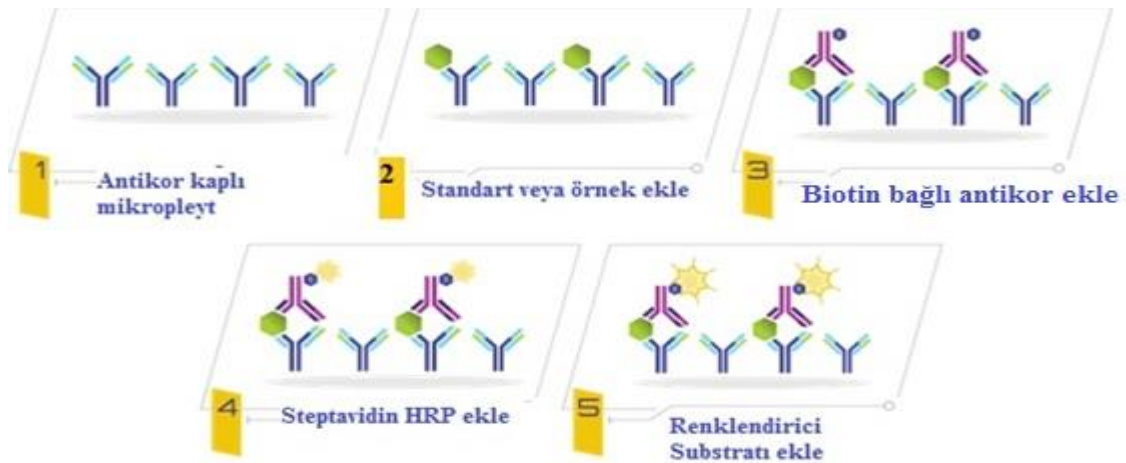
Vorteks (Vtelp, ZX3)

Otoklav (Nüve, OT-4060)

Mikroplaka spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher, Multiskan Go)

3.2. Metot

Deney Protokolü



Şekil 21.HSP27 ELISA kiti reaksiyon aşamalarının şematik gösterimi

(<https://www.raybiotech.com/sandwich-elisa-kits>' dan uyarlanmıştır).

Öncelikle aşağıda tabloda tarif edildiği şekilde referans standart solüsyonları dilüe edilerek hazırlandı. (Tablo 6)

Tablo 6. Referans standart solüsyon hazırlanması

Kuyu	Rekombinant HSP27 konsantrasyonu	Numara	Solüsyon İçeriği
A1	64 ng/ml	Standart No: 7	120 µl orijinal Standart+120 µl Standart Dilüents
B1	32 ng/ml	Standart No: 6	120 µl Standart 7+ 120 µl Standart Dilüents
C1	16 ng/ml	Standart No: 5	120 µl Standart 6 + 120 µl Standart Dilüents
D1	8 ng/ml	Standart No: 4	120 µl Standart 5+ 120 µl Standart Dilüents
E1	4 ng/ml	Standart No: 3	120 µl Standart 4 + 120 µl Standart Dilüents
F1	2 ng/ml	Standart No: 2	120 µl Standart 3 + 120 µl Standart Dilüents
G1	1 ng/ml	Standart No:1	120 µl Standart 2 + 120 µl Standart Dilüents
H1	0 ng/ml (KÖR)	Standart No:0	120 µl Standart Dilüents

Tablo 6'ya göre hazırlanan standart solüsyonlardan ELISA plakanın bir nolu kuyularına (ilk sütun) sırasıyla 50 µl konuldu.

Diğer kuyulara hasta ve kontrollerin seminal plazma örnekleri 40'ar µl olacak şekilde eklendi. Daha önce tez danışmanının yürüttüğü OAT sendromlu hastalarda seminal plazma GRP78 düzeyinin araştırıldığı tez çalışmasında yapılan optimizasyonlara dayanılarak, 2X dilüsyonun kitin lineer aralığına denk düşülmesi için uygun olacağı öngörüldü. Kitin kendi protokolü gereği yapılan dilüsyon (100 µl son hacim içinde 40 µl örnek) bu rakama çok yakın olduğundan kitin protokolüne aynen uyulmasına karar verildi.

Ardından standart solüsyonların haricindeki diğer tüm kuyulara Biotin-HSP27 antikorlu içeren solüsyondan 10 µl eklendi (Şekil 21).

Sonra her kuyuya 50 µl Streptavidin-HRP (Horseradish peroksidaz) konjugat (yabanturpu peroksidaz enzimi) reaktifi eklendi. Plaka kapatıcı ile örnekler kapatılarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Bu sırada 30X yıkama solüsyonundan 1X final yıkama solüsyonu hazırlandı. 43,5 ml distile suyun içerisine 1,5 ml yıkama solüsyonu eklenip karıştırıldı.

İnkübasyon sonrası tüm kuyular aspire edildi ve her kuyuya 100 µl yıkama solüsyonu eklendi. Tüm kuyular aspire edildi. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlandı.

Yıkamaların ardından her kuyuya önce Chromogen A'dan 50 µl, sonra yine her kuyuya Chromogen B'den 50 µl eklendi. Plakanın üzeri kapatıcı ile kapatılarak tam 10 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından renk değişikliğini gözlemlemek için durdurma solüsyonundan 50 µl eklendi. Mavi renk sarıya dönüştü (Şekil 24).

Deneyin son aşaması olarak Mikroplaka, spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda okunarak OD (optical density) değerleri elde edildi.

ELISA metoduyla referans standardın absorbans değerleri dikkate alınarak standart eğri grafikleri hazırlandı. Bu grafikler yardımıyla hasta ve kontrollerin seminal plazmasındaki HSP27 protein konsantrasyonları hesaplandı. Hesaplanan veriler istatistiksel anlamlılıkları açısından yorumlandı.



Şekil22. Thermo Fisher, Multiskan Go (Multiplaka spektrofotometre cihazı)

3.2.1. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçlar SPSS 21 programında analiz edildi. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile incelendi. En az bir grupta normal dağılıma uymayan değişkenlerin farklı gruplarda karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. En az biri normal dağılmayan değişkenler arasındaki ilişki için Spearman's korelasyon analizi kullanıldı. 0,05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Normal dağılıma uygunluk testi

Shapiro-Wilk testi sonuçlarına göre her bir değişken için en az bir grupta p değerinin 0,05 den küçük olması değişkenlerin normal dağılmadığı şeklinde yorumlandı.

Normal dağılıma uymayan değişkenler: HSP27, hacim, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, motilite, morfoloji.

4. BULGULAR

Semen Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yapılan tez çalışmasına Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Polikliniğine başvuran yaşları 20-50 arasında değişen 20 OAT sendromlu erkek bireyler dâhil edildi. Kontrol grubuna ise ± 5 yaş uyumlu son 2 yılda doğal yolla çocuk sahibi olmuş 20 fertil erkek birey katıldı. Hastaların yaş ortalaması, semen hacmi, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, sperm vitalitesi, sperm motilitesi ve sperm morfolojisi değerleri idiyopatik infertil bireyler ile kontroller arasında karşılaştırıldı. Spermiyogram testi protokolüne uygun olarak gerçekleştirilen analizler sonucunda fertil ve infertil bireylerden elde edilen demografik özellikler ve laboratuvar sonuçları Tablo 7 ve 8’de gösterilmektedir.

Tablo 7. Kontrol gruplarının demografik ve laboratuvar bulguları (OK: Kontrol grubu)

KOD	Yaş	Hacim (ml)	Konsantrasyonu ($\times 10^6/\text{mL}$)	Total Sperm Sayısı ($\times 10^6/\text{mL}$)	Motilite %	Morfoloji (%)
OK1	26	2,5	32	80	55	4
OK2	26	2	40	80	55	6
OK3	25	2	21	42	45	8
OK4	28	4	45	180	58	6
OK5	31	2,5	30	75	55	6
OK6	39	3	52	156	55	5
OK7	28	2	90	180	56	6
OK8	25	2	40	80	65	8
OK9	26	4	16	64	45	6
OK10	39	2	32	64	55	8
OK11	25	3	52	156	61	10
OK12	28	2,5	32	80	57	6
OK13	40	2	32	64	45	5
OK14	37	3	30	90	55	6
OK15	26	3	27	81	65	7
OK16	24	3	42	126	55	6
OK17	25	2	21	42	41	6
OK18	27	2	23	46	41	8
OK19	33	4	18	72	61	8
OK20	35	2	25	50	50	8

Tablo 8. İdiyopatik infertil erkeklerin demografik ve laboratuvar bulguları (OAT: OAT bireyler)

KOD	Yaş	Hacim (ml)	Konsantrasyonu (x10 ⁶ /mL)	Total Sperm		Motilite %	Morfoloji (%)	Vitalite
				Sayısı (x10 ⁶ /mL)				
OAT1	37	2	6	12		30	1	57
OAT2	32	2	10	20		15	1	36
OAT3	32	4	8	32		25	1	45
OAT4	29	4	5	20		25	3	45
OAT5	30	2	12	24		4	3	20
OAT6	22	4	7	28		20	3	40
OAT7	31	3	8	24		30	2	55
OAT8	35	2	10	20		30	1	50
OAT9	42	3	11	33		10	2	32
OAT10	31	4	5	20		15	2	34
OAT11	18	2	6	12		30	3	50
OAT12	33	2	9	18		15	2	35
OAT13	27	2	5	10		20	3	40
OAT14	48	3	12	36		17	2	35
OAT15	24	3	12	36		15	1	35
OAT16	27	3	8	24		10	1	30
OAT17	37	3	8	24		10	3	30
OAT18	26	4	6	24		13	1	32
OAT19	32	2	8	16		10	2	25
OAT20	38	2	10	20		10	2	28

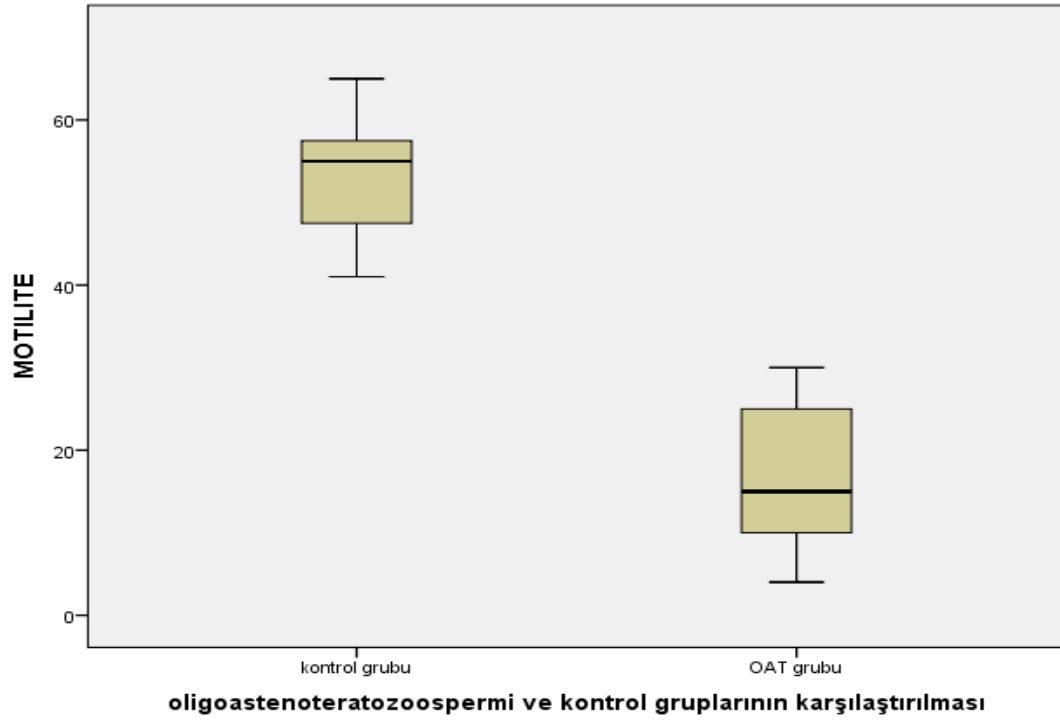
Çalışmaya katılan hastalardan alınan semen volümü 2-4 ml arasındaydı. Ayrıca sperm konsantrasyonu 5 milyon/mL'nin altında olan hastalar şiddetli OAT sendromu olarak tanımlandığı için çalışmaya dâhil edilmedi. Kontrol ve hastalara ait semen analizi değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları, minimum ve maksimum değerleri ve istatistiksel anlamlılık (p değerleri) Tablo 9'da verilmiştir.

Grupların yaş ortalaması ve ortalama semen hacmi istatistiksel olarak birbirinden farklı değildi (p=0,265 ve p=0,602). Buna karşılık konsantrasyon, total sperm sayısı, motilite ve morfoloji seviyeleri için kontrol grubu ve OAT grubu arasında beklendiği üzere anlamlı farklar bulundu (p<0,05) (Tablo 9).

