



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**NONOBSTRÜKTİF AZOOSPERMİ OLGULARININ SERTOLİ
HÜCRELERİNDE MİTOKONDRIYAL DİNAMİĞİN
İNCELENMESİ**

Nazila FARHANGZAD

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Oya Sena AYDOS**

**ANKARA
2025**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NONOBSTRÜKTİF AZOOSPERMİ OLGULARININ SERTOLİ
HÜCRELERİNDE MİTOKONDRIYAL DİNAMİĞİN
İNCELENMESİ**

Nazila FARHANGZAD

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Oya Sena AYDOS

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'nün
TDK-2022-2640 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2025

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Nonobstrüktif Azoospermi Olgularının Sertoli Hücrelerinde Mitokondriyal Dinamiğin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Nazila FARHANGZAD

Tarih: 15/01/2025

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Nazila FARHANGZAD tarafından hazırlanan
“Nonobstrüktif Azoospermi Olgularının Sertoli Hücrelerinde Mitokondriyal
Dinamiğin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA
TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/01/2025

İmza

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Ahmet Hakan HALİLOĞLU
Ufuk Üniversitesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Oya Sena AYDOS
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Hasibe VERDİ
Başkent Üniversitesi
Üye

İmza

Doç. Dr. Tülin ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Non-Obstrüktif Azoospermi Olgularının Sertoli Hücrelerinde Mitokondriyal Dinamiğin İncelenmesi.

Hücresinin gereksinim duyduğu enerjinin çoğu mitokondri tarafından sağlanır. Bu nedenle mitokondriyal bozukluklar özellikle beyin, kalp, kas ve üreme sistemi gibi yüksek enerji ihtiyacı olan dokuları daha fazla etkilemektedir. Metabolik fonksiyonlardaki değişiklikleri içeren gelişimsel sistemlerdeki mitokondriyal dinamiklerin rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Mitokondri, sürekli olarak füzyona ve fisyonu uğrayan dinamik bir organeldir. Bu dinamik süreçler, mitokondriyal füzyon, fisyon ve mitofajiye içerir ve hücrenin işlevlerini ve hücre homeostazı sürdürmek için uyum içinde çalışır. Mitokondriyal füzyon ve fisyon olayları organel morfolojisini denetlemeye ek olarak, bir hücre içindeki mitokondri içeriklerinin karışmasını ve homojenliğini sağlayarak mitokondriyal işlevi korumaktadır. Mitokondriyal füzyon ve fisyon olmadığı durumlarda mitokondriyal heterojenite artabilir, mitokondriyal ve hücre homeostazı bozulabilir. Mitokondrinin bir başka dinamik yönü olan mitofaji yoluyla disfonksiyonel mitokondrilerin seçici olarak otofaji ile uzaklaştırılarak sağlıklı bir mitokondriyal popülasyonun varlığını sağlar. Memeli spermatogenezi, mitokondriyal dinamiklerin rolünü keşfetmek için umut verici bir sistemdir çünkü bu süreç birkaç metabolik geçiş gerektirir. Ayrıca, germ hücre gelişimi boyunca, mitokondriyal morfoloji dramatik bir şekilde değişir ve sperm orta parçası etrafına yüksek düzeyde koordine edilmiş sağlıklı mitokondrinin sarılmasıyla spermatogonyadan döllenme kabiliyetine sahip çok özelleşmiş sperm hücreleri oluşur. Bu süreçte somatik Sertoli hücreleri, gelişmekte olan germ hücrelerine yapısal, metabolik destek verir ve spermatogonyumların olgun sperm hücrelerine farklılaşmasını sağlarlar. Memelilerde mitokondriyal füzyon ve fisyonu aracılık eden belli başlı moleküllerin bazıları keşfedilmiştir, ancak insanlarda spermatogenez sırasında mitokondriyal dinamikleri düzenleyen etmenler konusunda henüz yeterli çalışma bulunmamaktadır. Farelerde yapılan araştırmalar, mitokondriyal füzyonun ve fisyonun, mayoz sırasında spermatogonyada farklılaşmayı ve metabolik değişimi (metabolic shift) sağlayarak spermatogenez ve mayoz için kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Mitokondriyal füzyon ve fisyonun merkezi bir rol oynayan ve oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) düzenleyen etmenlerin erkek üreme hücresinin gelişimi sırasında önemli bir rol oynaması beklenir, ancak bu deneysel olarak test edilmelidir. Bu gözlemler, mitokondriyal dinamiklerin, erkek infertilitesinde spermatogenezde rol oynayan moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına ve tedavisine yardımcı olabilecek spermatogenezi düzenleyen bir kontrol noktası olabileceğini göstermektedir. İnfertil erkeklerde, mitokondriyal dinamikte önemli rolü olan belirteçlerin ifadeleri farklılık gösterebilir ve bu belirteçlerin infertilite etyolojisinin aydınlatılmasına, yeni biyobelirteçlerinin belirlenmesine ve mitokondriyal dinamik defekti olan infertil hastalarda tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Yaptığımız çalışmada hasta grubu olarak Non-obstrüktif azoospermi (NOA) tanısı almış infertil erkekler ve kontrol grubu olarak spermatogenezi normal kabul edilen obstrüktif azoospermili (OA) infertil erkekler bireylerden mikroTESE ile elde edilen testis dokularından izole edilen primer Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamiği regüle eden önemli genlerin (*MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *FIS1*, *MFF*, *INF2*, *MID49*, *MID51*, *PARKIN*, *PINK1*, *LC3*, *BCL2*) gen ifadelerinin QRT-PCR ile incelenmesi ve mitokondriyal dinamiğin fertilité üzerine olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Germ hücrelerinin diferansiyasyonunda ve spermatogenezde çok önemli rolü olduğu bilinen Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamikte rolü olan (*MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *FIS1*, *MFF*, *INF2*, *PARKIN*, *PINK1*, *LC3* ve *BCL2*) genlerinin ekspresyonunda artış gözlenmiş olsa da, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buna karşılık, (*MFN1*, *DRP1*, *FIS1*, *MFF* ve *INF2*) genlerinin ekspresyonunun NOA grubunda OA grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. *MID49* ve *MID51* gen ekspresyonunun OA grubunda NOA grubuna kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Mitokondriyal dinamikleri düzenlemeye yönelik terapötik stratejiler, erkek infertilitesinin tedavisinde önemli iyileşmeler sağlayabilir ve Sertoli hücrelerinin spermatogenez sürecinde germ hücrelerine etkili olan henüz bilinmeyen mekanizmaların aydınlatılmasına katkıda bulunabilir. Bu bağlamda, mitokondriyal füzyon, fisyon ve mitofaji süreçlerini hedef alan yeni yaklaşımlar, infertilite tedavisinde umut vaat eden bir araştırma alanı olarak değerlendirilmelidir.

Anahtar Sözcükler: Erkek İnfertilitesi, Mitokondriyal Dinamik, Non-obstrüktif Azoospermi (NOA), Sertoli Hücresi.



SUMMARY

Investigation of Mitochondrial Dynamics in Sertoli Cells of Nonobstructive Azoospermia Cases.

Most of energy cell needs is provided by mitochondria. For this reason, mitochondrial disorders especially affect tissues with high energy needs such as brain, heart, muscle and reproductive system. Little is known about role of mitochondrial dynamics in developmental systems involving changes in metabolic functions. Mitochondria are dynamic organelles undergo fusion and fission. These dynamic processes include fusion, fission, and mitophagy and work to maintain cell functions and cellular homeostasis. In addition to controlling organelle morphology, fusion fission events in mitochondria maintain mitochondrial function by ensuring mixing and homogeneity of mitochondrial contents within cell. In absence of mitochondrial fusion and fission, mitochondrial heterogeneity increase and mitochondrial and cellular physiology impair. Another dynamic aspect of mitochondria, mitophagy, ensures existence of healthy mitochondrial population by selectively removing dysfunctional mitochondria by autophagy. Mammalian spermatogenesis is system for exploring role of mitochondrial dynamics as requires several metabolic transitions. During germ cell development, mitochondrial morphology changes and specialized sperm cells fertilize from spermatogonia are formed by wrapping healthy mitochondria around sperm midpiece. Somatic Sertoli cells provide structural and metabolic support developing germ cells and differentiation of spermatogonia into mature sperm cells. Some of molecules mediate mitochondrial fusion and fission in mammals be discovered, but are not enough studies on factors regulate mitochondrial dynamics during spermatogenesis in humans. Studies in mice Show mitochondrial fusion and fission have a critical importance for spermatogenesis and meiosis by providing differentiation and metabolic shift in spermatogonia during meiosis. Factors play a central role in mitochondrial fusion and fission regulate oxidative phosphorylation (OXPHOS) are expected to play role during male germ cell development, but must be tested experimentally. These observations suggest mitochondrial dynamics may be checkpoint regulating spermatogenesis, which help elucidate and treat molecular mechanisms involved in spermatogenesis in male infertility. Expressions of markers that have important role in mitochondrial Dynamics differ in infertile men, and these markers contribute to elucidation etiology of infertility, identification of new biomarkers, and development of treatment protocols in infertile patients with mitochondrial dynamics defects. The importance of mitochondrial dynamics in many systems has been demonstrated in recent years. In this study, infertile men diagnosed with nonobstructive azoospermia (NOA) as patient group and infertile men with obstructive azoospermia (OA) whose spermatogenesis is considered normal as control group will be included in the study. The gene expressions of important genes regulating mitochondrial dynamics (*MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *FIS1*, *MFF*, *INF2*, *MID49*, *MID51*, *PARKIN*, *PINK1*, *LC3*) in isolated primary Sertoli cells were determined by QRT-PCR. The aim of study was to investigate possible effects of mitochondrial dynamics on fertility. In Sertoli cells, which are known to play a crucial role in germ cell differentiation and spermatogenesis, the expression of genes involved in mitochondrial dynamics (*MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *FIS1*, *MFF*, *INF2*, *PARKIN*, *PINK1*, *LC3*, and *BCL2*) was observed to increase; however, this increase was not statistically significant. On the other hand, the expression of (*MFN1*, *DRP1*, *FIS1*, *MFF*, and *INF2*) genes was found to be significantly higher in the NOA group compared to the OA group. Furthermore, the expression levels of *MID49* and *MID51* genes were determined to be higher in the OA group than in the NOA group. Therapeutic strategies targeting mitochondrial dynamics have the potential to bring significant improvements in the treatment of male infertility and contribute to uncovering the yet unknown mechanisms through which Sertoli cells influence germ cells during spermatogenesis. In this context, novel approaches targeting mitochondrial fusion, fission and mitophagy processes should be explored as a promising field in infertility treatment.

Keywords: Male infertility, mitochondrial dynamic, nonobstructive azoospermia (NOA), sertoli cell.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	vi
İçindekiler	vii
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Mitokondriyal Dinamik	1
1.2. Mitokondriyal Yapı ve Fonksiyonları	2
1.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_M$)	3
1.4. Mitokondriyal Füzyon	4
1.4.1. Mitofusin (MFN1/2)	5
1.4.2. OPA1	7
1.5. Mitokondriyal Fisyon	8
1.5.1. DRP1	9
1.5.2. DRP1'in Fisyon Bölgesindeki İşlevi	9
1.5.3. DRP1'in Fosforilasyonu ve Defosforilasyonu	11
1.6. Mitokondri Bölünmesinde Aktin Hücre İskeletinin Önemi	11
1.7. Mitofaji ile Mitokondriyal Kalite Kontrolü	13
1.7.1. Pink1-Parkin Yolu ve Mitofajinin Düzenlenmesi	13
1.8. Spermatogenez Sırasında Metabolik Değişimler	14
1.9. İnfertilite	15
1.10. Erkek İnfertilitesi	16
1.11. Azoospermi	17
1.12. Azoospermik Hastaların Gruplandırması	17
1.12.1. Pre-Testiküler Azoospermi	17
1.12.2. Post-Testiküler Azoospermi (OA)	18
1.12.3. Testiküler Azoospermi (NOA)	18
1.13. Non-Obstrüktif Azoospermi (NOA) Sınıflandırması ve Histopatolojik Bulgular	19
1.13.1. Maturasyon Duraklaması (MA)	19
1.13.2. Hipospermatogenez	20
1.13.3. Sertoli Cell Only Sendromu	20
1.14. Testisin Yapısı	21
1.15. Spermatogenez	23
1.16. Spermatogenezde Önemli Adımlar	24
1.16.1. Spermatogonyumlar	25
1.16.2. Spermatositler	26
1.16.3. Spermatidler	26
1.16.4. Spermiyogenez	26
1.16.5. Spermiyasyon	27
1.17. Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları	28
1.18. Amaç	29

2. GEREÇ ve YÖNTEM	31
2.1. Hasta Seçimi	31
2.2. Testis Dokusundan Hücre İzolasyonu	32
2.3. Sertoli Hücrelerinin İzolasyonu	33
2.4. Sertoli Hücrelerin Karakterizasyonu	34
2.5. RNA İzolasyonu, RNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü	35
2.5.1. RNA İzolasyonu	35
2.5.2. RNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü	36
2.6. İzole Edilen RNA Örneklerinden cDNA Sentezi	36
2.7. Ters Transkriptaz Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ve Analizi	37
2.8. İmmünofloresan (IF) Yöntemi	38
3. BULGULAR	40
3.1. Primer Sertoli Hücrelerinin Mikroskop Görüntüsü	40
3.2. Primer Sertoli Hücrelerinin Akım Sitometri Yöntemiyle Karakterizasyonu	42
3.3. Primer Sertoli Hücrelerinin IF Yöntemiyle Konfokal Mikroskopta Karakterizasyonu	43
3.4. Sertoli Hücrelerinden RNA İzolasyonu	45
3.5. Gen İfadelerinin qRT-PCR Analiz Bulguları	45
4. TARTIŞMA	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR	80
EKLER	89
Ek-1. Etik Kurul	89
Ek-2. Onam Formu	90
ÖZGEÇMİŞ	91

ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'nün TDK-2022-2640 proje numarası ile desteklenen çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Tezimin oluşturulması ve yürütülmesi sırasında yardımlarıyla beni bilimsel anlamda yönlendiren, tezimin gerçekleşmesi için her türlü desteği veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Oya Sena AYDOS içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezin her aşamasında büyük emeği geçen, benden yardımlarını esirgemeyen, ondan çok şey öğrendiğim, bilim insanı olmayı öğreten değerli hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na da ayrıca teşekkür etmek isterim.

Yardımlarıyla beni destekleyen, engin laboratuvar bilgisiyle bana yol gösteren ve her aşamada motivasyonumu artıran değerli hocam Doç. Dr. Tülin ÖZKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bunun yanı sıra, tezimde kullandığım gerek hasta seçimi, materyal desteği, gerekse erkek infertilitesi konusunda bilimsel yönlendirmeleri için Prof. Dr. Kaan AYDOS ve Prof. Dr. Ahmet Hakan HALILOĞLU'na da sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezimin istatistiksel analiz kısmında yardımlarıyla çalışmama çok önemli katkılar sağlayan Prof. Dr. Derya GÖKMEN'e de ayrıca şükranlarımı iletmek isterim.

Tezimde maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Birimi'ne ve doktora sürecinde Tübitak Araştırma 1004 projede bursiyer olarak çalışmamı sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte, bana her zaman destek olan, zamanlarını ayırarak yanımda bulunan yardımlarını benden esirgemeyen ve çalışmama katkı sağlayan Araştırma Görevlisi Elif Dener KILIÇ'a, Kübra GAYRET'e, Meral TİRYAKİ'ye, Ayla KURT'a, ve Nagehan KOZAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma, tezim sürecinde verdikleri yardımlar ve manevi destekleri için yürekten teşekkür ederim.

Teşekkürün en özeline hayatımın her anında, sevgileri ve destekleriyle beni her zaman güçlendiren canım babama, anneme ve sevgili ablama en derin teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Bu tez, emeği geçen tüm kişiler sayesinde hayata geçmiş olup, katkıda bulunan herkese sonsuz minnettarlığımıla...

Nazila
FARHANGZAD

Ankara, Ocak 2025

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Derece, Santigrat
DRP1	Dinamin ile ilişkili Protein 1
dH ₂ O	Distile Su
ER	Endoplazmik Retikulum
EtOH	Etil alkol
ETC	Elektron Taşıma Zinciri
FSH	Folikül uyarıcı hormone
FIS1	Fisyon 1
G	Gravite
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfodehidrogenaz
GTP	Guanosine Triphosphate
INF2	Inverted formin 2 (Ters Çevrilmiş Formin 2)
KTB	Kan Testis Bariyeri
LH	Lüteinize Edici Hormon
HR	Heptad Repeat
µl	Mikro litre
MA	Maturasyon Duraklaması
ΔΨ _M	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MFN1	Mitofusin-1
MFN2	Mitofusin-2
IMM	İç Mitokondri Membranı
OMM	Dış Mitokondri Membranı
OPA1	Optic Atrophy 1
MFF	Mitokondriyal Fisyon faktör
MA	Maturasyon Duraklama (Maturasyon Arrest)
NOA	Non-Obstruktif Azoospermi
OA	Obstruktif Azoospermi
PINK1	PTEN-induced putative kinase protein 1
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNA	Ribonükleik Asit
SCO	Sertoli Cell Only Sendrom
SKH	Spermatogonyal Kök Hücre
USAUM	Üreme Sağlığı, Araştırma ve Uygulama Merkezi

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FBS	Fötal Dana Serumu
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
cDNA	Komplementer DNA



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Mitokondriyal füzyon ve fisyon	5
Şekil 1.2. MFN2'nin yapısı	6
Şekil 1.3. Mitokondriyal fisyon mekanizması	10
Şekil 1.4. ER ile ilişkili mitokondriyal bölünme	13
Şekil 1.5. Memelilerde seminifer tübülün kesiti	23
Şekil 1.6. Spermatogenez süreci	24
Şekil 1.7. Spermatogenezin sürecinde hücre bazlı değişikliklerin şeması	25
Şekil 2.1. İş akış şeması	32
Şekil 3.1. Testis doku örneğinden izole edilen hücre süspansiyonunun 10x10 büyütmedeki görüntüsü	40
Şekil 3.2. Testis doku örneğinden izole edilen hücre süspansiyonunun 10x40 büyütmedeki görüntüsü	41
Şekil 3.3. Testis doku örneğinden izole edilen Sertoli hücrelerinin 4.gün 10x10 büyütmedeki görüntüsü	41
Şekil 3.4. Testis doku örneğinden izole edilen Sertoli hücrelerinin 4.gün 10x40 büyütmedeki görüntüsü	42
Şekil 3.5. Sertoli hücrelerinde Vimentin antikoru için akım sitometri analizi	43
Şekil 3.6. Sertoli hücrelerinde GATA4 antikoru için akım sitometri analizi	43
Şekil 3.7. Primer Sertoli hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri	44
Şekil 3.8. <i>MFN1</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	46
Şekil 3.9. <i>OPA1</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	47
Şekil 3.10. <i>MFN2</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması.	48
Şekil 3.11. <i>MFF</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	49
Şekil 3.12. <i>DRP1</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	50
Şekil 3.13. <i>FIS1</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	51