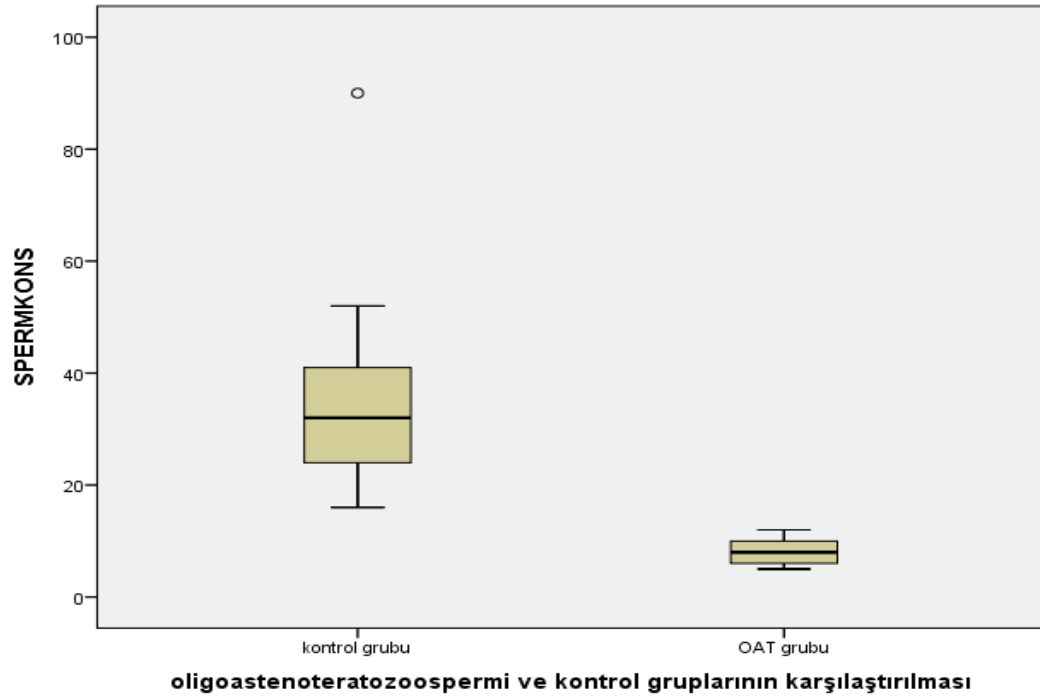
Tablo 9. Çalışmaya dâhil edilen kontrol (K) ve hastalara (OAT) ait semen analizi değerlerinin istatistiksel analizi (*p<0,05)

Parametreler	Kontrol (OK) (n=20) (Ort±SD)	OAT (n=20) (Ort±SD)	P Değeri
Yaş	29,65±5,45 (24-40)	31,55±6,92 (18-48)	0,265
Hacim (mL.)	2,63 ±0,72 (2-4)	2,80±0,83 (2-4)	0,602
Konsantrasyon (1 mL'deki sperm sayısı)	35 ±16,60 (16-90)	8,30±2,39 (5-12)	0,000*
Total Sperm Sayısı (Volüm x Konsantrasyon)	90,40 ±44,37 (42-80)	22,65±7,53 (10-36)	0,000*
Motilite	53,75 ±7,15 (41-65)	17,70±8,14 (4-30)	0,000*
Morfoloji (%)	6,65± 1,42 (4-10)	1,95±0,83 (1-3)	0,000*

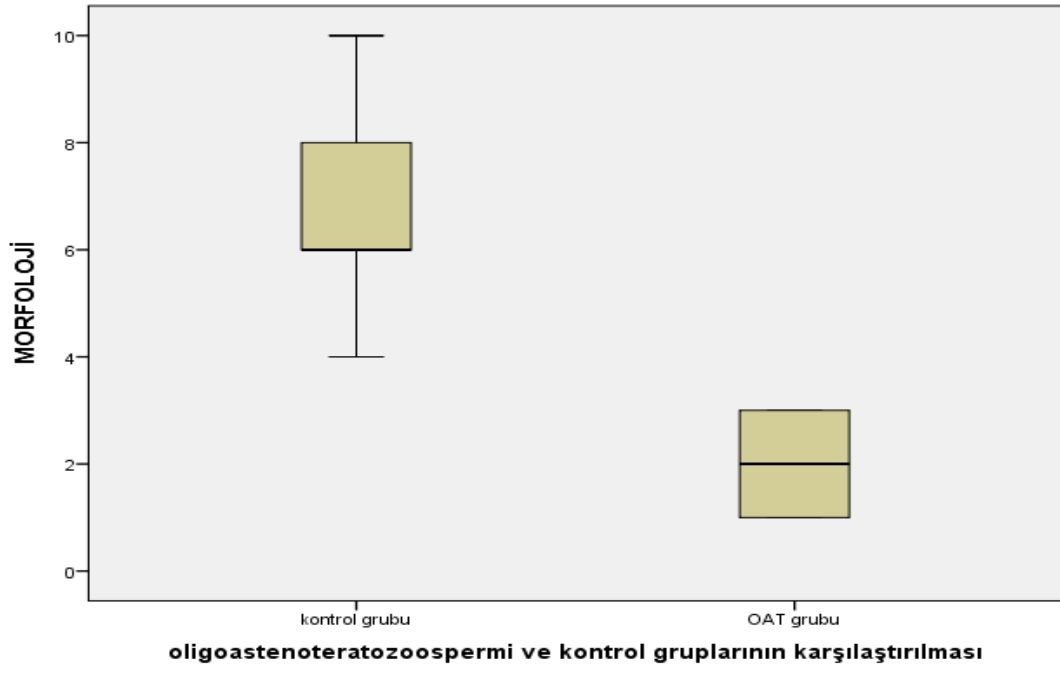
Kontrol ve OAT grubu analiz tablosuna ait verilerde anlamlı farklılık olan parametreler için çizilen grafikler aşağıda verilmiştir. Tüm grafiklerde analiz edilen değerlerin ortalaması kutu içi çizgi ile belirtilmiştir.



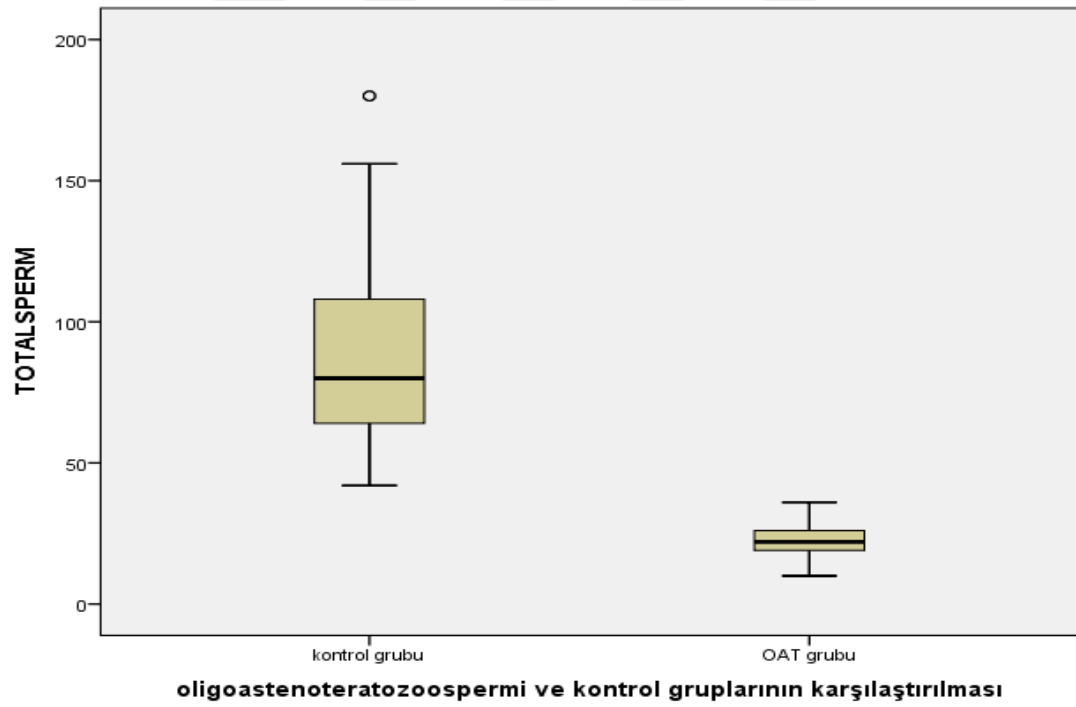
Şekil 23. Motilite yüzdesi ortalamasının OAT grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 24. Sperm konsantrasyonları ortalamasının OAT grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırılması



Şekil 25. Morfoloji yüzdesi ortalamasının OAT grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırılması



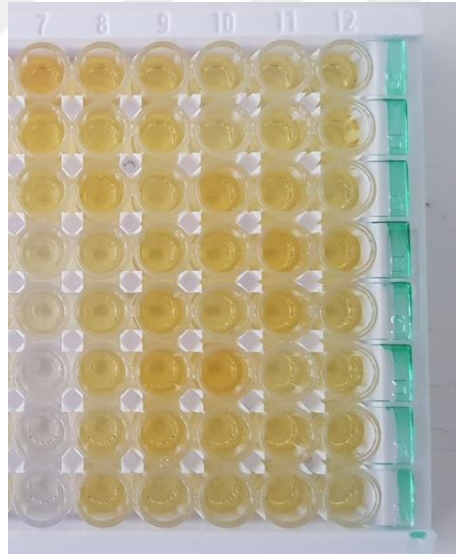
Şekil 26. Total sperm sayısının OAT grubu ve kontrol grubu karşılaştırılması

ELİSA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tüm örneklere iki farklı günde okuma yapıldı. Sandviç ELISA yöntemi ile incelenen fertil ve infertil bireylere ait toplam 40 örnekteki HSP27 tayini sonuçlarının plaka görüntüsü Şekil 27’de gösterildi. Çalışılan plakanın örnek koyma sıralaması Tablo 10’da gösterildi.

Tablo 10. Örneklerin ELISA plakası üzerindeki sıralaması (A1-H1: Referans Standardın bulunduğu sütun ng/ml cinsinden verilmiştir. OK: Kontrol grubuna, OAT: Hasta grubuna ait örneklerin sıralaması)

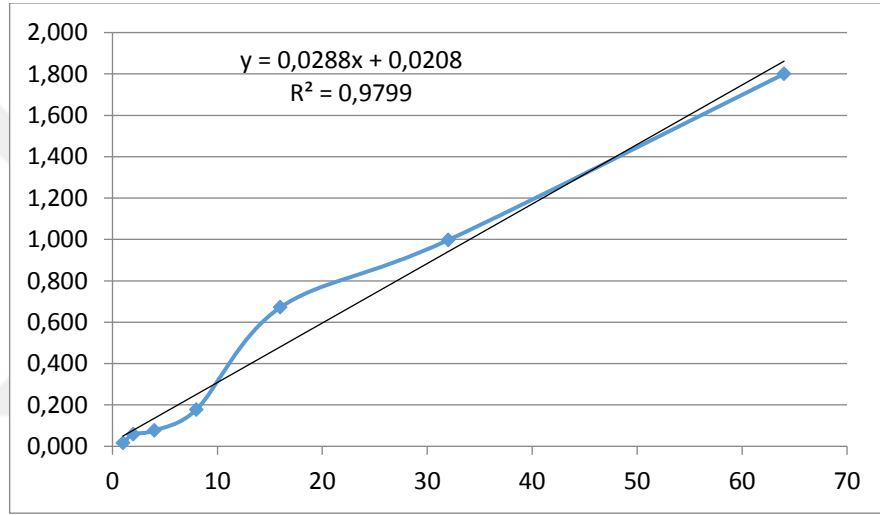
	7	8	9	10	11	12
A	64	OK1	OK9	OK17	OAT5	OAT13
B	32	OK2	OK10	OK18	OAT6	OAT14
C	16	OK3	OK11	OK19	OAT7	OAT15
D	8	OK4	OK12	OK20	OAT8	OAT16
E	4	OK5	OK13	OAT1	OAT9	OAT17
F	2	OK6	OK14	OAT2	OAT10	OAT18
G	1	OK7	OK15	OAT3	OAT11	OAT19
H	0	OK8	OK16	OAT4	OAT12	OAT20



Şekil 27. Tüm örneklerin ikinci ölçüm ELİSA testi sonucu görüntüsü

Tablo 11.Birinci ölçüm için standart eğri formülü kullanılarak hesaplanan HSP27 konsantrasyonları

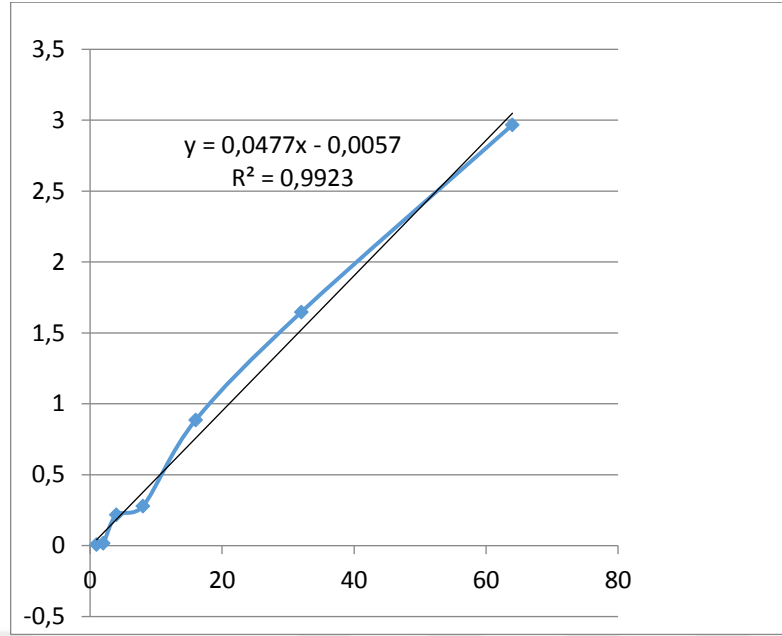
	1	2	3	4	5	6
A	62	40,04	79,80	23,52	20,21	25,05
B	34	28,76	35,88	34,03	24,57	15,05
C	23	50,81	25,69	30,14	28,17	21,85
D	5	38,76	20,10	28,82	30,27	23,30
E	2	31,29	28,82	29,08	30,00	20,72
F	1	29,80	28,19	24,10	15,72	24,92
G	0	30,91	32,67	25,03	20,83	15,52
H	0	32,15	24,43	29,80	17,72	20,77



Şekil 28. Birinci ölçüm sonrası HSP27 proteini için seri dilüsyonlarla elde edilen standart eğri

Tablo 12.İkinci ölçüm için standart eğri formülü kullanılarak hesaplanan HSP27 konsantrasyonları

	7	8	9	10	11	12
A	62	36,26	30,04	19,30	15,29	20,30
B	35	22,03	24,75	13,06	18,91	22,38
C	19	30,06	16,47	34,82	25,47	15,84
D	6	12,43	21,31	27,18	39,32	28,46
E	5	13,34	28,63	17,43	34,00	18,34
F	0	15,93	37,25	50,50	13,88	20,20
G	0	14,71	29,51	21,67	21,55	20,88
H	0	21,63	15,49	18,99	21,15	13,25



Şekil 29. İkinci ölçüm sonrası HSP27 proteini için seri dilüsyonlarla elde edilen standart eğri

Tablo 13. Kontrol grubunda her iki ölçüm sonucu hesaplanan HSP27 konsantrasyonları (ng/mL), ortalamaları ve standart sapmaları (OK: Kontrol)

KOD	1.ÖLÇÜM	2.ÖLÇÜM	ORTALAMA	STANDART SAPMA
K1	40,04	36,26	38,15	2,67
K2	28,76	22,03	25,39	4,76
K3	50,81	30,06	40,43	14,67
K4	38,76	12,43	25,59	18,61
K5	31,29	13,34	22,31	12,70
K6	29,80	15,93	22,86	9,81
K7	30,91	14,71	22,81	11,45
K8	32,15	21,63	26,89	7,44
K9	79,80	30,04	54,92	35,19
K10	35,88	24,75	30,31	7,86
K11	25,69	16,47	21,08	6,52
K12	20,10	21,31	20,71	0,86
K13	28,82	28,63	28,73	0,14
K14	28,19	37,25	32,72	6,40
K15	32,67	29,51	31,09	2,23
K16	24,43	15,49	19,96	6,32
K17	23,52	19,30	21,41	2,99
K18	34,03	13,06	23,55	14,83
K19	30,14	34,82	32,48	3,31
K20	28,82	27,18	28,00	1,16

Tablo 14. OAT grubunda her iki ölçüm sonucu hesaplanan gerçek HSP27 konsantrasyonları (ng/mL), ortalamaları ve standart sapmaları (OAT: Hasta)

KOD	1.ÖLÇÜM	2.ÖLÇÜM	ORTALAMA	STANDART SAPMA
OAT1	29,08	17,43	23,25	8,24
OAT2	24,10	50,50	37,30	18,66
OAT3	25,03	21,67	23,35	2,37
OAT4	29,80	18,99	24,39	7,64
OAT5	20,21	15,29	17,75	3,48
OAT6	24,57	18,91	21,74	4,00
OAT7	28,17	25,47	26,82	1,91
OAT8	30,27	39,32	34,80	6,40
OAT9	30,00	34,00	32,00	2,83
OAT10	15,72	13,88	14,80	1,30
OAT11	20,83	21,55	21,19	0,50
OAT12	17,72	21,15	19,43	2,42
OAT13	25,05	20,30	22,67	3,36
OAT14	15,05	22,38	18,71	5,19
OAT15	21,85	15,84	18,84	4,25
OAT16	23,30	28,46	25,88	3,65
OAT17	20,72	18,34	19,53	1,68
OAT18	24,92	20,20	22,56	3,34
OAT19	15,52	20,88	18,20	3,79
OAT20	20,77	13,25	17,01	5,32

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile incelendi. En az bir grupta normal dağılıma uymayan değişkenlerin farklı gruplarda karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Tablo 15.Normal dağılıma uygunluk testi sonuç tablosu

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
HACİM	Kontrol Grubu	,256	20	,001	,792	20	,001
	OAT Grubu	,281	20	,000	,778	20	,000
YAŞ	Kontrol Grubu	,269	20	,001	,821	20	,002
	OAT Grubu	,124	20	,200*	,981	20	,950
SPERMKONS	Kontrol Grubu	,222	20	,011	,823	20	,002
	OAT Grubu	,150	20	,200*	,921	20	,103
TOTALSPERM	Kontrol Grubu	,284	20	,000	,832	20	,003
	OAT Grubu	,179	20	,093	,943	20	,277
MOTİLİTE	Kontrol Grubu	,269	20	,001	,910	20	,063
	OAT Grubu	,180	20	,089	,903	20	,047
MORFOLOJİ	Kontrol Grubu	,276	20	,000	,893	20	,031
	OAT Grubu	,225	20	,009	,803	20	,001
HSP27	Kontrol Grubu	,158	20	,200*	,832	20	,003
	OAT Grubu	,177	20	,100	,897	20	,036
VİTALİTE	OAT Grubu	,168	20	,142	,960	20	,542

Shapiro-Wilk testi sonuçlarına göre sadece vitalitenin p değeri 0,05’den büyük olduğundan (0,542) normal dağılıma uymuş, diğer parametreler normal dağılıma uymamıştır.

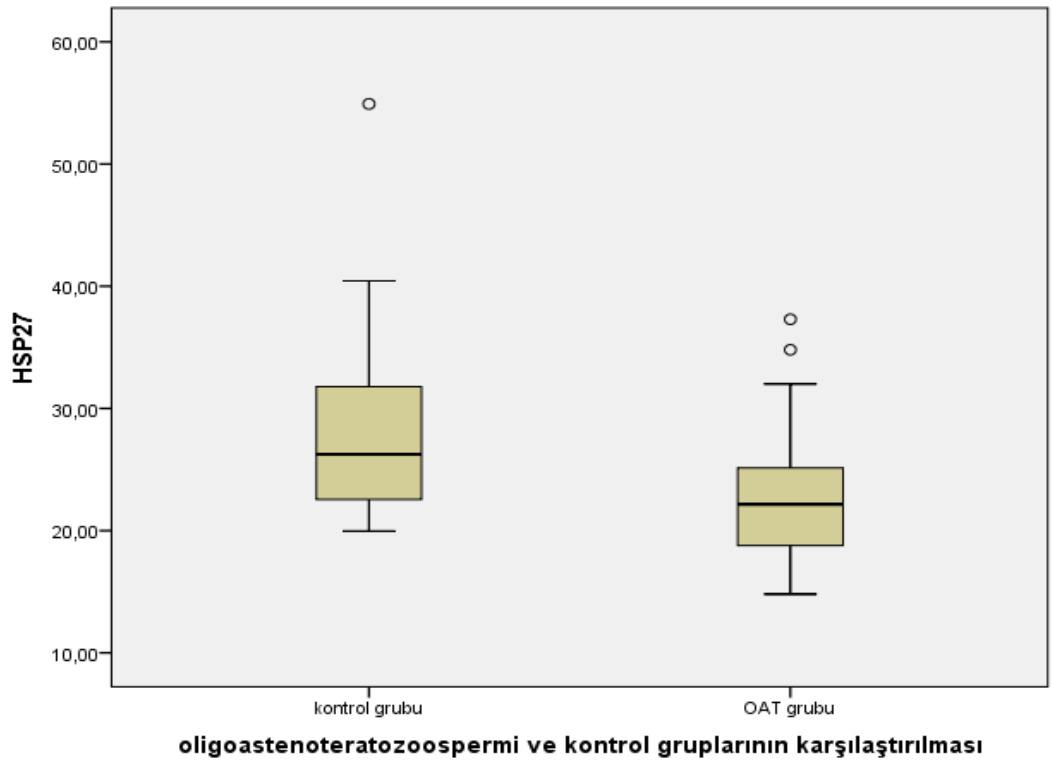
HSP27 değişkeni normal dağılıma uymadığından dolayı gruplar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını göstermek için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

HSP27 değişkeni için gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlendi($p=0,013$)(şekil 30). Seminal plazma HSP27 seviyesi OAT grubunda (23,01 ng/mL) kontrol grubunda (28,47 ng/mL) göre anlamlı olarak daha düşük saptandı (Tablo 16).

Tablo 16. HSP27 değişkeni için kontrol ve OAT grupların karşılaştırılması

HSP27 DEğERLERİ	KONTROL	OAT
ORTALAMA	28,47 ng/ml	23,01 ng/ml
STANDART		
SAPMA	8,47	5,93
ORTANCA	26,24	22,15
MİNİMUM	19,96	14,8
MAKSİMUM	54,92	37,3
ARALIK	34,96	22,5

Gruplar arasında hacim ve yaş değişkenleri arasında anlamlı fark bulunamadı. ($p=0,602$ ve $p=0,265$). Buna karşılık Total Sperm sayısı, Konsantrasyon, Motilite, Morfoloji değerleri arasındaki farklar anlamlı bulundu. ($p<0,05$)



Şekil 30.Seminal plazma HSP27 konsantrasyonu ortalamalarının OAT grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırılması (ng/ml)

En az biri normal dağılıma uymayan değişkenler arasındaki ilişki her bir grupta değerlendirilmek üzere Spearman's korelasyon analizi uygulandı. r =Korelasyon katsayısı, Sig.(2-tailed)= p değeri; olarak isimlendirilir. 0,05 den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

Tablo 17. HSP27 düzeyinin kontrol grubunda diğer semen parametreleri ile korelasyonu

KONTROL GRUBU	Yaş	Hacim (mL)	Konsantrasyon (1 mL'deki sperm sayısı)	Total Sperm Sayısı (Volüm x Konsantrasyon)	Motilite	Morfoloji (%)
r değeri	0,191	0,11	-0,525	-0,326	-0,129	0,048
p değeri	0,419	0,644	0,018	0,16	0,589	0,841

Korelasyon analizi sonuçlarına göre kontrol grubunda;

HSP27 ile Sperm Konsantrasyonu arasında anlamlı negatif yönde orta derecede bir korelasyon saptandı($r=-0,525$, $p=0,018$) (Tablo 17) (Şekil 32).

Hacim ile Total sperm sayısı arasında anlamlı pozitif yönde orta derecede bir korelasyon saptandı($r=0,491$ $p=0,028$).

Motilite ile Total sperm sayısı arasında anlamlı pozitif yönde kuvvetli derecede bir korelasyon saptandı($r=0,691$ $p=0,001$).

Motilite ile Sperm konsantrasyonu arasında anlamlı pozitif yönde orta derecede bir korelasyon saptandı ($r=0,465$ $p=0,039$).

Total Sperm Sayısı ile Sperm konsantrasyonu arasında anlamlı pozitif yönde çok kuvvetli derecede bir korelasyon saptandı($r=0,806$ $p=0,000$)(Tablo 19).