Şekil 3.14. <i>PINK1</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	52
Şekil 3.15. <i>PARKIN</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	53
Şekil 3.16. <i>LC3</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	54
Şekil 3.17. <i>INF2</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	55
Şekil 3.18. <i>MID49</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	56
Şekil 3.19. <i>MID51</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	57
Şekil 3.20. <i>BCL2</i> Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması	58

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Master mix karışımının hazırlanması	36
Çizelge 2.2. cDNA sentez basamakları	36
Çizelge 2.3. qRT-PCR protokolü	38
Çizelge 3.1. Bazı RNA örneklerinin spektrofometrik ölçüm sonuçları	45



1. GİRİŞ

1.1. Mitokondriyal Dinamik

Mitokondriler, hücrel enerji üretiminin merkezinde yer alan, aynı zamanda hücrel sinyalizasyon, kalsiyum homeostazı ve apoptoz gibi süreçlerde önemli roller üstlenen dinamik organellerdir (Bahat ve Gross., 2019). Mitokondriler, hücrel sinyallere yanıt olarak morfolojisini ve fonksiyonlarını değiştirme yeteneğine sahiptirler. Mitokondriler, küçük küreler, kısa, uzun veya birbirine bağlı tübüller gibi değişik şekilleri olabilen dinamik yapılardan oluşan bir ağ oluştururlar. Bu morfolojilerinde oluşabilen değişiklik, birbirine karşıt olan mitokondriyal füzyon, fisyon ve mitofaji olarak adlandırılan mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (Youle ve Narendra, 2011). Mitokondrilerdeki füzyon ve fisyon olayları organel morfolojisini denetlemeye ek olarak, bir hücre içindeki mitokondri içeriklerinin karışmasını ve homojenliğini sağlayarak mitokondriyal işlevi korumaktadır. Mitokondrilerin yapısındaki değişiklikler, çoğalma, farklılaşma, stres, besin ihtiyacı ve hücre ölümü dahil olmak üzere çeşitli hücrel aktiviteler için gereklidir (Liesa vd., 2009). Mitokondriyal füzyon ve fisyon olmadığı durumlarda mitokondriyal heterojenite artabilir, mitokondriyal ve hücrel fizyoloji bozulabilir (Chan, 2012).

Füzyon, iki mitokondrinin birleşerek daha büyük ve işlevsel bir organel oluşturduğu bir süreçtir. Bu süreç, hücrel enerji ihtiyacının arttığı durumlarda veya oksidatif stres gibi zararlı koşulların üstesinden gelmek için mitokondriyal işlevin optimize edilmesine olanak tanır. Füzyon ayrıca mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) karışmasını sağlayarak genetik materyalin eşit şekilde dağılmasını ve hasarlı DNA'nın telafisini kolaylaştırır. Bu süreçte, iç mitokondriyal membran proteini OPA1 ve dış membran proteinleri olan mitofusinler MFN1 ve MFN2 gibi moleküller kritik rol oynar.

Fisyon ise tek bir mitokondrinin bölünerek daha küçük organellere ayrıldığı bir süreçtir. Hücrel stres altında fisyon, hasarlı mitokondrilerin daha etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlar. Bu mekanizma, mitokondriyal kalite kontrol sürecinin bir parçası olarak disfonksiyonel mitokondrilerin mitofaji yoluyla elimine edilmesine katkıda bulunur. Fisyonun düzenlenmesinde, adaptör ve efektör proteinlerin yanı sıra DRP1 (dinamik ilişkili protein 1) ve FIS1 gibi proteinler temel rol oynar (Tilokani vd., 2018).

Mitokondriyal dinamiğin bir başka komponenti olan mitofaji, mitokondriyal dinamiklerin önemli bir tamamlayıcısıdır ve disfonksiyonel mitokondrilerin seçici olarak uzaklaştırılmasını sağlar. Bu süreç, hücrel homeostazın korunmasında ve enerji üretiminin optimize edilmesinde hayati bir öneme sahiptir. Mitofaji sırasında, hasarlı mitokondriler PINK1 ve PARKIN gibi proteinler aracılığıyla işaretlenir, otofagozomlar tarafından sarılır ve lizozomlarla birleşerek geri dönüştürülür (Pickles vd., 2018).

Mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesi, özellikle enerji ihtiyacının yüksek olduğu hücrelerde ve dokularda kritik öneme sahiptir. Örneğin, sinir sistemi, kas dokusu ve üreme sisteminde mitokondriyal füzyon, fisyon ve mitofaji mekanizmalarının doğru çalışması, hücrel fonksiyonların sürdürülmesi açısından gereklidir. Bu mekanizmaların bozulması, hücrel enerji üretiminin azalmasına, oksidatif stresin artmasına ve çeşitli patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olabilir (Chan, 2020).

1.2. Mitokondriyal Yapı ve Fonksiyonları

Mitokondriler, hücrenin enerji üretiminden sorumlu organellerdir ve iki zarla çevrilidir: dış mitokondriyal membran (OMM) hücrenin sitoplazması ile mitokondrinin iç kısmını ayırırken, iç mitokondriyal membran (IMM) ise zarlar arası boşluğu ve mitokondriyal matriksi tanımlar. OMM oldukça geçirgen olmasına rağmen IMM çoğu maddeye karşı seçici olarak geçirimsizdir. Bu özellik, moleküllerin mitokondriye gidiş-dönüş hareketini düzenleyen spesifik taşıma sistemlerinin geliştirilmesi için gereklidir (Turcotte, 2003; Koç ve Sarıca, 2003). IMM ayrıca OMM ile temas halinde olan bir iç sınır zarı ve krista zarı olmak üzere iki alt alana bölünebilir. Krista zarı, kompleks I, II, III ve IV oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) solunum zinciri komplekslerini kapsamaktadır (Kühlbrandt, 2015). Hücreler, her biri en az bir adet mtDNA genomu içeren bir ila yüzlerce mitokondri popülasyonuna sahip olabilir (Tzagoloff, 1982).

Mitokondrinin merkezi işlevi oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla enerji (ATP) üretimi olmasına rağmen, apoptoz, kalsiyum homeostazı, doğal bağışıklık ve fosfolipid sentezinin düzenlenmesinde de önemli rollere sahiptir. Mitokondriler hücrel fonksiyondaki birbirine bağımlı rolleri nedeniyle tüm hücre tipleri için önemlidir (Kraus vd., 2021).

Mitokondriler, hücrel enerji üretiminden sorumlu olmalarının yanı sıra reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynaklarından biri olarak da bilinir. Bu moleküller, hücre

sinyalizasyonunda düşük seviyelerde faydalı rol oynarken, aşırı üretim durumunda oksidatif stresin oluşmasına ve hücrel hasara yol açabilir. Spesifik olarak, mitokondri içindeki elektron taşıma zincirinin (ETC) solunum kompleksleri I ve III, ROS üretiminde merkezi bir role sahiptir (Durairajanayagam vd., 2021). ETC, mitokondrinin iç membranında yer alan bir dizi protein kompleksinden oluşur ve oksidatif fosforilasyon sürecinde önemli bir işlev görür. Bu süreç sırasında Kompleks I (NADH dehidrogenaz) NADH molekülünden elektronları alarak koenzim Q'ya aktarır. Elektron transferi sırasında, bazı elektronlar oksijene sızabilir ve süperoksit (O_2^-) adı verilen ROS türünü oluşturabilir. Kompleks III (ubikinin sitokrom c oksidoredüktaz) Koenzim Q havuzundan sitokrom c'ye elektron taşır. Bu süreç sırasında da ROS üretimi gerçekleşebilir (Napolitano., vd 2021).