Tablo 18. HSP27 düzeyinin OAT grubunda diğer semen parametreleri ile korelasyonu

OAT GRUBU	Yaş	Hacim (mL)	Konsantrasyon (1 mL'deki sperm sayısı)	Total Sperm Sayısı (Volüm x Konsantrasyon)	Motilite	Morfoloji (%)	Vitalite
r değeri	0,05	0,053	0,07	0,031	0,412	-0,347	0,537
p değeri	0,982	0,824	0,769	0,896	0,071	0,134	0,015

Korelasyon analizi sonuçlarına göre OAT grubunda;

HSP27 ile vitalite arasında anlamlı pozitif yönde orta derecede bir korelasyon saptandı ($r=0,537$ $p=0,015$) (Tablo 18) (Şekil 32).

Hacim ile total sperm sayısı arasında anlamlı pozitif yönde kuvvetli derecede bir korelasyon saptandı.($r=0,608$) $p=0,004$)

Sperm konsantrasyonu ile total sperm sayısı arasında anlamlı pozitif yönde orta derecede bir korelasyon saptandı. ($r=0,542$ $p=0,014$)

Motilite ile vitalite değerleri arasında anlamlı pozitif yönde çok kuvvetli derecede bir korelasyon saptandı. ($r=0,977$ $p=0,000$)(Tablo 20)

Tablo 19.Kontrol grubunda spearman's korelasyon analizi sonuç tablosu

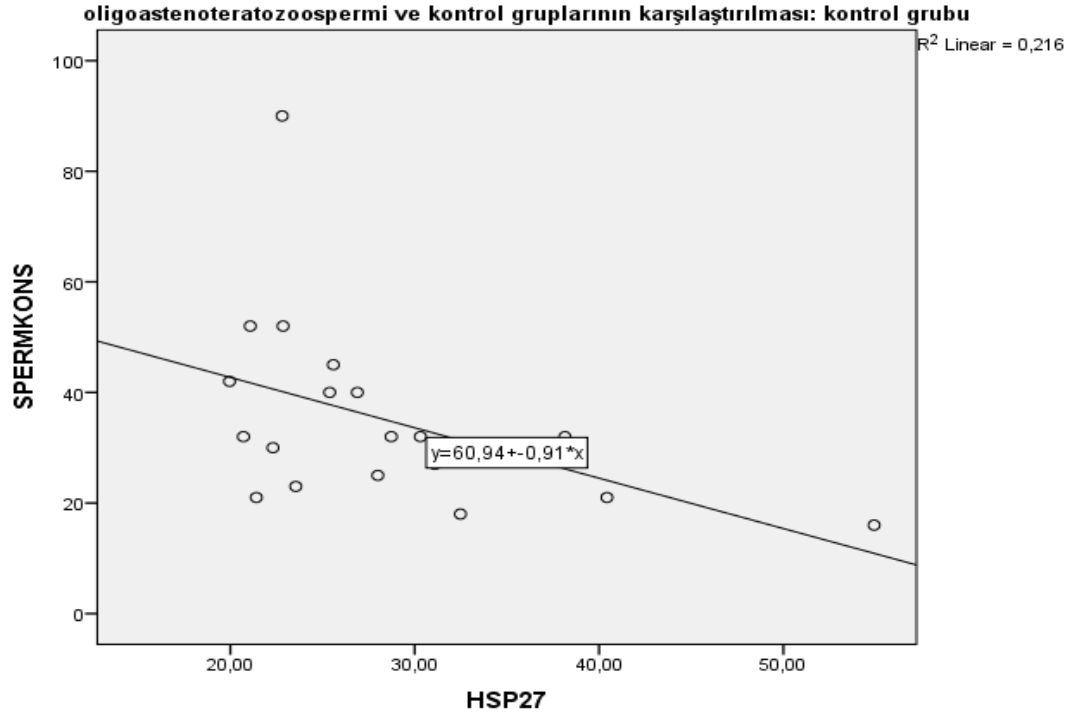
			YAŞ	HACİM	SPERMKONS	TOTALSPERM	MOTILITE	MORFOLOJİ	HSP27
Spearman's rho	YAŞ	Correlation Coefficient	1,000	,006	,019	,002	-,072	-,233	,191
		Sig. (2-tailed)	.	,978	,936	,994	,762	,322	,419
		N	20	20	20	20	20	20	20
	HACİM	Correlation Coefficient	,006	1,000	-,002	,491*	,409	-,141	,110
		Sig. (2-tailed)	,978	.	,995	,028	,074	,553	,644
		N	20	20	20	20	20	20	20
	SPERMKONS	Correlation Coefficient	,019	-,002	1,000	,806**	,465*	-,245	-,525*
		Sig. (2-tailed)	,936	,995	.	,000	,039	,298	,018
		N	20	20	20	20	20	20	20
	TOTALSPERM	Correlation Coefficient	,002	,491*	,806**	1,000	,691**	-,267	-,326
		Sig. (2-tailed)	,994	,028	,000	.	,001	,255	,160
		N	20	20	20	20	20	20	20
	MOTILITE	Correlation Coefficient	-,072	,409	,465*	,691**	1,000	,218	-,129
		Sig. (2-tailed)	,762	,074	,039	,001	.	,357	,589
		N	20	20	20	20	20	20	20
	MORFOLOJİ	Correlation Coefficient	-,233	-,141	-,245	-,267	,218	1,000	,048
		Sig. (2-tailed)	,322	,553	,298	,255	,357	.	,841
		N	20	20	20	20	20	20	20
	HSP27	Correlation Coefficient	,191	,110	-,525*	-,326	-,129	,048	1,000
		Sig. (2-tailed)	,419	,644	,018	,160	,589	,841	.
		N	20	20	20	20	20	20	20

Tablo 20. OAT grubu spearman korelasyon analizi sonuç tablosu

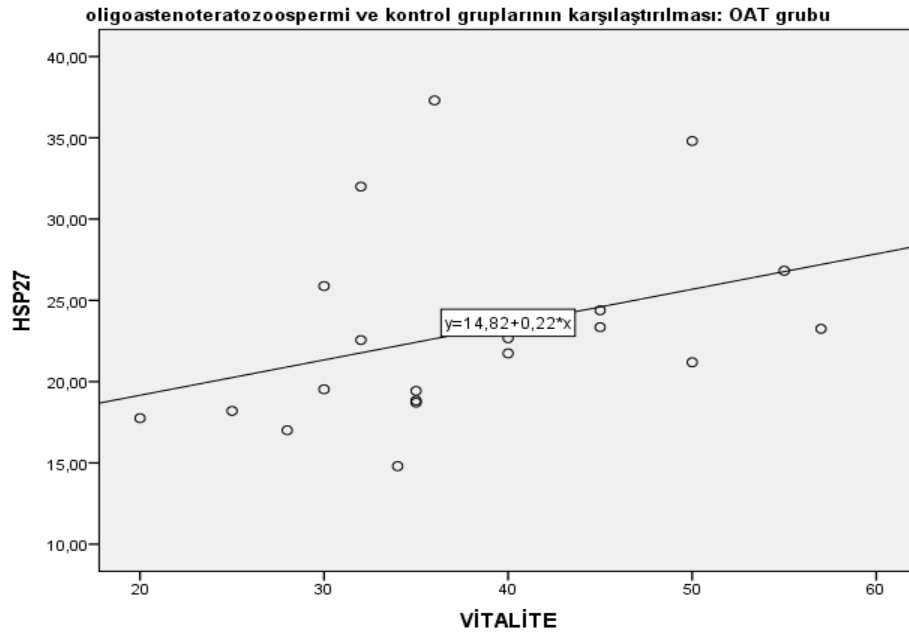
		YAŞ	HSP27	HACİM	SPERMKONS	MORFOLOJİ	VİTALİTE	MOTİLİTE	TOTALSPERM
YAŞ	Correlation Coefficient	1,000	,005	-,251	,435	-,177	-,143	-,163	,
	Sig. (2-tailed)	.	,982	,285	,055	,454	,549	,492	,767
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
HSP27	Correlation Coefficient	,005	1,000	,053	-,070	-,347	,537*	,412	,031
	Sig. (2-tailed)	,982	.	,824	,769	,134	,015	,071	,896
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
HACİM	Correlation Coefficient	-,251	,053	1,000	-,294	-,024	,034	,046	,608**
	Sig. (2-tailed)	,285	,824	.	,209	,919	,888	,848	,004
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
SPERMKONS	Correlation Coefficient	,435	-,070	-,294	1,000	-,251	-,359	-,394	,542*
	Sig. (2-tailed)	,055	,769	,209	.	,285	,120	,085	,014
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
MORFOLOJİ	Correlation Coefficient	-,177	-,347	-,024	-,251	1,000	-,114	-,070	-,185
	Sig. (2-tailed)	,454	,134	,919	,285	.	,632	,768	,435
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
VİTALİTE	Correlation Coefficient	-,143	,537*	,034	-,359	-,114	1,000	,977**	-,220
	Sig. (2-tailed)	,549	,015	,888	,120	,632	.	,000	,350
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
MOTİLİTE	Correlation Coefficient	-,163	,412	,046	-,394	-,070	,977**	1,000	-,249
	Sig. (2-tailed)	,492	,071	,848	,085	,768	,000	.	,290
	N	20	20	20	20	20	20	20	20
TOTALSPERM	Correlation Coefficient	,071	,031	,608**	,542*	-,185	-,220	-,249	1,000
	Sig. (2-tailed)	,767	,896	,004	,014	,435	,350	,290	.
	N	20	20	20	20	20	20	20	20

Tablo 21.Semen parametreleri ile HSP27 protein düzeyinin karşılaştırmalı istatistiği

			YAŞ	HACİM	SPERMKONS	TOTALSPERM	MOTİLİTE	VİTALİTE	MORFOLOJİ	HSP27
Kontrol Grubu	N	Valid	20	20	20	20	20	0	20	20
		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean		29,65	2,625	35	90,4	53,75	0	6,65	28,4695
	Median		27,5	2,5	32	80	55	0	6	26,24
	Std. Deviation		5,451	0,7232	16,604	44,371	7,152	0	1,424	8,47305
	Range		16	2	74	138	24	0	6	34,96
	Minimum		24	2	16	42	41	0	4	19,96
	Maximum		40	4	90	180	65	0	10	54,92
	Percentiles	25	25,25	2	23,5	64	46,25	0	6	22,435
		50	27,5	2,5	32	80	55	0	6	26,24
		75	34,5	3	41,5	117	57,75	0	8	32,1325
OAT Grubu	N	Valid	20	20	20	20	20	20	20	20
		Missing	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean		31,55	2,8	8,3	22,65	17,7	37,7	1,95	23,011
	Median		31,5	3	8	22	15	35	2	22,15
	Std. Deviation		6,917	0,8335	2,386	7,527	8,138	9,953	0,826	5,93436
	Range		30	2	7	26	26	37	2	22,5
	Minimum		18	2	5	10	4	20	1	14,8
	Maximum		48	4	12	36	30	57	3	37,3
	Percentiles	25	27	2	6	18,5	10	30,5	1	18,7425
		50	31,5	3	8	22	15	35	2	22,15
		75	36,5	3,75	10	27	25	45	3	25,5075



Şekil 31. Kontrol grubunda negatif yönde anlamlı bulunan HSP27 ve sperm konsantrasyonu arasındaki ilişki grafiği (scatter plot) **p=0,018 r=-0,525**



Şekil 32. OAT grubunda pozitif yönde anlamlı bulunan HSP27 ve vitalite arasındaki ilişki grafiği (scatter plot) **p= 0,015, r = 0,537**

5. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenmiş semen analizi parametreleri idiyopatik erkek infertilitesinin rutin değerlendirilmesinde önemli bir role sahip olmasına rağmen fertil erkekleri infertil erkeklerden ayırma hususunda etkisiz kalabilmektedir (Pizzol ve ark., 2014). Bu sebeple idiyopatik erkek infertilitesinde rol alan ve ayırt edici yeni moleküler süreçlerin ve biyomarkerların tanımlanması önemli ve gerekli bir ihtiyaçtır. Pilch ve Mann'ın yaptığı geniş çaplı çalışmada, insan seminal plazma proteinlerinin 923 tane olduğunu belirlemiş ve HSP27 de bu proteinlerin arasında tespit edilmiştir (Pilch ve Mann, 2006).

İki boyutlu-PAGE ve kütle spektrometre kullanılarak yapılan çalışma fertil ve azoospermik erkeklerde karşılaştırmalı olarak yapılan proteomik bir çalışmada, testiküler dokuda HSP27 düzeyi hastalarda %50'ye yakın daha düşük olduğu saptanmıştır (Huo ve ark., 2008).