1.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_M$)

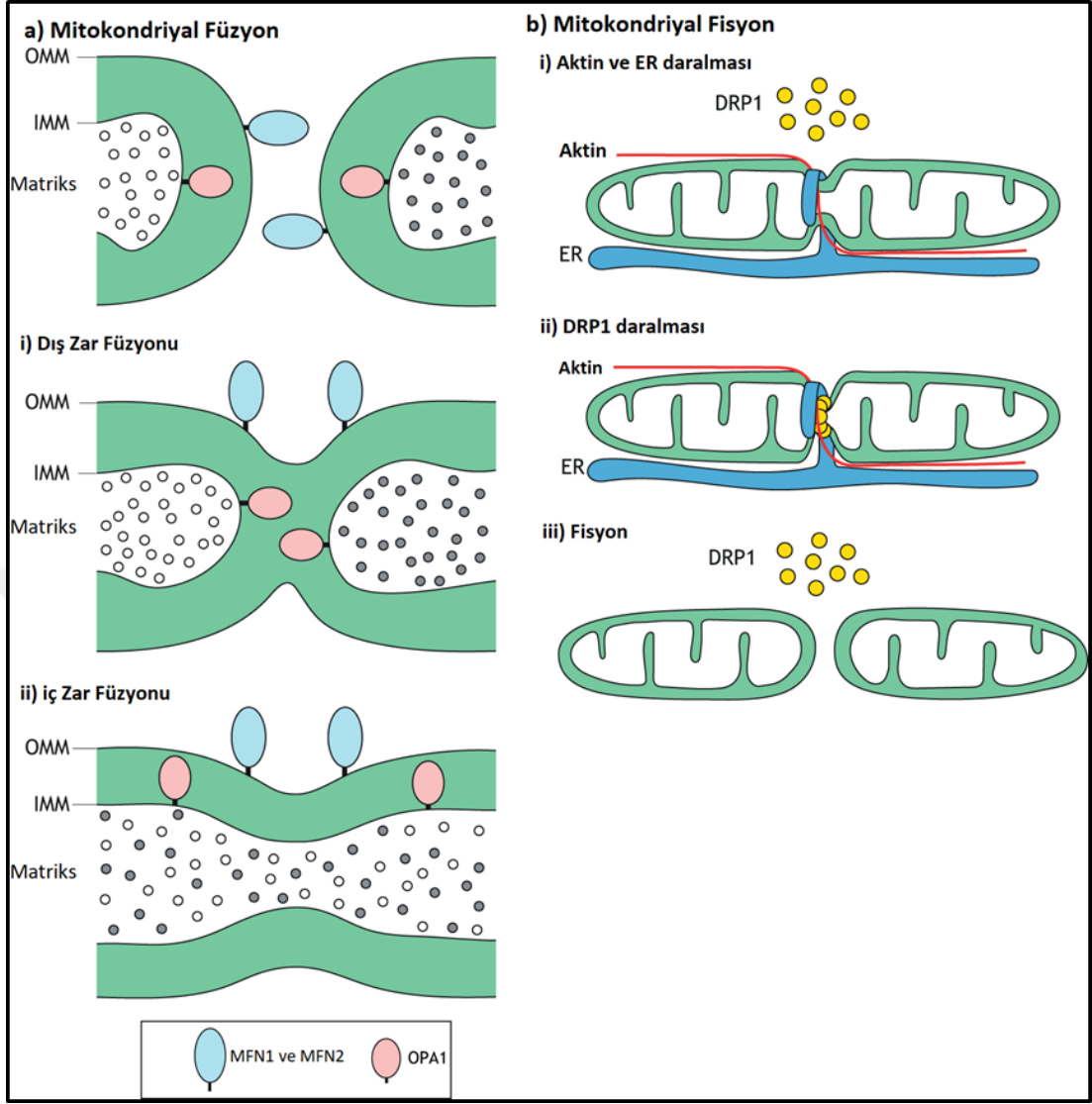
Kompleksler I, III ve IV tarafından üretilen mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_M$), oksidatif fosforilasyon sırasında enerji depolama sürecinde önemlidir. Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP), elektron taşıma zinciri sırasında protonların mitokondrinin matriksinden dış membranına taşınması ile oluşan elektro-kimyasal gradyan tarafından belirlenir. MMP'nin düzenlenmesi, ROS üretim düzeylerini etkileyebilir. Daha yüksek bir $\Delta\Psi_M$, ATP üretimini artmasına, elektron akışının yavaşlamasına ve elektronların komplekslerden oksijene kaçak yapmasına neden olarak ROS seviyelerini yükselterek istenmeyen oksidatif sonuçlara neden olabilir. Düşük MMP, ROS üretimini azaltabilir ancak enerji üretimi açısından zararlı etkiler doğurabilir. Hücredeki $\Delta\Psi_M$ ve ATP seviyeleri, normal fizyolojik aktiviteyi yansıtan her iki faktörün de sınırlı dalgalanmaları olmasına rağmen nispeten sabit tutulur. Ancak, her iki faktördeki sürekli değişiklikler zararlı olabilir. Mitokondriyal membran potansiyel normal seviyelerinin uzun süreli düşüşü veya artışı, istenmeyen hücre canlılığı kaybının ve çeşitli patolojilerin nedeni olabilir. Bu nedenle, mitokondrilerin ROS ve ATP üretimi arasında denge olması gerekmektedir (Zorova vd., 2018; Zorov vd., 2014).

Mitokondriler, ROS üretiminde merkezi bir role sahip olup, bu moleküllerin oluşumu MMP, ETC komplekslerinin aktivitesi ve hücredeki oksijen seviyeleri gibi çeşitli faktörlerle yakından ilişkilidir. ROS üretiminin dengeli bir şekilde düzenlenmesi, hücrel homeostazın korunması ve oksidatif hasarların önlenmesi açısından kritik önem taşır. Mitokondriyal kalite kontrolü, mitokondriyal fisyon ve füzyon, biyogenez, mitofaji ve apoptoz dahil olmak üzere

çeşitli işlemlerle sağlanır. Tüm bu süreçler, erkek üremesi de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik işlevler için gereklidir (Costa vd., 2023).

1.4. Mitokondriyal Füzyon

Mitokondri çift zara sahip olduğundan, füzyon, dış zar füzyonundan ve onu takip eden iç zar füzyonundan oluşmaktadır. Mitokondriyal füzyonda, iki ayrı füzyon olayının her birinde dinamin süper ailesinin GTP'yi hidrolize edici enzimlerini içeren spesifik bir mekanizma yer almaktadır. Mitokondrilerin dış zarında lokalize olan mitofusinler (Mfn1 ve Mfn2)'in aracılık ettiği dış zar füzyonunu, dinamin benzeri Optik Atrofi 1 (Opa1) proteininin aracılık ettiği iç zar füzyonu izlemektedir (Varuzhanyan ve Chan, 2020) (Şekil 1.1.A). Mitokondriyal iki zardaki füzyon olayı arka arkaya meydana gelir, ancak bazen bu iki olay arasında zamansal ayrım olabilir. Membran füzyonunun son aşamasında mitokondrilerin içerikleri birbirine karışır ve matriks bileşenleri yeni mitokondri boyunca yayılırlar. Tipik bir mitokondriyal füzyon reaksiyonunda, iki mitokondri uçtan uca çarpışır ve membran birleşme olayı çarpışma bölgesinde meydana gelir. Füzyon reaksiyonları, halka benzeri yapılar oluşturmak için uçtan uca veya tek bir mitokondri içinde de oluşabilir (Liesa vd., 2009).

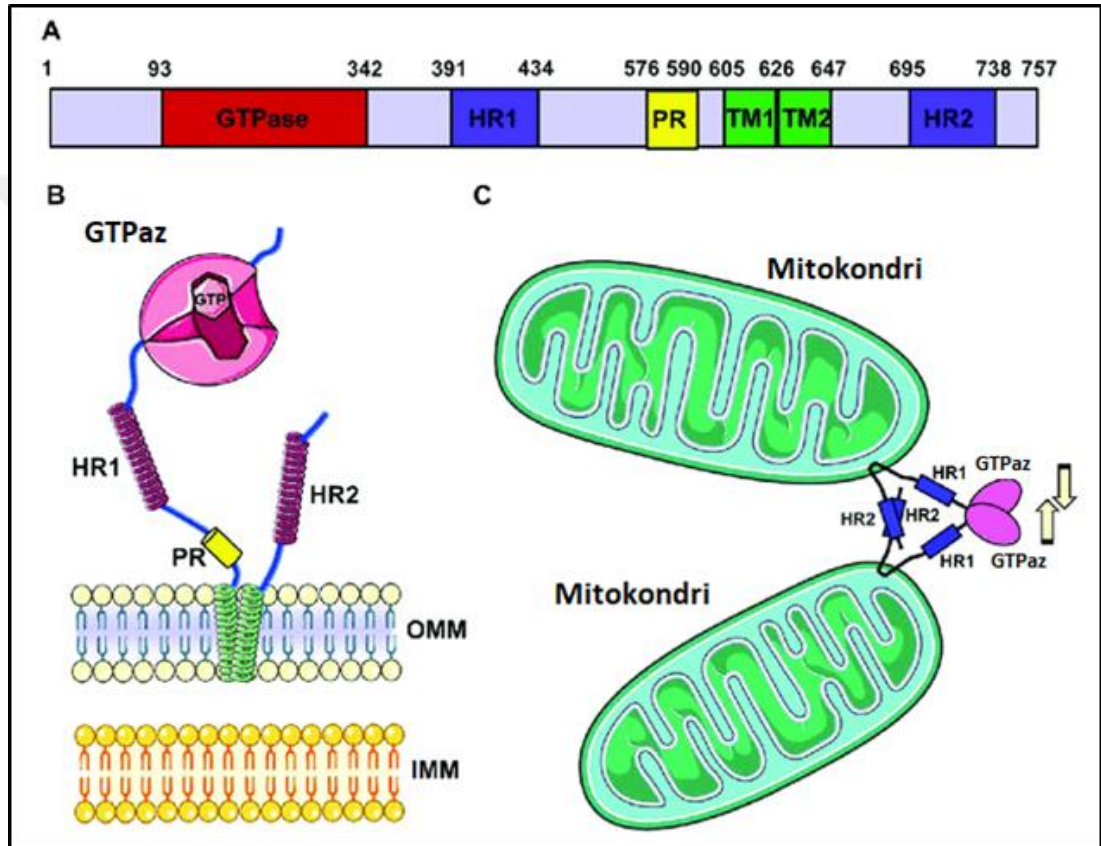


Şekil 1.1. Mitokondriyal füzyon ve fisyon. Fizyolojik koşullar altında mitokondri hücresel homeostazı sürdürmek için füzyon ve fisyon yoluyla morfolojilerini dinamik olarak değiştirir. **(A)** Mfn1, Mfn2 ve Opa1 proteinleri mitokondriyal füzyonun ana düzenleyicileridir. Mfn1 ve Mfn2 füzyon sürecini, karşıt mitokondrinin dış zarı ile koordine etmek için, mitokondriyal dış zarında (OMM) ve Opa1 mitokondriyal iç zar (IMM) füzyonunu koordine etmek için zarlar arası boşlukta bulunur. **(B)** Mitokondriyal fisyon süreci esas olarak Drp1 ve reseptörleri tarafından yürütülür. Fisyonun başlangıcında aktin ve ER mitokondriyi sarar ve daraltır. Daha sonra normalde sitozolik boşlukta bulunan Drp1, mitokondriyal tübülü daha da daraltmak için mitokondriyal dış zara alınır (Varuzhanyan ve Chan, 2020'den modifiye edilmiştir)

1.4.1. Mitofusin (MFN1/2)

Mitofusinler (MFN1/2), dış mitokondriyal membran üzerinde yer alan *MFN1* ve *MFN2* geni tarafından kodlanan mitokondriyal transmembran GTPazların büyük ailesine ait homolog proteinlerdir. MFN1 ve MFN2, sırasıyla 737 ve 757 amino asitten oluşan oldukça benzer proteinlerdir (insanlarda ~%80 benzerlik). Bu proteinler, büyük, sitozolik ve N-

terminal GTPaz bölümü, (domain), C-terminal coiled-coil bölümü (heptad tekrarı HR1), iki C-terminal transmembran bölümü (TM) ve ikinci C-terminal coiled-coil bölümü (heptad tekrarı HR2) içerir (Sekil 1.2). Mitofusin 2 (Mfn2), mitofusin 1 (Mfn1) ile yaklaşık %82 benzerlik ve %66 özdeşlik göstermektedir ve en kapsamlı homologlukları, aynı işlevsel alanlarda bulunmaktadır (Chen vd., 2021). MFN1 ve MFN2 arasındaki en büyük fark, MFN2'nin, protein-protein etkileşimleriyle sıkı bir şekilde ilişkili olan HR1 ve TM alanları arasında prolin açısından zengin farklı bir alana sahip olmasıdır (Filadi vd., 2018).



Şekil 1.2. MFN2'nin yapısı. **a.** MFN2'nin doğrusal yapısını göstermektedir. Büyük N-terminal GTPaz domaini, ardından HR1 domaini, PR domaini, iki TM (transmembran) domaini ve C-terminal HR2 domaini bulunmaktadır. Yukarıdaki sayılar, ilgili domainlerin başlangıç ve bitiş amino asitlerini belirtmektedir. **b.** MFN2'nin topolojisini temsil etmektedir. İki çok yakın TM domaininin (yeşil heliksler) dış mitokondriyal zarı (OMM) geçtiği ve belirtilen sitozolik kısımlarda yer almaktadır. GTPaz domaininde iki GTP bağlama cebi bulunmaktadır. **c.** MFN'lerin OMM kaynaşma aktivitesinin şeması. Bağlama, zıt OMM üzerindeki MFN'lere ait HR2 domainleri arasındaki etkileşimle sağlanır. GTPaz domainlerinin dimerizasyonunun yanı sıra GTP hidrolizine bağlı güç verişinin kaynaşma için önemlidir (Filadi vd., 2018'den modifiye edilmiştir).

İlk mitokondriyal füzyon geni, “fuzzy onions” (Fzo), 1997'de erkek infertilitesi sergileyen bir drosophila mutantında keşfedilmiştir (Hales ve Fuller, 1997). FZO, mitofusinler olarak bilinen evrimsel olarak korunmuş bir mitokondriyal füzyon protein

ailesinin kurucu üyesidir ve insanlarda MFN1 ve MFN2 olarak bilinen iki homoloğu vardır. Füzyon gerçekleşmemesi durumunda mitokondriler ayrılır, fonksiyonel olarak heterojen hale gelir ve oksidatif fosforilasyon azalır (Chan, 2012).

Her hücre tipi, karakteristik bir mitokondriyal morfoloji profiline sahiptir ki bu profil füzyon ve fisyon arasındaki denge ile korunmaktadır. Örneğin, kültür edilmiş interfaz aşamasında olan fibroblast hücreleri tipik olarak kısa tübüllerden uzun tübüllere ve birbirine bağlı ağlara kadar değişen mitokondri morfolojisine sahiptir. Füzyon baskılandığında, tübüller, karşı konulamayan fisyonun bir sonucu olarak hızla küçük kürelere ayrılır (Koshiba vd., 2004; Chen vd., 2003). Mitokondriyal füzyon sürecinde önemli rolü olan MFN1 ve MFN2'nin knock-out edildiği farelerde bu mutasyonlar embriyonik letaliteye neden olabilmekte ve beyin, kalp ve iskelet kası gibi dokularda organa özgü mitokondriyal dinamik disfonksiyonları oluşturarak homeostazı bozmaktadır (Henriques ve Joaquim, 2019).

Fisyon engellendiğinde ise, tübüller dramatik bir şekilde uzar ve karşı konulamayan füzyon nedeniyle mitokondriler daha fazla birbirine bağlı hale gelir. Hücrelerin füzyon ve fisyon arasında belirli bir dengeyi nasıl koruduğu hakkında çok az şey bilinmekle birlikte, fisyon olaylarının genellikle füzyon olaylarından kısa bir süre sonra meydana geldiği ve iki süreç arasında geri bildirim olduğu düşünülmektedir (Twig vd., 2008; Chan, 2020).

1.4.2. OPA1

OPA1, mitokondriyal iç zarda lokalize olan ve mitokondriyal iç zar füzyonunda rol oynayan mitokondriyal dinamin-benzeri bir GTPazdır. OPA1 ilk olarak otozomal dominant optik atrofının gen mutasyon taramasıyla keşfedilmiştir. OPA1 geninden alternatif splicing yoluyla en az sekiz mRNA varyantı uzun ve kısa izoformları oluşturur. OPA1'in uzun formları, kısa OPA1 formlarını elde etmek için matrikste ek işlemlere tabi tutulur ve OPA1'in hem uzun hem de kısa formları, mitokondriyal füzyon aktivitesini yeniden sağlamak için birlikte çalışmaktadır (Alexander vd., 2000).

Birçok çalışma OPA1'in, IMM füzyonundaki rolüne ek olarak, krista organizasyonunda, solunum zinciri fonksiyonunda ve mitokondriyal DNA (mtDNA) bütünlüğünün korunmasında rolü olduğunu göstermektedir. (Olichon vd., 2003). Fare embriyonik fibroblastlarında, OPA1'in genel kaybı, mitokondriyal ağın parçalanmasına, kritik derecede azaltılmış mtDNA kopya sayısına ve krista yapısının önemli ölçüde

düzensizleşmesine ve solunum kapasitesinin azalmasına neden olur. OPA1 oligomerizasyonu, krista bağlantılarını sıkılaştırarak, krista içindeki sitokrom c'yi koruyarak ve salınımını kontrol ederek apoptozis düzenlemesi için gereklidir (Li vd., 2019). Mitokondriyal iç zarında bulunan OPA1 krista yapısının korunmasında bağımsız bir rol oynamaktadır. OPA1'in yokluğunda, kristanın yapısı ciddi şekilde bozulmaktadır ve solunum zinciri süper kompleksleri büyük ölçüde azalmaktadır (Cogliati vd., 2013).

Opa1 eksikliği olan hücrelerde mitokondriyal dış membran füzyonu gerçekleşmesine karşın, hiçbir zaman iç membran füzyonu gerçekleşmez, oluşan başarısız füzyon ara ürünleri ise fisyonla parçalanır. Mitofusinlerin aksine, Opa1'in iç membran füzyonunun gerçekleştirilmesi için birleşecek olan iki mitokondriden sadece bir tanesinde bulunması yeterlidir (Mishra vd., 2014; Song vd., 2009).

Mitokondriyal füzyon, hücrel enerji homeostazı ve mitokondriyal fonksiyonların sürdürülmesi için oldukça hassas bir şekilde düzenlenir. Her ne kadar Mfn1, Mfn2 ve Opa1'in tümü mitokondriyal füzyonun kontrol edilmesi için gerekli olsa da, Opa1'in aşırı ekspresyonu, Mfn2'nin nakavtının etkisini ortadan kaldıracak ancak Mfn1 kaybının mitokondriyal morfoloji üzerindeki etkisini ortadan kaldıramaz (Cipolat vd., 2004).

1.5. Mitokondriyal Fisyon

Mitokondriyal fisyon, hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını sağlamak için mitokondrilerin bölünmesini içeren çok aşamalı bir süreçtir ve esas olarak büyük bir GTPaz olan Drp1 ve diğer adaptör proteinler tarafından kontrol edilir. Mitokondriyal bölünme genellikle yüksek stres seviyeleri ve apoptozis ile ilişkili mitokondriyal işlev bozukluğu sırasında tetiklenir. Mitokondriyal füzyon, fisyon tarafından düzenlenmektedir. Bu denge, hücre boyunca mitokondriyal dağılımı ve taşınmasını kolaylaştırmak için uygun organel boyutu ve morfolojisi ile sağlanmaktadır (Zerihun vd., 2023).