Bu bilgilerin ışığında **literatürde ilk kez** bizim çalışmamızda OAT sendromlu bireylerle fertil bireylerin seminal plazmada HSP27 düzeyinin farklılıklarına bakılmıştır. Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz verilere göre HSP27 değişkeni için kontrol ve hasta grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Seminal plazma HSP27 seviyesi OAT grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır (Şekil 30) (Tablo 21).

Bu sonuca göre OAT grubunda HSP27 düzeyinin düşük olması antiapoptotik özelliğini ortaya çıkarmaktadır.

Başka bir çalışmada apoptotik spermatozoa oranı (%) infertil erkeklerde, fertil olanlara göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır (Fauser B.C.J.M, 1999). Apoptotik oranın normozoospermialarda; astenozoospermia, astenoteratozoospermia ve oligoastenoteratozoospermia gruplarına göre düşük olması istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (Gandini L ve ark., 2000).

İnfertil erkeklerle yapılan farklı çalışmalarda, testis dokularında ve sperm hücrelerinde kaspaz aktivasyonu, fosfatidilserinin hücre zarı dışı yöne çevrilmesi, mitokondriyel membran potansiyelindeki değişimler ve DNA fragmentasyonu gibi apoptotik belirteçlerde artış saptanmıştır (Shukla ve ark., 2012).

OAT ve oligoteratozoospermia tanısı konulmuş hastaların ejakülatından elde edilen spermatozoada da artmış Fas ekspresyonu rapor edilmiştir (Sakkas ve ark., 1999)

Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise erkek infertilitesinin farklı alt grupları (azoospermi, astenozoospermi ve OAT) ELISA metodu ile kaspaz-3, -8 ve -9 seviyeleri açısından araştırılmış ve sağlıklı fertil kontrollere göre sadece OAT sendromlu hastalarda spermde anlamlı derecede artmış kaspaz-8 seviyesi saptanmıştır (Wei ve ark., 2015). Kaspaz-8'in Fas-aracılı apoptozda FADD adaptör proteiniyle direkt etkileşip aktifleşerek üstlendiği kaspaz kaskadının başlatıcı rolü de dikkate alındığında, Fas yolağının erkek infertilitesiyle ilişkili apoptoz için önemi daha net anlaşılmaktadır. Apoptoz ile ilgili bir çalışmada, HSP'lerin özellikle HSP70 ve HSP27'nin bazı apoptotik süreçleri inhibe ettiği, HSP90 ve HSP110'un diğer apoptotik süreçleri hızlandırdıkları tespit edilmiştir. Kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-FMK ile ısı şoku etkisindeki farelerin makrofajlarında HSP70 düzeyinin sadece ısı şoku etkisinde kalan hücrelere oranla arttığı belirtilmiştir. Bu nedenle kaspaz-bağımsız apoptozdan korunmada HSP70'in etkili olduğu gösterilmiştir (Malyshev ve ark., 2004). HSP27 hem intrinsik hem ekstrinsik yolaklarda anti-apoptotik işlev üstlenir. Fosforillenmemiş ve fosforillenmiş HSP27 oligomerleri sırasıyla, mitokondriden salınan sitokrom-c'yi bağlayarak kaspaz-9 aktivasyonunu önler (Bruey, Ducasse, ve ark., 2000) ve Fas-aracılı apoptozda Daxx ile direkt etkileşime girerek yolağın ilerlemesini engeller (Charette ve Landry, 2000). HSP27 ayrıca kaspaz-3 aktivasyonunu ve kaspaz-8 aracılı pro-apoptotik Bid aktivasyonunu engelleyerek de anti-apoptotik işlev görebilir (Arrigo 2017; Singh ve ark., 2017). HSP27'nin sahip olduğu bu anti apoptotik fonksiyonun sadece yapısal olarak büyük oligomerler halinde organize olduğunda gerçekleştiği gösterilmiştir (Bruey ve ark., 2000). HSP27'nin artmış veya azalmış ekspresyon seviyelerinin kanser başta olmak üzere nörodejeneratif, kardiyovasküler ve immünolojik hastalıklar gibi pek çok farklı hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir (Singh ve ark., 2017)

Satoshi B. Sato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2018) Sec6'nın HSP27 ve p38 MAPK fosforilasyonunu arttırarak hücre göçünü arttırdığını ve apoptozu baskıladığını göstermiştir. Çalışma sonucunda Sec6'nın HSP27 veya p38 MAPK'ya bağlı olduğu tespit edilmiştir. HSP27'nin fosforilasyon mekanizması net olmamakla birlikte, Sec6 bu düzenleyici mekanizmanın bir modülatörü olarak anahtar bir molekül olabildiğini düşündürmektedir (Satoshi B. S ve ark., 2018).

Chen'in (2006) yaptığı çalışmada apoptoz ile volüm, vizkozite, konsantrasyon peroksidaz testi (Endzt) ve yaş arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır. Başka bir çalışmada

apoptotik hücre oranıyla canlılık testi arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir (Chen ve ark., 2006).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, normalde hücre içinde bulunan HSP27 proteininin henüz tam anlaşılamayan yollarla hücre dışına taşındığını ve burada bilinen şaperon fonksiyonundan farklı görevler üstlendiğini ortaya koymaktadır. Ekstrasellüler HSP27 (eHSP27) olarak adlandırılan bu protein başlangıçta parçalanmış nekrotik hücrelerden pasif olarak dışarı çıkan sitozolik HSP27 olarak düşünülmüş, ancak daha sonraki çalışmalarda aktif bir transport mekanizmasıyla salınabileceği fikri üzerinde durulmuştur. Üzerinde N-ucuna yakın herhangi bir sinyal peptit dizisi taşımayan HSP27'nin, hücre dışına klasik endoplazmik retikulum-Golgi transport yoluyla değil, eksozomal veya endolizozomal yolla taşındığı düşünülmektedir (Batulan ve ark., 2016). Serumdaki HSP27 düzeyinin aterosklerozda 20 kat azaldığı ancak KOAH, kronik pankreatit, kanser (meme, kolon, karaciğer, mide), diyabetik nöropati, insülin direnci ve multipl skleroz gibi diğer hastalıklarda 1,5 ila 4 kat arası bir artış gösterdiği saptanmıştır. Beyin-omurilik sıvısında da yine artmış HSP27 düzeyinin beyin ve omurilik iskemisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Reddy ve ark., 2018).

HSP27'nin rol oynadığı başlıca mekanizmalar protein katlanması, aktin hücre iskeleti üzerindeki etkileri, oksidatif stresin azaltılması ve çeşitli apoptoz modlarının veya diğer hücre ölümü tiplerinin baskılanmasıdır. Ayrıca limitli de olsa ısı denatürasyonu karşısında enzimleri koruma yeteneğine sahiptir. HSP27, kaspaz aktivasyonunu engelleyerek, sinyal yolunda düzenleme yaparak veya hücreleri korumada şaperonluk yaparak apoptozu engeller (Garrido C. ve ark., 2006)

Bir çalışmada apoptotik hücre oranıyla canlılık testi arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir (Oosterhuis GJE ve Vermes I, 2004).

Bizim yaptığımız çalışmada antiapoptotik etki gösteren HSP27 seminal plazma düzeyleri kontrol gruplarında sperm konsantrasyonu ile negatif yönde anlamlı bir korelasyon bulunurken, yaş, volüm, motilite ve morfoloji arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir.

Bir diğer çalışmalar fosforile HSP27'nin baskılanmasının apoptozu teşvik ettiğini ortaya koydu (G Wick, 2006; Pasupuleti N ve ark., 2010). Ayrıca, çeşitli çalışmalar fosforile HSP27'nin apoptotik sinyalleme kaskadlarına doğrudan müdahale ederek apoptoza karşı yüksek aktivite sergilediğini göstermiştir (A Havasi ve ark., 2008; K Mayurasakorn ve ark., 2011; R.P. Bazinet ve S Layé, 2014).

Purandhar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HSP27 ve HSP70'in anti-apoptotik olduğu belirtilmiştir. *Drosophila*'dan insana spermatogenezin çeşitli aşamalarında HSP'lerin diferansiyel ekspresyonu, erkek infertilitesinde Hsp27, 60, 70 ve 90 için ve aynı zamanda apoptozda rol oynadığını gösterir (Purandhar ve ark., 2014).

Literatürde HSP27'nin erkek infertilitesindeki rolü üzerine oldukça az sayıda çalışma mevcuttur. HSP27 normal spermatogenez görülen insan testislerinde hücre tipine spesifik olarak farklı ekspresyon paterni gösterir. HSP27 ekspresyonu Sertoli hücrelerinde ve spermatogonyada yüksek seviyede iken, spermatositlerde orta düzeydedir ve spermatozoada ise hiç yoktur. Bunun aksine, maturasyon arrest görülen infertil erkeklerde HSP27 ekspresyonunun spermatogonya ve spermatositlerde çok düşük seviyede olduğu gösterilmiştir (Adly ve ark., 2008).

Bu çalışmalar testislerde erkek germ hücresi gelişiminde HSP27'nin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Son olarak, iyi bilinen sinyal iletim yollarında görevli proteinlerin aktivasyon paternlerinin sperm kalitesi için birer biyobelirteç olarak tanımlanabilmesinin mümkün olup olmadığını araştıran bir çalışmada, spermatozoada fosforile HSP27 seviyesi ile sperm motilitesi arasında negatif yönde bir korelasyon olduğu saptanmıştır (Silva ve ark., 2015).

Bizim çalışmamızda sperm motilitesi ile HSP27 seviyesi arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır. Fosforile HSP27 düzeyini Elisa yöntemi ile bakmak mümkün olmadığından total HSP27'yi çalıştık. Bu sebeple Silva ve arkadaşlarının çalışmalarından farkının fosforilasyon statüsüne çalışılamadığından olduğunu düşünmekteyiz. Sonraki çalışmalarda total HSP27 yerine Western Blot yöntemiyle fosforile HSP27 düzeyi bakılabilir.

HSP27 gibi küçük şaperon ailesine ait başka bir üye olan HSPB10 (ODF1)-nakavt farelerde yapılan bir çalışmada mutant farelerde sperm motilitesinde azalma ve infertilite görülmesi (Yang ve ark, 2012), HSP27'nin de büyük oligomerler halindeyken sperm motilitesinin sağlanmasında etkin bir görevi olabileceğini düşündürmektedir.

HSP27, sitotoksik strese karşı koruyucu etki gösterir. İn vitro çalışmalarda HSP27'nin fazla veya az salınımının malign transformasyonla ilişkisi gösterilmiştir. HSP27, salınımı veziküller aracılığıyla yapılır. Ekstraselüler veziküller, hücre içi ve hücreler arası sinyalizasyon, atık yönetimi ve koagülasyon gibi önemli biyolojik işlerde rol almaktadır (Ersöz E ve ark., 2016). Hücre zarından dolaylı veya doğrudan işlemlerle

oluşurlar. Ekstraselüler veziküller 4 grupta sınıflandırılır; Apoptozomlar, Mikroveziküller, Eksozomlar, Retrovirüs benzeri veziküller (Akers JC, 2013).

Yapılan araştırmalarda, Eksozomların yüzeylerinde FASL ligandı taşıdıkları ve T hücre inhibisyonuna neden oldukları gösterilmiştir. Malign melanom ve kolorektal kanserli hastalardan elde edilen eksozomların, CD8T lenfositlerde FASL-FAS aracılı apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Andreola G ve ark., 2002; Huber V ve ark., 2005).

Klinikopatolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar da tümör hücrelerinde bulunan HSP27'nin, tümörün progresyonu ve klinik seyri ile ilişkisi olduğu görüşünü desteklemektedir (Leonardi R ve ark., 2002; Ciocca DR ve Calderwood SK, 2005). Bazı çalışmalar, skuamöz hücreli karsinomanın sıklıkla premalign bir lezyondan geliştiğini işaret etmektedir. Premalign lezyonların transformasyonu beklenmeden eksizyonu önerilebilir, fakat geniş çaplı lezyonlarda bu durum cerrah için zorluk teşkil etmektedir. Bu nedenle lezyonun markerlarının araştırılması, yüksek risk oranının tespit edilebilmesi için önem taşımaktadır. Son çalışmalar HSP27'nin epidermal diferansiyasyonda rol oynadığını ve bu proteinin döşeyici epitelde bulunmayışının epidermal malignansiye işaret edebileceğini göstermektedir (Leonardi R ve ark., 2002; Mese H ve ark., 2002).

Bugüne dek literatürde HSP27 ve erkek infertilitesi ile ilgili yapılmış çalışmalar daha ziyade azoospermik hastalarda testiküler doku ve spermatozoada bulunan HSP27 üzerinedir. Ekstrasellüler HSP27'nin seminal plazmaya nasıl taşındığı, seminal plazmada nasıl bir işlev gördüğü, bununla bağlantılı olarak infertil erkeklerde HSP27 seviyesinin seminal plazmada nasıl değiştiği literatürde henüz araştırılmamış, cevapları bilinmeyen sorular olarak karşımıza çıkmaktadır.