Fisyon, Drp1 ve mitokondri ile endoplazmik retikulum (ER) arasındaki etkileşim aracılığı ile gerçekleştirilir. Mitokondride, işaretlenen fisyon bölgelerinde aktin filamentler ve endoplazmik retikulum (ER) mitokondriyi sararak ve daraltarak fisyondaki ilk adımları gerçekleştirmektedir. Daha sonra, OMM üzerindeki reseptörler (FIS1, MFF, MID49, MID51), mitokondriyal tübüllerini daha da daraltmak ve ayırmak için halka benzeri yapılarda birleşen bir mekanokimyasal enzim olan sitozolik DRP1'i (dinamin ile ilişkili

protein 1'i =DRP1; *DNM1L* geni tarafından kodlanmıştır) fisyon olan bölgeye çağırırlar (Friedman vd., 2011; Korobova vd., 2013; Varuzhanyan ve Chan, 2020) (Sekil 1.1.B).

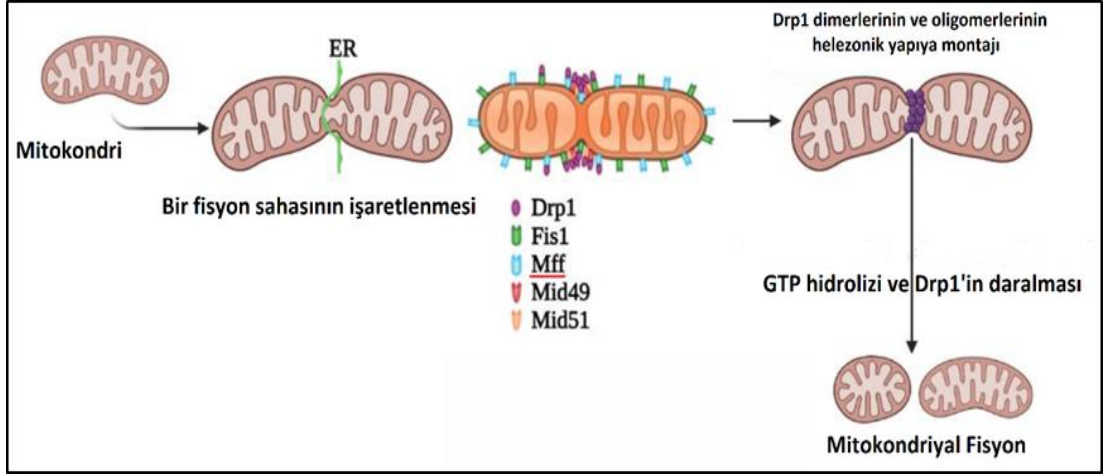
1.5.1. DRP1

Mitokondriyal fisyon, GTPaz ailesinden DRP1'in aktivitesi ile desteklenir. DRP1, fisyonu başlatmak için mitokondriyal membrana alınan sitozolik bir proteindir. DRP1, bir N-terminal GTPaz bölümü, orta bölüm ve bir C-terminal GED (GTPase Effector Domain) bölümünden oluşur (Tilokani vd., 2018). DRP1 aktivitesi ayrıca hücre döngüsünün ilerlemesinde, kalp ve kas farklılaşmasında ve apoptozda önemli rol oynamaktadır. DRP1, mitokondriyal dış zar geçirgenliğini artırarak sitokrom c salınımını tetikler ve apoptotik sinyalleri güçlendirir. DRP1'in işlev bozukluğu, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda mitokondriyal disfonksiyon ve nöronal hasarla ilişkilendirilmiştir (Liesa vd., 2009).

İnsanlarda ve farelerde yapılan çeşitli gözlemler, spermatogenez sırasında mitokondriyal fonksiyonun önemini göstermektedir. Mitokondriyal füzyon ve fisyon proteinlerindeki kusurlar, ciddi şekilde bozulmuş mitokondriyal morfolojiye, mitokondriyal fonksiyon kaybına, mitokondriyal DNA bütünlüğünün zarar görmesine ve sonunda hücre ölümüne yol açar. Mitokondriyal DNA mutasyonlarının neden olduğu mitokondriyal hastalığı olan bazı hastaların infertil olduğu gösterilmiştir ayrıca bazı infertil erkeklerden alınan spermlerde mtDNA mutasyonları saptanmıştır (Demail vd., 2017; Baklouti-Gargouri vd., 2014).

1.5.2. DRP1'in Fisyon Bölgesindeki İşlevi

DRP1, membran fosfolipitlerini doğrudan bağlayan bir bölüm içermediğinden, dış mitokondriyal membrana alımı için adaptör proteinler gereklidir. DRP1'in sitozolden mitokondriyal yüzeye alınması, mitokondriyal dış zar üzerinde bulunan DRP1 reseptörlerinin (FIS1, MFF, MID49, MID51) hareketini gerektirir (Bui ve Shaw, 2013). Bu adaptörlerin yokluğunda, DRP1 sitozolde kalır.



Şekil 1.3. Mitokondriyal fisyon mekanizması (Zerihun vd., 2023'ten modifiye edilmiştir).

Memelilerde FIS1, DRP1 alımında, mitokondriyal fisyonda ve mitofajide rolü var. Memelilerde dört reseptör sitozolik DRP1'i mitokondriyal dış zara aktarır: bu DRP1 reseptörleri mitokondriyal fisyon faktörü (MFF), 49 ve 51 kDa'lık mitokondriyal dinamik proteinler (MID49 ve MID51; sırasıyla *MIEF2* ve *MIEF1* genleri tarafından kodlanmıştır) ve mitokondriyal fisyon 1 (FIS1) proteinleridir (Chan, 2012) (Şekil 1.3). DRP1 reseptörlerinin her birinin farklı fakat tamamlayıcı işlevleri vardır. MID49/51, oligomerizasyonu kolaylaştırmak için GTP'ye bağlı DRP1'i alır ve MFF, seçici olarak oligomerik ve aktif formları almaktan sorumludur (Tilokani vd., 2018).

Memeli Fis1'i, mayalardaki Fis1 gibi mitokondriyal fisyonda merkezi rol oynamaz çünkü Fis1'den yoksun memeli hücrelerinin, çok az fisyon eksikliği gösterdiği, memelilerin bazı hücrelerinde Fis1'in mitofaji için gerekli olduğu saptanmıştır (Shen vd., 2014; Yamano vd., 2014). Memelilerde diğer üç dış zar proteini (Mff, Mid49 ve Mid51) Drp1'in mitokondriye alınmasında daha önemli rollere sahiptir. Drp1'in reseptör moleküllerinden herhangi birinin ifadenmesindeki değişiklikler mitokondrinin fisyon defektine neden olmaktadır. Örneğin Drp1'in reseptör moleküllerinden biri olan Mff'nin delesyonu, Drp1'in mitokondriye alınmasını azaltmakta ve fisyonu bozmaktadır.

Her bir reseptör bağımsız olarak Drp1'i mitokondriye toplayabilir ancak Drp1 reseptörlerinin fisyonu modüle etmek için fiziksel olarak birbirleriyle etkileşime girdiğine dair göstergeler bulunmaktadır. Bu etkileşimlerin ayrıntıları ve bölünmeyi nasıl düzenledikleri henüz bilinmemektedir (Chan, 2020).

1.5.3. DRP1'in Fosforilasyonu ve Defosforilasyonu

Mitokondriyal fisyon sürecinde ana düzenleyici olarak Drp1'in aktivitesi, post-translasyonel modifikasyonlarla düzenlenmektedir. Drp1'in translasyon sonrası modifikasyonları ağırlıklı olarak fosforilasyon, S-nitrozilasyon, sumolasyon, ubikuitinasyonu içerir. Genel olarak, Serin-637'deki fosforilasyon, Drp1 aktivitesini inhibe ederken, Serin-616'daki fosforilasyon, Drp1 aktivitesini aktive eder. Ayrıca, aynı bölgede Drp1'in fosforilasyonu, mitokondriyal fisyon ilerlemesi üzerinde zıt etkilere sahip olabilir ki, bu hücrelerin tipine, yaşına veya durumuna bağlıdır (Hu vd., 2017).

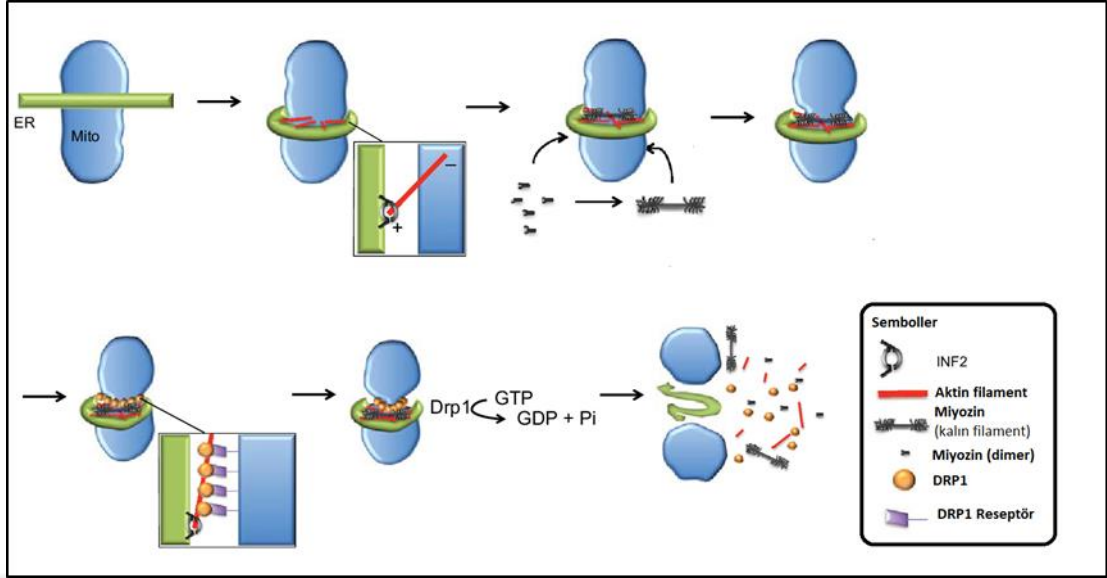
Fealy ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışmada, insülin direnci olan yaşlı obez bireylerin iskelet kasında aerobik egzersiz sonrasında DRP1 Ser616'nın kas dokularında azalmasına neden olabileceği ve yağ oksidasyonu ve insülin duyarlılığını artıracak *in vivo* kanıtlar ile gösterilmiştir. Bu bulgular mitokondriyal fisyonun, mitokondriyal disfonksiyona ve insülin direncine neden olabileceği hipotezini desteklemektedir. Egzersiz eğitimi yapanlarda bu yolağın inhibisyonunun insülin duyarlılığında gelişmelere neden olabileceği gösterilmiştir. Mitokondriyal dinamiklerle ilgili genlerin ekspresyonunu incelediklerinde *DNM1L* (DRP1'i kodlayan gen), *OPA1*, *MFN1* ve *MFN2* genlerinde önemli ölçüde ifade artışı görüldüğü ve *FIS1*, *PARKIN*, *PINK1* ifadelerinin değişmediği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar *DNM1L*'deki gen ekspresyonundaki artışın total DRP1 protein miktarına yansımadığını göstermekte olup, bu çalışmada saptanan kas dokusundaki fosforile DRP1 proteinin azalmasının iskelet kasındaki DRP1'in transkripsiyon sonrası düzenlemeye tabi olmuş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Fealy vd., 2014).

1.6. Mitokondri Bölünmesinde Aktin Hücre İskeletinin Önemi

Mitokondriyal dış membrana (OMM) Drp1'in alınması, ERMD (ER ile ilişkili mitokondriyal bölünme) adı verilen endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondrinin yoğun bir şekilde etkileşime girdiği bir ön-daraltma adımını gerektiren önemli bir düzenleyici olaydır. ER-mitokondriyal temasının ön-daralma için gereken kuvveti nasıl oluşturduğu veya ön-daralmanın neden Drp1 alımına yol açtığı henüz bilinmemektedir. Ancak ERMD'nin memelilerde aktin bazlı bir süreç olabileceği, inverted formin (INF2), Miyozin II ve diğer aktin bağlama proteinlerinin bu sürece dahil olabileceği düşünülmektedir (Giacomello vd., 2020).

ER lokalize bir aktin düzenleyici olan INF2 (inverted formin 2), başlangıçtaki mitokondriyal daralmayı yönlendirmek için aktin filamentlerini indükler ve ardından ER-mitokondri daralma bölgelerine Drp1 alımını teşvik eder. INF2 insanlarda INF2 geni tarafından kodlanan bir proteindir. INF2, mitokondriyal fisyon stres lifi oluşmasında rol oynamaktadır. INF2, aktin filamentlerinin artı uçları ile etkileşime girerek aktinin çekirdeklenmesini ve uzamasını hızlandırmaktadır, ancak aynı zamanda filamentleri sararak ve ayırarak aktinin parçalanmasını hızlandırmaktadır. Miyozin II de mitokondriyal fisyonda benzer roller oynamaktadır. Miyozin II, mitokondriyal daralma bölgelerinde zenginleşir ve Miyozin II'nin silinmesi, mitokondride Drp1 birikimini azaltır (Korobova vd., 2013; Giacomello vd., 2020).

Mitokondriyal fisyon mekanizmasında ER ve mitokondri, mitokondriyal fisyonun gerçekleştiği bölgede etkileşime girer. Aktin filamentleri artı uçlarında INF2 yardımıyla çekirdeklenir ve uzanır ve INF2 aracılığı ile ER'ye bağlı kalır. Daha sonra Miyozin II, fisyon bölgesine alınır. Miyozin II'nin anti paralel aktin filamentleri üzerindeki aktivitesi, ağır deformasyonuna neden olarak hem çevreleyen ER'nin hem de altta yatan mitokondrinin daralmasına neden olmaktadır. Bu aşamada Drp1 mitokondriyal membrana gelmeden önce ön-daralma gerçekleşir. Drp1, OMM'ye bağlı Drp1 reseptörü ve aktin filamanlarının sayesinde ön-daralma bölgesine bağlanır ve oligomerleşir. Drp1, GTP hidroliz oranını artıran aktin filamentlerine doğrudan bağlanır. Drp1'in GTPaz aktivitesi, mitokondriyal daralmanın artmasına neden olmaktadır. Fisyon süreci gerçekleştirdikten sonra fisyon kompleksinin bileşenleri (aktin, miyozin, Drp1 oligomer) parçalanır (Şekil 1.4) (Hatch vd., 2014). Özetlemek gerekirse, ER, aktin hücre iskeleti ve Drp1 reseptörlerinin mitokondriyal bölünmeyi yönlendirmek için işlevlerini nasıl birlikte koordine ettiğini anlamak önemli bir zorluk teşkil etmektedir.



Şekil 1.4. ER ile ilişkili mitokondriyal bölünme (Hatch vd., 2014'ten modifiye edilmiştir).

1.7. Mitofaji ile Mitokondriyal Kalite Kontrolü

Mitofaji, mitokondriyal kalite kontrol mekanizmasının önemli bir parçasıdır ve hasarlı mitokondrilerin lizozomlarda parçalanmasını kolaylaştırır. Bu süreç, hasarlı mitokondrileri ortadan kaldırarak hücrel enerji dengesini korur ve oksidatif stresin azalmasına katkıda bulunur. Böylece hücrel homeostaz ve hayatta kalma için kritik bir rol oynar.

1.7.1. Pink1-Parkin Yolu ve Mitofajinin Düzenlenmesi

Mitofaji, hasarlanmış mitokondrinin otofaji ile seçici olarak parçalanmasıdır. En iyi karakterize edilmiş mitofaji modeli, PTEN ile indüklenmiş kinaz 1 (PINK1)-PARKİN yoludur. Sağlıklı mitokondrilerde Pink1, dış mitokondriyal membranda TOM kompleksinden geçerek iç mitokondriyal zarın içine taşınır ve burada mitokondriyal proteazlar tarafından parçalanır. Ancak, mitokondriyal membran potansiyeli kaybolduğunda (hasarlı mitokondri), Pink1 yıkılmaz ve OMM üzerinde birikir. Pink1, mitokondriyal matriks içine import edildiğinde proteazlar tarafından bozunmaya bağlı olarak normalde düşük seviyelerde bulunan bir serin/treonin kinazdır. Mitokondriyal membran potansiyelini bozan etmenler, Pink1 importunu ve bozunmasını önleyerek, Pink1'in mitokondriyal dış membran üzerinde konsantrasyonunun yüksek düzeyde tutulmasına neden olmaktadır.

Pink1 hasarlı mitokondriyal yüzeyde ubikitini fosforile ederek, mitokondriyal dış zar proteinlerine ubikuitin moleküllerini ekleyen E3 ubikuitin ligaz ailesi üyesi olan Parkin'in uyarılmasına yol açmaktadır. Dış membran'da biriken Pink1, Parkini fosforile ederek aktive eder. Parkin aktif hale geldiğinde, OMM proteinlerini (örneğin, MFN1, MFN2, VDAC gibi) ubikitinler ve bu proteinler etiketlenir. Bu süreç, mitokondrinin otofagozom adı verilen çift zarlı yapı tarafından tanınması için kritik bir sinyal sağlar. Ubikuitin zincirlerinin Pink1 tarafından daha çok fosforile edilmesi, Parkin'i devreye sokarak ubikuitin proteazom sistemini (UPS) etkinleştiren ve mitofaji için otofagozomları toplayan bir pozitif geri besleme döngüsü oluşturur. OMM proteinlerine bağlanan ubikuitin zincirler, mitofaji adaptör proteinleri (p62/SQSTM1, NDP52, optineurin) için bir sinyal görevi görür. Bu Adaptör proteinler, hasarlı mitokondriyi otofagozoma yönlendiren kritik moleküllerdir. Adaptör proteinler, iki uçlarında farklı bölgeler taşır: Ubikitin bağlanma bölgesi, ubikitin zincirlerine bağlanır ve LC3 bağlanma bölgesi otofagozom zarı üzerinde bulunan LC3 proteinine bağlanır. Mitofaji sırasında, mitofaji ile ilişkili protein LC3, otofagozomal membrana alınır ve dış zarlarında mitofaji adaptör protein ifade eden mitokondrilere bağlanır. Ubikuitlenmiş ve otofagozom içine alınmış mitokondriler, lizozomla birleşerek mito-lizozom oluşturur. Lizozomal enzimler, mitokondrileri degrade ederek hasarlı organelleri sindirir (Narendra vd., 2010; Xian ve Liou, 2021).