İnfertilite patogenezinde oksidatif stresin rolü çeşitli araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Alkan I ve ark., 1997).

Testiküler doku, sperm hücreleri ve lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin seminal plazmada oksidatif stresi arttırabileceği bildirilmiştir (Sharma RK ve Agarwal A, 1996).

HSP27 ekspresyonu apoptozu bloke eder. Bu anti-apoptotik etkinin mekanizmaları, hücre içi glutatyon seviyelerinin yükselmesini içerir. Glutatyon, oksidatif stresin neden olduğu apoptozun korunması için de kritiktir (Gao ve ark., 2000). HSP27, Reaktif oksijen türlerini (ROS) ve glutatyon seviyelerini modüle eder (Arrigo ve ark., 2007).

Seminal plazma membranındaki bu peroksidatif hasar erkek infertilitesinin patofizyolojik mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır.

OAT sendromlu hastalarda seminal plazmada HSP27 seviyesinin düşük olması, HSP27'nin immün sistem yanıtı ve antioksidan işlevi göz önüne alındığında infertil hastalarda bağışıklık sistemi veya antioksidan kapasiteyi olumsuz yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir.

HSP'lerin üreme sürecinin birçok adımında yer aldığı bilinmektedir ve potansiyel olarak semen kalitesini ve sperm fertilitatesini bozan bir otoimmün tepkiye neden olabilir. HSP'ler insan sperminde farklı şekilde ifade edilir ve sperm vitalitesi (canlılığı), motilite, apoptoz ve kapasitasyon reaksiyonunda rol oynar. Sperm vitalitesi, hareketliliği %50den düşük olan spermelerin canlılığını değerlendirmeyi ifade eder. Sperm canlılığı azaldıkça HSP27 konsantrasyonu da düşmektedir. Çalışmamızda OAT grubunda HSP27 ile vitalite arasında anlamlı pozitif yönde orta derecede bir korelasyon saptandı ($r=0,537$ $p=0,015$) (Tablo 18) (Şekil 32).

HSP27 ile Sperm Konsantrasyonu arasında anlamlı negatif yönde orta derecede bir korelasyon saptandı ($r=-0,525$, $p=0,018$) (Tablo 17) (Şekil 32).

Bu durum kontrol grubunda HSP27 artışının sperm konsantrasyonunun anlamlı şekilde düşük olması, olası sperm apoptozunun indüklenme ihtimalini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular doğrultusunda, HSP27 proteininin OAT sendromu için seminal plazmada bir biyomarker olarak kullanılabilme potansiyeli taşıdığı sonucuna varılabilir. Ancak bu yönde örnek sayısının artırılacağı daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. HSP27'nin seminal plazmaya taşınma mekanizmalarının aydınlatılması da gelecekte bu hastalığın tedavisi için önemli bir yaklaşım sunabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasına Ondokuz Mayıs Üniversitesi Üroloji Polikliniğine başvurup OAT tanısı almış 20 hasta ve kontrol grubu olarak 20 sağlıklı fertil erkek dahil edildi. Çalışma ve kontrol grubu 20-50 yaş aralığında bir gruptan oluşturuldu. Kontrol ve OAT grubuna ait seminal plazma örneklerinde HSP27 düzeyleri ölçüldü (Kontrol sonuçları= $28,47 \pm 8,47$ ng/ml, OAT grubu = $23,01 \pm 5,93$ ng/ml). OAT hastalarda seminal plazma HSP27 düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşük tespit edildi ($p=0,013$).

Kontrol grubunda HSP27 düzeyi ile sperm konsantrasyonu arasında ($p=0,018$), OAT grubunda ise HSP27 düzeyi ile vitalite arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0,015$).

Çalışmamızda idiyopatik infertil hastalar ve kontrol gruplarında HSP27 düzeyleri ile total sperm sayısı, sperm konsantrasyonu, motilite, morfoloji ve vitalite parametreleri incelendi. Gruplar arasında fark olmakla birlikte istatistiksel açıdan motilite, hacim, morfoloji ve total sperm sayısı ile HSP27 düzeyi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi.

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar HSP27 proteininin seminal plazmada OAT sendromu için bir biyomarker olabilme potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Ancak örnek sayısının artırıldığı daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Tez çalışmasında elde ettiğimiz bulgular HSP27'nin antiapoptotik ve antioksidan özellikleriyle uyum içindedir. Ancak HSP27'nin hücre dışına taşınma mekanizmalarıyla ilgili gelecekte yapılacak çalışmalar HSP27'nin seminal plazmadaki hücre dışı işlevlerinin daha detaylı olarak ortaya konmasını sağlayacaktır.

HSP27'nin OAT kapsamında, hücre dışı işlevleri ve seminal plazmaya nasıl taşındığı, eksozomlara nasıl yüklediği ve apoptozda net olarak hangi rollerde görev aldığı hakkında daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- A Havasi, Z. Li, Z. Wang, J.L. Martin, V. Botla, K. Ruchalski, J.H. Schwartz, S.C. Borkan, Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol3-kinase-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.*, 2008;283:12305–12313.
- Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, 2003; 17(20): s.2481-2495
- Adly M A, Assaf H A, Hüssein M R A, Heat shock protein 27 expression in the human testis showing normal and abnormal spermatogenesis, *Cell Biology International*, 2008; 32(10): 1247-1255
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte M R A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015;13: 37
- Aitken R J, & Baker M A, Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol*, 2013; 57(2-4): 265-272
- Aitken R J, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Biol reprod* 2001; 122: 497–506.
- Akbal C, Türkeri L, Özer A, Narter F (editörler). *Sperm Oluşumu ve Fizyolojisi*, İstanbul: Üroonkoloji Derneği Moleküler Üroloji Kitabı. 2012: 653-659
- Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retroviruslike vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*. 2013;113:1-11
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K ve ark. *Hücrenin Moleküler Biyolojisi*, 4th edition. Garland science New York, United States of America/Türkiye Bilimler Akademisi, Sistem Ofset Basım Yayın San. Tic. Ltd. Şti. Ankara, 2008; 1010-1014
- Alkan I, Simsek F, Haklar G. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J urol* 1997;157:140-143
- Andreola G, Rivoltini L, Castelli C et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*. 2002;195:1303-1316.
- Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ ve Ark. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J*, 2005; 24(12): s.2096-2103
- Arrigo, A P Mammalian HspB1 (HSP27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress Chaperones*, 2017; 22(4), 517-529

- Arrigo AP, Viot S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C, HSP27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal*, 2005;7:3-49: 414-22.
- Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C and Vicart P. Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets, *FEBS Letters*, 2007;581:19, 3665-3674
- Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan Ğ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O. Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;185-188
- Atalay M, Oksala NK, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, Roy S, Hänninen O, Sen CK. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* 2004; 97: 605–611.
- Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod*. 2007; 22, (5):1413-19.
- Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clinical Cancer Research*, 2009;15(1); 9-14.
- Batulan Z, Pulakazhi Venu V K, Li Y, Koumbadinga G, Alvarez-olmedo D G, Shi C & O'brien E R. Extracellular Release and Signaling by Heat Shock Protein 27, Role in Modifying Vascular Inflammation. *Front Immunol*, 2016; 7, 285
- Bruey J M, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin S A, Diaz-latoud C, Gurbuxani S, Arrigo A P, Kroemer G, Solary E, Garrido C. HSP27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, 2000; 2(9): 645-652
- Bruey J M, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo A P, Solary E, Garrido C. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene*, 2000; 19(42): 4855-4863
- Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis, 2006; 31 (3):164-72
- Ciocca DRTrends Biochem Sci. 2006; 31 (3):164-72.
- Carlson B M, Human Embryology and Developmental Biology. 4th ed. Mosby-Elsevier. 2009:421-428.
- Carrell D. T. ve Hammoud S. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Molecular Human Reproduction*, 2010; 16: 37–47
- Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, ve ark. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(5): 365-72.

- Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine D M ve ark. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod.*2006; (21) 7: 1791–94.
- Charette S J, Landry J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 926: 126-131
- Chen Z, Hauser R, Trbovich A.M, Shifren JL ve ark. The Relationship Between Human Semen Characteristics and Sperm Apoptosis: A Pilot Study *JAndrol*, 2006;27(1):112-20.
- Choi Seul-Ki , Heejin Kam, Kye-Young Kim, Suk In Park and Yun-Sil Lee, Targeting Heat Shock Protein 27 in Cancer: A Druggable Target for Cancer Treatment, 2019
- Cooper T G, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker H W, Behre H M, Haugen T B, Kruger T, Wang C, Mbizvo M T, Vogelsong K M World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*, 2010; 16(3): 231-245
- Charette SJ, Landry J: The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 926:126–131.
- Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene*, 2008; 27 Suppl 1: S20-29
- Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stres Chaperones*. 2005; 10(2): 86-103.
- Clarke GN. A.R.T. and history, 1678-1978. *Human reproduction* (Oxford, England), , 2006; 21,7: 1645-50.
- Cooper G, Hausman R. Hücre, Moleküler yaklaşım. 7th edition. Sinauer Associates/İzmir Tıp Kitapevi Kırtasiye Büro Malz. San. ve Tic. Ltd. Şti. İzmir, 2016; 692.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647-656
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 2003; 22(53): 8590-8607
- Dada R, Thilagavathi J, Venkatesh S. Genetic Testing in Male Infertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 2011; 3: 42- 56.

- Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res*, 2012; 318(11): 1269-1277
- Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z ve ark. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J*, 2006; 25(11): s.2287-2296
- Dohle G.R, Veeze H.J, Overbeek S.E. ve ark. The complex relationships between cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical electrophysiological and genetic data. *Hum Reprod*; 1999; 14:371-4ejaculated human spermatozoa.*Rev Reprod*.1999; 4: 31-37.
- Dündar C, Dünyada ve Türkiye’de infertilite epidemiyolojisi, Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan Ğ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O. Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013;185-188
- Ersöz E, Can O B, Uzunoğlu S. Eksozomların Kanserdeki Rolü, *CBU-SBED*, 2016; 2(5):144-152
- Esteves S.C, Agarwal A. Novel Concepts in Male Infertility, *Int Braz J Urol*; 2011; 37: 5-15.
- Eşrefoğlu M. ‘Bölüm 9 Erkek Genital Sistemi’, ‘Özel Histoloji 2. Baskı’, İstanbul Tıp Kitabevi, 2016; 286
- Etem EÖ, Yüce H, Erol D, Cytogenetic analysis in infertile males with sperm anomalies. *J Assist Reprod Genet*. 2009;22: 217-24
- Fan CY, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of HSP70 function by HSP40. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8: 309-316.
- Fausser B C J M, Rutherford A J, Strauss J F, Van Steirteghem A. Molecular biology in Reproductive Medicine 11h edition. Parthenon publishing group. 1999; 271-295
- Ferlin A, Foresta C. New genetic markers for male infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014; 26fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1998; 69(3):528-32.
- Fİ Ş. Erkek infertilitesinde genetik yaklaşım. *J Turk Soc Obstet Gynecol*, 2006; 3: 147-51.
- Ford WC. World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. 2010;56-63.
- Freilich R, Betegon M, Tse E, Mok S A, Julien O, Agard DA, Southworth DR, Takeuchi K, Gestwicki J.E. Competing protein-protein interactions regulate binding of Hsp27 to its client protein tau. *Nat. Commun*, 2018; 9:4563.
- G. Wick, The heat is on: heat-shock proteins and atherosclerosis, *Circulation*, 2006;114: 870–872.

- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L. ve ark. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000; 15(4): 830-39
- Gardner L, James L. *Color textbook of histology.*, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001; 487-508.
- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, ve ark. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006; 5: 2592-2601.
- Garrido C, Schmitt E, Cande C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G. HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2003; 2: 579-584.
- Gartner P L, Hiatt L J. Çeviri Ed.Canan Hürdağ, Hücre Biyolojisi ve Histolojisi, 7.Baskı, İstanbul Tıp Kitabevi,2016: 28
- Gaestel M, Schroder W, Benndorf R, Lippmann C, Buchner K, Hucho F, Erdmann VA, Bielka H: Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25. *J Biol Chem* 1991, 266:14721–14724. 18.
- Gök N. İnfertil erkeklerde obeziteye bağlı sperm apoptozun ve DNA hasarının değerlendirilmesi., Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2017.
- Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015; 7(12):235
- Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J: Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 1997, 110:357–368. 15.
- Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation* 2002; 106: 2727-2733.
- Gusev N B, Bogatcheva N V, Marston S B. Structure and Properties of Small Heat Shock Proteins (sHsp) and Their Interaction with Cytoskeleton Proteins, 2002; 67
- Hall JE. Reproductive and hormonal functions of the male, Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book, Elsevier Health Sciences, 2015;81:1021
- Hardwick JM, Youle RJ. BCL-2 proteins. *Cell*, 2009; 138(2): 404, 404.e401.
- Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*, 1996; 88(20): 1442-1455
- Hentgartner M O, The Biochemistry of apoptosis, Nature, 2000; 407:770-776

- Hightower LE, Guidon PT. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol.* 1989; 138:257-266.
- Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2001; 79(7): 559-63.
- Howard JC, Varallo VM, Ross DC, Faber KJ, Rot JH, Seney S. Wound healing-associated proteins Hsp47 and fibronectin are elevated in Dupuytren's contracture. *Journal of Surgical Research*, 2004; 117(2): 232-38.
- Huber V, Fais S, Iero M, et al. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*. 2005;128:1796-1804.
- Huggins C, Scott WW, Heinen JH. Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1942; 136, (3), 467-73
- Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996; 56[2]:273-9
- Huo R, He Y, Zhao C, Guo X J, Lin M, Sha J H. Identification of human spermatogenesis-related proteins by comparative proteomic analysis: a preliminary study. *Fertil Steril*, 2008; 90(4): 1109-1118
- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase Misoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod*, 2000; 63:925-32.
- Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human Reproduction*, Volume 8 Supplement 2001:1.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton, P. A review, DNA integrity in human implications. *Hum Reprod Update*, 2005;11(4):337-349.
- Jaattela M. Escaping cell death; survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, 1999;248: 30-43.
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Biol Chem.* 1993; 268(3):1517-20.
- Jeyendran RS. Sperm collection and processing methods: a practical guide, Cambridge University Press, 2003
- Jin C, Cleveland J C, Ao L, Li J, Zeng Q, Fullerton D A, Meng X. Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: the proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol Med*, 2014; 20: 280-289

- Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U ve ark. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, 2009; 460(7258): 1035-1039
- Jovcevski, B, Kelly M A, Rote A P, Berg T, Gastall H Y, Benesch J L, Aquilina J A, Ecroyd H Phosphomimics destabilize HSP27 oligomeric assemblies and enhance chaperone activity. *Chem Biol*, 2015; 22(2): 186-195
- Junqueira L C, Carneiro J Kelley R O. ‘22. Bölüm Erkek Üreme Sistemi’, ‘Basic Histology 8th edition’, Aytekin Y., Barış Kitabevi, 1998
- Junqueira C, Carneiro J, Ro K. Basic histology, Nobel Tıp Kitabevi, 2009; 418-33.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C, european association of urology working group on male, I. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*, 2012; 62(2): 324-332
- K. Mayurasakorn, J.J. Williams, V.S. Ten, R.J. Deckelbaum, Docosahexaenoic acid:brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia, *Curr.Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2011;14: 158–167.
- Kadıoğlu A, Şanlı Ö, Ersay A ve ark. Priapizmin pratik tedavisi. *Türk Üroloji Dergisi* 2006; 32: 182-192.
- Kahn BE, Brannigan RE. Obesity and male infertility. *Current opinion in urology*, 2017; 27, 5, 441-5.
- Kalkavan H, Green Dr. M, Cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*, 2018; 25(1): 46-55
- Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reproductive biology and endocrinology, RB&E*. 2010; 8: 21.
- Katsogiannou, M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front. Genet*. 2014; 5: 346
- Kaufmann SH, Hengartner MO Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cellular Biology* 11, 2001; 526–534
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26(4): 239-257
- Kırıcı Y, Yıldız S. Erkek Üreme Sistemi Anatomisi. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioglu O, Kadıoğlu A. Editörler, Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi, 1.Baskı, İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi.2013;21-28
- Kierszenbaum A. L, ‘Bölüm 20:Spermatogenez’, ‘Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş’, Çev.Ed. Demir R., Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 234

- Kim H, Tu Hc, Ren D, Takeuchi O, Jeffers Jr ve ark. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 2009; 36(3): 487-499
- Koçak N, Yıldırım İH, Cing Yıldırım S. p53 ve p53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73'ün hücrel işlevleri. *Dicle Tıp Dergisi*, 2011; 38(4): 530-535.
- Kolesinska Z, Ahmed SF, Niedziela M, Bryce J, Molinska-Glura M, Rodie M, Jiang J, Sinnott RO, Hughes IA, Darendeliler F, Hiort O, van der Zwan Y, Cools M, Guran T, Holterhus PM, Bertelloni S, Lisa L, Arlt W, Krone N, Ellaithi M, Balsamo A, Mazen I, Nordenstrom A, Lachlan K, Alkhawari M, Chatelain P, Weintrob N. Changes over time in sex assignment for disorders of sex development. *Pediatrics*, 2014; 134, 3: e710-5.
- Kumar V, Abbas Ak, Aster Jc. Robbins Basic Pathology 9th Edition. Erişim: <https://www.elsevier.com/books/robbins-basic-pathology/kumar/978-1-4377-1781-5,2013>
- Kvansakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SF ve ark. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ*, 2008; 15(10): 1564-1571
- Lachaud C, Tesarik J, Cañadas ML and Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod*. 2004; 19(3): 607-10.
- Lambert H, Charette S J, Bernier A F, Guimond A, Landry J. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J. Biol. Chem*. 1999; 274:9378–9385.
- Lelj-Garolla B, Mauk AG: Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated. *J Biol Chem* 2006, 281:8169–8174.
- Lanneau D, Brunet, M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008; 12: 743-761.
- Lartillot S, Kedziora P, Athias A. Purification and characterization of a new fungal catalase. *Prep Biochem*, 1988; 18(3): s.241-246
- Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Anderson CW: Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem* 1992, 267:794–803
- Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br J Nurs*. 2016;(18):S35-S40

- Leber B, Lin J, Andrews DW. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*, 2010; 29(38): s.5221-5230
- Lebret T, Watson RW, Molinié V, O'Neill A, Gabriel C, ve ark. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer* 2003;98:970- 977.
- Lelj-Garolla B, Mauk AG: Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated. *J Biol Chem* 2006, 281:8169–8174.
- Leonardi R, Pannone G, Magro G, Kudo Y, Takata T. Differential expression of heat shock protein 27 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*. 2002; 9: 261-266.
- Leonardi R, Villari L, Caltabiano M, Travali S. Heat shock protein 27 expression in the epithelium of periapical lesions. *J Endod* 2001; 27: 89-92.
- Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000; 25: 665-671.
- Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P ve ark. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, 2017; 8(14): 23996-24008
- Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. *Embo J*. 2008;27:328-335
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1998; 69(3):528-32.
- Lovell Jf, Billen Lp, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C ve ark. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell*, 2008; 135(6): 1074-1084
- Lucas TF, Pimenta MT, Pisolato R, Lazari MF, Porto CS. 17beta-estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis*, 2011; (1, 4): 318-24.
- Malyshev IY, Pshennikova MG, Shmukovich MV, Malysheva EV. Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK potentiates heat shock-induced apoptosis and HSP70 synthesis in macrophages. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2004; 3: 230-232.
- Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol*, 2008;82(5): 273-299

- Mathai JP, Germain M, Shore GC. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress- induced cell death. *J Biol Chem*, 2005; 280(25): 23829-23836
- Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. Review. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 670–684.
- McLachlan R.I, Mallidis C, Ma K, Bhasn S, De Kretser D.M. Genetic disorders and spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev*, 1998; 10: 97-104
- Meschede, D, Lemcke B, Exeler J. R, De Geyter C, Behre H. M, Nieschlag E & Horst J. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection--prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod*, 1998; 13: 576-82.
- Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Yoshiokan, Yoshihama Y ve ark. Prognostic significance of heat shock protein 27 (HSP27) in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 2002; 9: 341-344.
- Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, ve ark. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia* 2002; 18: 563–75.
- Moustafa M H, Sharma R K, Thornton J, Mascha E. Relationship Between ROS Production, Apoptosis and DNA Denaturation in Spermatozoa from Patients Examined for Infertility. *Hum Reprod* 2004; 19(1): 129-38.
- Mundy AR HJC. Muscles and fasciae of the perineum: true pelvis, pelvic floor and perineum. *Gray's Anatomy (Standring, S. ed.)* 39th ed. Philadelphia 2005; 1365-1371
- Murashima A, Kishigami S, Thomson A, Yamada G. Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochim Biophys Acta* 2014; 163-170.
- Mymrikov, E. V, Seit-Nebi, A. S. & Gusev, N. B. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol. Rev.* 59 2011;91: 1123
- N. Pasupuleti, M. Gangadhariah, S. Padmanabha, P. Santhoshkumar, R.H. Nagaraj, The role of the cysteine residue in the chaperone and anti-apoptotic functions of human Hsp27, *J. Cell. Biochem*, 2010; 110: 408–419
- Nakamoto H ve Vigh L. The small heat shock proteins and their clients, *Cell. Mol. Life Sci*, 2007; 64: 294–306.
- Neto F T, Bach P V, Najari B B, Li P S, Goldstein M. Genetics of Male Infertility. *Curr Urol Rep*, 2016; 17(10): 70
- Netter F.H. Atlas of Human Anatomy, 6. Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevi, 2005

- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1833(12): s.3448-3459
- Oosterhuis GJE, Vermes I. Apoptosis in human ejaculated spermatozoa. *J Biol Regul Homeost Agents*.2004;18: 115-9.
- Otaka M, Odashima M, Watanabe S. Role of heat shock proteins (molecular chaperones) in intestinal mucosal protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 1–5.
- Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008; 9(7): 532-542
- Ozan H. Erkek genital sistemi anatomisi, Ozan Anatomi, 2.Baskı, Ankara, Klinisyen Tıp Kitabevleri, 2005;305-12
- Öncel M, Isı şok proteinleri ve kanser. *Eur J Basic Med Sci* 2012; 2(1): 16-23.
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2003; 81: 802-9.
- Paasch U, Granewald S, Agarwall A, Glandera H J, ‘Activation pattern of caspases in *Mol Cell Biol*, 2010; 11(9): 621-632
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003;304: 505-512
- Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol*. 2003, 23, 5790–5802
- Peng J, Tan C, Roberts Gj, Nikolaeva O, Zhang Z ve ark. tBid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *J Biol Chem*, 2006; 281(47): 35802-35811
- Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol*, 1999; 276(2 Pt 1): E310-316
- Peter W F, Ronald P, Jocelyn A L, David R M, Mobile Phones, Heat Shock Proteins and Cancer. *Differentiation*, 2000; 67: 93–97.
- Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L, Faseb J. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond, 2001;15:1118-1131.
- Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol*, 2006; 7(5): R40

- Pizzol D, Bertoldo A, Foresta C. Male infertility: biomolecular aspects. *Biomol Concepts*, 2014; 5(6): 449-456
- Pizzol D, Ferlin A, Garolla A, Lenzi A, Bertoldo A, Foresta C. Genetic and molecular diagnostics of male infertility in the clinical practice. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014; 19: 291-303
- Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci*. 2008;33:71-79.
- Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immuneresponse. *Lancet*. 2003; 362: 469-476.
- Poongotha J, Gopenath T.S, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*. 2009; 50(4):336.
- Purandhar K, Kumar J P, Prajapati B, Rajput P, Seshadri S, Understanding the Role of Heat Shock Protein Isoforms in Male Fertility, Aging and Apoptosis, *World J Mens Health* 2014 December 32(3): 123-132
- R.P. Bazinet, S. Layé, Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brainfunction and disease, *Nat. Rev. Neurosci*, 2014;15: 771–785.
- Reddy V S, Madala S K, Trinath J, Reddy G B. Extracellular small heat shock proteins: exosomal biogenesis and function. *Cell Stress Chaperones*, 2018; 23(3):441-454
- Riccioli A, Salvati L, D'alessio A, Starace D, Giampietri C, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E. The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. *Andrologia*, 2003; 35(1), 64-70
- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo A P, Buchner J, Gaestel M. Regulation of HSP27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem*, 1999; 274(27): 18947-18956
- Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, ve ark. Apoptosis in human sperm. Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*, 2002; 17(10): 2665 - 72
- Ross MH, Pawlina W. *Histology*, Lippincott Williams & Wilkins, 2014; 65
- Ross MH, Poulina W. *Histology A text and Atlas*. Sixth edition. Philadelphia, 2011; 22
- Rouvière H., Delmas A. *Anatomie Humaine: Descriptive, Topographique et Fonctionnelle*. Tête et cou. vol. 1. Paris: Elsevier Masson, 2002.
- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M: Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 1999, 274:18947–18956

- Russell R, Karzai AW, Mehl AF, McMacken R. DnaJ dramatically stimulates ATP hydrolysis by DnaK: insight into targeting of Hsp70 proteins to polypeptide substrates. *Biochemistry*, 1999;38(13): 4165-76.
- Rylander MN, Feng Y, Bass J, Diller KR: Thermally Induced Injury Heat-Shock Protein Expression in Cells and Tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 2005; 1066:222-242.
- Rylander M N,Feng Y, Bass J, Diller K R. Department of Biomedical Engineeringa and Institute for Computational Engineering and Science, b The University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712,2005;222-242
- Sakkas D, Mariethoz E., Manicardi G, Bizzaro D, ve ark. Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa.*Rev Reprod.*1999; 4: 31-37.
- Sakkas D. Moffat O. Nature of dna damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. *Biol reprod.* 2002; 66: 1061-67.
- Sakkas D, Mariethoz E, St John J C. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res*, 1999; 251(2): 350-355
- Satoshi B. Sato, Miwa Sugiura, Tatsuo Kurihara, Dimer-monomer equilibrium of human HSP27 is influenced by the in-cell macromolecular crowding environment and is controlled by fatty acids and heat, *BBA - Proteins and Proteomics*, 2018;1866: 692–701
- Salari S, Seibert T, Chen Y X, Hu T, Shi C, Zhao X, Cuerrier C M, Raizman J E, O'brien E R. Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF-kappaB in macrophages. *Cell Stress Chaperones*, 2013; 18(1): 53-63
- Sancak B, Cumhuri M. Fonksiyonel Anatomi. 1. Baskı, Ankara, Metu Press. 1999; 317-328.
- Sanlı M, Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme, Erkek üreme hastalıkları ve tedavisi, 2014;17
- Schlesinger J M. Heat Shock Proteins. *J Biol Chem* 1990; 265: 12111-12114.
- Seli E, Sakkas D. Spermatozoal Nuclear Determinants of Reproductive Outcome. Implications For Art. *Hum Reprod Update*, 2005;11(4):337–349.
- Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews Dw. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013; 5(4): s.a008714
- Shaner L, Morano KA. All in the family: atypical HSP70 chaperones are conserved modulators of HSP70 activity. *Cell Stress Chaperones* 2007; 12: 1-8.

- Sharma R K, Agarwaal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 1996;48:835-850
- Shukla K K, Mahdi A A, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012; 4: 746-754
- Silva J V, Freitas M J, Correia B R, Korrodi-Gregorio L, Patricio A, Pelech S, Fardilha M. Profiling signaling proteins in human spermatozoa: biomarker identification for sperm quality evaluation. *Fertil Steril*, 2015; 104(4): 845-856 e848
- Singh M K, Sharma B, Tiwari P K The small heat shock protein HSP27: Present understanding and future prospects. *J Therm Biol*, 2017; 69: 149-154
- Sherman M, Multhoff G, Heat Shock Proteins in Cancer. *Ann NY Acad Sci*, 2007; 1113:192–201.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004; 306(5698): s.990-995
- Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in Bioscience* 2012; 4: 746-54.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*. 2003; 80(6): 1420-30
- Snell RS. Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Fonksiyonel Anatomi. 5. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri ve Yüce Yayıncılık. 1998; 316-320.
- Song SH, Chiba K, Ramasamy R, Lamb DJ. Recent advances in the genetics of testicular failure. *Asian J Androl* 2016; 18(3): 350-355.
- Stope M B, Weiss M, Preuss M, Streitborger A, Ritter CA, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncol. Rep.* 2014;32: 2380–2386
- Strasser A, O'connor L, Dixit Vm. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 2000; 69: 217-245
- Strauss JF, Barbieri RL. Yen & Jaffe's reproductive endocrinology E-book: physiology, pathophysiology, and clinical management (Expert Consult-Online and Print), Elsevier Health Sciences, p, 2013
- Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ. Heat shock protein expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 1995; 24:1-8.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol reprod*.1997; 56: 602-07

- Sun Y, cRae TH. The small heat shock proteins and their role in human disease. *Febs J* 2005; 272: 2613–2627.
- Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31: 488-493.
- Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010; 11(9): 621-632
- Takahashi-Horiuchi Y, Sugiyama K, Sakashita H, Amano O. Expression of heat shock protein 27 with the transition from proliferation to differentiation of acinar precursor cell in regenerating submandibular gland of rats. *Tohoku J Exp Med* 2008; 214: 221-230.
- Tavassol F, Starke OF, Völker B, Kokemüller H, Eckardt A. Heatshock protein expression and topical treatment with tacrolimus in oral lichen planus: an immunohistochemical study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37: 66-69.
- Thüringer D, Jegou G, Wettstein G, Terrier O, Cronier L, Yousfi N, Hebrard S, Bouchot A, Hazoume A, Joly A. L, Gleave M, Rosa-Calatrava M, Solary E, Garrido C, FASEB J. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. 2013; 27(10): 4169-4183
- Terzioğlu E, Gümüşdiş G, Doğanavşargil E (Ed.): *Klinik Romatoloji, Isı şoku proteinleri*, Deniz Matbaası, İstanbul, 1999; 51-53.
- Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 274-279.
- Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br J Cancer*, 1997; 76(1): 1-14
- Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem*, 1996; 42(6 Pt 1): 858-868
- Vidyasagar A, Wilson N A, Djamali A, Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target, 2012; 15
- W Krone N, Ellaithi M, Balsamo A, Mazen I, Nordenstrom A, Lachlan K, Alkhawari M, Chatelain P, Weintrob N. Changes over time in sex assignment for disorders of sex development. *Pediatrics*, 2014; 134: 3, e710-5.
- Wang P, Shao Bz, Deng Z, Chen S, Yue Z ve ark. Autophagy in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*, 2018; <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.01.001>
- Wang X, Sharma R K, Sikka S C, Thomas A J ve ark. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003; 80 (3); 531-535

- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 2001; 15(22): 2922-2933
- Wei Mc, Lindsten T, Mootha Vk, Weiler S, Gross A ve ark. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, 2000; 14(16): 2060- 2071
- Wei X, Li Q, Han Z, Lin D, Yu P. Differences in caspase-8 and -9 activity and sperm motility in infertile males of Li nationality in China. *Int J Clin Exp Med*, 2015; 8(3):4721-4726
- Weng SH, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A. ve ark. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8(10): 984–91
- Williams P, Bannister L, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J, Ferguson M. *Anatomy G. Tome II*. 38^a edition. Churchill & Livingstone, 1995; 48
- Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 2005; 17(6): 617-625
- Yang K, Meinhardt A, Zhang B, Grzmil P, Adham I M, Hoyer-Fender S. The small heat shock protein ODF1/HSPB10 is essential for tight linkage of sperm head to tail and male fertility in mice. *Mol Cell Biol*, 2012; 32(1): 216-225
- Yang Y, Luo YY, Wu S, Tang Y D, Rao X D ve ark. Association between C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene and risk of male infertility: a meta-analysisGenet.” *Mol. Res*. 15 gmr. 2015; 15027631
- Yethon Ja, Epand Rf, Leber B, Epand Rm, Andrews Dw. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J Biol Chem*, 2003; 278(49): 48935-48941
- Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005;21: 35-56
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S ve ark. Bid-deficient mice are resistant to Fas-i induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 1999; 400(6747): 886-891
- Y. Yang, Y.Y. Luo, S. Wu, Y.D. Tang, X.D. Rao, et al. Association between C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene and risk of male infertility: a meta-analysisGenet.” *Mol. Res.*,2015;2:15
- Zegers-Hochschild F, Adamson Gd, De Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, Fertility and sterility. 2009; (92, 5): 1520-4.

Zorzi E, Bonvini P, Inducible hsp70 in the regulation of cancer cell survival: analysis of chaperone induction, expression and activity. *Cancers (Basel)*, 2011; 3: 3921-56.



EKLER

Ek.1:

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

İdiyopatik erkek infertilitesi ile seminal plazma ısı şoku proteini 27 (HSP27) protein düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması

Gönüllünün Baş Harfleri <>>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

İnfertilite (doğal yolla çocuk sahibi olamama), çiftlerin en az bir yıl korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye girmelerine rağmen çocuk sahibi olamamaları durumudur. İnfertilite tüm nüfusun yaklaşık %15’inde görülmektedir ve bunun yarısının erkeklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Erkeklerde görülen doğal yolla çocuk sahibi olamama durumu günümüzde gelişmiş toplumlar başta olmak üzere tüm dünyada giderek artan bir şekilde görülmeye başlayan güncel bir sağlık sorunudur. Bu sorunun bir bölümünün genetik, hormonal veya sperm çıkışı ile ilgili problemlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Tüm bu faktörlerin normal olduğu ancak yine de çocuk sahibi olamama durumunun söz konusu olduğu vakalar nedeni bilinmeyen infertilite vakaları olarak adlandırılır. Araştırmanın konusu bu tür nedeni bilinmeyen infertilite vakalarında semende bulunan bir proteinin (HSP27) seviyesindeki değişim üzerinedir. Bu proteinin sperm hücresinde stres artışı sonucu hücre ölümü ve dolayısıyla sperm sayısında azalma ile ilişkili olabileceği araştırmanın temel dayanak noktasıdır. Bu araştırma ile ayrıca farklı semen değişkenleri (sperm şekli, hareketliliği vb) ile bu proteinin miktarı arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Bu araştırma için sizin teşhis ve tedavi amacıyla vermiş olduğunuz semen örneğinizden sadece küçük bir miktar alınacaktır. Bu örnekten sperm hücreleriniz ve hücre üstünde kalan semen sıvınız ayrılacak ve her ikisi de uygun koşullarda saklanacaktır. Daha sonra semen sıvınızda bulunan bir proteinin miktarı o proteini tanıyan antikolar aracılığıyla ölçülecektir. Bütün araştırma bu semen örneği üzerinde yapılacaktır ve size tedavi için uygulanacak işlemler haricinde ek bir ilaç uygulaması veya canınızı acıtacak girişimsel herhangi bir uygulama yapılmayacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığınız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir. Bu araştırmaya katılmak için semen örneğinizden küçük bir miktarı vermeniz yeterli olacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Bu araştırma için başvurmuş olduğunuz merkezde teşhis için vermiş olduğunuz semen örneği haricinde size herhangi bir uygulama yapılmayacağı için bu çalışmanın sizin için herhangi bir yan etkisi, ağrı oluşturma veya sağlığınıza zarar verme riski söz konusu değildir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Bu çalışma ile nedeni bilinmeyen doğal yolla çocuk sahibi olamama ile ilgili olarak sperm hücresi kaybında rol alan bir proteinin semende belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılacaktır. Bu çalışmaya katılarak hastalığın oluş mekanizmasında bilinmeyen bir bileşenin ortaya çıkarılmasında ve gelecekte bu tanıyı alan hastalar için tedavi geliştirilebilmesinde önemli bir katkı sağlamış olacaksınız.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilirim. Çalışmadan her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici tarafından karşılanacak ve size veya bağlı olduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş

olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca Çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod ("Kod") numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Çalışma destekleyicisi firma düzenleyici otorite veya diğer denetim kurumları tarafından atanmış kişiler doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler.

Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum ve çalışma destekleyicisi firmanın her ikisi de yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuz ya da çalışma destekleyicisi firmadan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahipsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyici firma onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verilerinizi kullanmaya devam edebilir.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermektedirim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Dr.Öğr.Üyesi. M. Alper ARSLAN
0554 6821070

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:Yoktur gönüllü istediğinde çalışmadan ayrılabilir.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekiyorsa Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekiyorsa Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

***Açıklamalar katılımcının anlayabileceği açıklıkta ve teknik terimlerden uzak bir şekilde belirtilmelidir.**



Ek.2: Gönüllü Anket Formu

Hastanın Adı, Soyadı:	
Dosya No:	
Hastanın Yaşı:	
Hastanın Mesleği:	
Adres:	
Tel:	
Annenin Memleketi: Babanın Memleketi:	
İnfertilite Süresi:	
Sperm Sayısı:	
Alkol kullanıp kullanmadığı	
In vitro fertilizasyon denemesayısı	

Ek 3: Etik Kurul Kararı:



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/488

14.06.2019

Sayın Dr. Öğr. Ü. M. Alper ARSLAN

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **İdiyopatik erkek infertilitesi ile seminal plazma ısı şoku proteini 27 (HSP27) düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması** başlıklı OMÜ KAEK 2019/456 Karar nolu Genetik çalışma+ Biyokimya çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 13.06.2019 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof. Dr. R. ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı	:Zelife KOÇOĞLU
Doğum Yeri	: Samsun
Doğum Tarihi	:11.06.1982
Medeni Hali	: Evli
Bildiği Yabancı Diller	: İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	:Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Samsun, 2014
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl	: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, 2007-2012 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Acil Laboratuvarı, 2012- devam
E-posta	:zelife.kocoglu@omu.edu.tr