1.8. Spermatogenez Sırasında Metabolik Değişimler

Erkek üreme hücrelerinin farklılaşma durumlarına bağlı olarak farklı metabolik gereksinimleri vardır. Spermatositler ve spermatidler kan-testis bariyerinin içinde yer alırken, spermatogonyumlar bariyerin dışında bulunur. Bu nedenle, spermatogonyumlar enerji kaynağı olarak doğrudan kan dolaşımından glikozu kullanabilir. Seminifer tübüllerde çok sayıda germ hücresinin spermatozoaya dönüşmesi nedeniyle, bu hücrelerin diğer enerji kaynaklarıyla verimli bir şekilde beslenmesi gereklidir.

Spermatogonyanın, glikoliz yoluyla enerji üretimi, bazal bölmede glukozun erişimine dayanır. Adluminal bölmedeki spermatositler ve spermatidler, kan testis bariyeri (KTB) ile vasküler yapılardan ve interstisyel boşluktan ayrıdır bu nedenle, enerji üretimi için gerekli olan karbon kaynağı için Sertoli hücrelerine bağımlıdır. Sertoli hücreleri, glikoz taşıyıcıları aracılığıyla bazal bölmedeki glukozu alır ve glikolitik olarak piruvata ve daha sonra piruvat dehidrojenaz (PDH) yoluyla piruvat laktata dönüştürür. Laktat daha sonra monokarboksilat taşıyıcıları (MCT) tarafından spermatositlere yerleşir ve spermatosit'de laktat dehidrojenaz

(LDH) ile tekrar piruvata dönüştürülür. Bu durum, laktat dehidrojenaz'ın (LDHC) seçici olarak adluminal bölmedeki gelişmiş germ hücrelerinde ekspresyonu ile desteklenmektedir. Son olarak, piruvat, oksidatif fosforilasyonu gerçekleştirmek için mitokondriyal piruvat taşıyıcısı tarafından mitokondriye taşınır (Boussouar ve Benahmed, 2004; Lord ve Nixon, 2020). Spermatogonyumlarda glikolizin fazla olması, oksidatif stres yaratabilir. Sertoli hücreleri glikoz metabolizmasını üstlenerek bu riski azaltır. Sertoli hücreleri tarafından sağlanan laktat, spermatogenez için hayatta kalma ve enerji üretiminde kritik bir yakıt kaynağıdır.

Mitokondriyal dinamik terimi, füzyon, fisyon ve mitofaji süreçlerini kapsar ve hücre ile doku homeostazını sürdürmek için önemli bir kalite kontrol mekanizmasıdır. Her ne kadar birçok çalışma, mitokondriyal füzyon, fisyon ve mitofajinin hücresel homeostazı koruduğunu göstermiş olsa da, farklılaşma ve gelişim süreçlerinde düzenlenen mitokondriyal ve metabolik geçişlerin rolü hakkında bilgiler sınırlıdır (Chan, 2020).

1.9. İnfertilite

Korunmasız ilişki olmasına rağmen 1 yıl boyunca doğal yollarla gebe kalınamaması durumu infertilite olarak adlandırılmaktadır. Erkek infertilitesi, son yılların önemli ve yaygın bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir ve bu durum birçok ülkede güçlü bir sosyal ve ekonomik etkiye sahiptir (Sharpe, 2012). Erkek infertilitesi, çiftlerin % 10 ila % 15'ini etkiler ve ciddi sağlık sorunlarından biridir ve bunlar arasında erkek faktörü tüm infertil çiftlerin yaklaşık %50 'sinde rol oynamaktadır (Tang vd., 2018).

Non-obstrüktif azospermi (NOA), erkek üreme bozukluklarının en ağır formudur ve spermatogenezdeki bozukluk nedeniyle olgun sperm üretilmez. Bu durumdaki bireyler, yalnızca mikroskopik cerrahiyle sperm çıkarılması yöntemiyle tedavi edilebilir. Bu işlemin başarı oranı %38-63 arasında değişmektedir. Sperm elde edilmesi, testis içindeki heterojenliği belirlemeye dayanır. Bu heterojenlik, testiste nadir görülen bazı seminifer tübüllerin aktif spermatogenez yapabilme kapasitesine sahip olmasıdır. Ancak çoğu seminifer tübül, spermatogenezde sorun göstermektedir. Bu nedenle, tek bir testiste ve hastalar arasında mevcut spermatogenez miktarı, seminifer tübüller arasında heterojen bir dağılım gösterir (Piechka vd., 2024).

Hücresel işlev bozuklukları, hem spermatogenetik germ hücrelerinde farklılaşma sürecinde hem de destekleyici somatik hücreler arasında meydana gelebilir. Testis somatik hücreleri, spermatogenezi fiziksel hücresel etkileşimler, hücre sinyalleşmesi, parakrin ve endokrin düzenleme gibi mekanizmalar yoluyla destekler. Ayrıca, bu hücreler mayoz sırasında üretilen genetik olarak benzersiz germ hücreler için bağışıklık sistemi tarafından korunmuş özel bir ortam sağlar. Somatik ve germ hücrelerinin normal gelişimi, işlevi ve hastalık süreçlerindeki farklılıklarını anlamak için tek hücre dizileme teknolojileri ile immün boyama gibi uzaysal çözünürlük sunan yöntemler kullanılmaktadır. Bu ileri teknikler, hücreye özgü aktivitelerin yanı sıra gelişim süreçlerini, yaşlanmanın etkilerini ve NOA'da spermatogenetik bozuklukların yol açtığı sapmaları ortaya koymaktadır.

1.10. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesi, çeşitli bozukluklardan kaynaklanabilen çok faktörlü bir durumdur. Varikosel, hiperviskozite semeni, testiküler yetmezlik, veziküler hasar, ejakülasyon bozuklukları, testiküler kanserler, endokrinolojik bozukluklar, bozulmuş spermatogenez, genital sistem enfeksiyonu ve immünolojik faktörler gibi sayısız faktör erkek infertilitesinde ana neden olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, uzun süre ısıya maruz kalma, böcek ilaçları, radyasyona ve manyetik dalgalara mesleki olarak maruz kalma, kemoterapi, elektronik cihazlar, ağır metaller, obezite, yaşlanma, sigara ve alkol tüketimi, beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı gibi çevresel ajanlar spermatogenezi ve sperm olgunlaşmasını etkiler ve erkek infertilitesine neden olabilir (Tang vd., 2018; Harchegani vd., 2018).

Non-obstrüktif azoospermi (NOA) vakalarının bir kısmının nedeni kromozomal bozukluklara (örneğin, Klinefelter sendromu veya AZF mikrolelesyonları) bağlanırken, çoğu nedeni açıklanamayan idiyopatik infertilite olarak sınıflandırılır. Nedeni bilinsin ya da bilinmesin, NOA'nın hücresel düzeydeki biyolojisini anlamak, etkili tedaviler geliştirebilmek için hayati önem taşır.

Reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından tetiklenen oksidatif stres, sperm DNA hasarı ve moleküler genetik anormallikler dahil olmak üzere çeşitli faktörler, İdiyopatik infertilite belirtilerinden sorumludur. Moleküler genetik anomaliler, erkek infertilitesinin etiolojisinde çok önemlidir, çünkü vakaların %15-%30'u, Y kromozomunda oluşan mikrolelesyonlardan kaynaklanmaktadır. Erkek infertilitesinin moleküler genetik temeli tam olarak açıklanmış değildir (Tahmasbpour vd., 2014; Agarwal vd., 2017).

1.11. Azoospermi

Azoospermi, erkek infertilitesinin ciddi bir formu olup, ejakülatta sperm bulunmamasıyla karakterizedir. Bu durum, genellikle nonobstrüktif (NOA) ve obstrüktif (OA) azoospermi olarak iki ana gruba ayrılır. Obstrüktif azoospermi, sperm üretiminin normal olduğu ancak üreme kanallarında tıkanıklık nedeniyle ejakülatta sperm olmaması durumudur. Non-obstrüktif azoospermi (NOA) ise testislerde sperm üretiminin azaldığı veya tamamen durduğu bir durumdur ve genellikle genetik, hormonal veya çevresel faktörlerle ilişkilidir. Son yıllarda genetik ve epigenetik faktörlerin bu durumdaki rolüne dair yapılan araştırmalar, tedavi seçeneklerini geliştirme potansiyeline sahiptir (Vijayalakshmi, 2012).

1.12. Azoospermik Hastaların Gruplandırması

Azoospermi, ejakülatta sperm hücresinin bulunmaması ile karakterizedir. Erkek infertilitesinin yaklaşık %10-15'ini oluşturan azoospermi, altta yatan patofizyolojik mekanizmalarına göre üç ana gruba ayrılmaktadır: pre-testiküler, testiküler ve post-testiküler azoospermi (Hwang vd., 2018).

Pre-testiküler azoospermi, LH (luteinizan hormon) ve FSH (Folikül uyarıcı hormon) seviyelerinin düşük olduğu ve testosteron seviyelerinin düşük ya da ortalama olması ile tanımlanmaktadır. Küçük testislere sahip erkeklerde non-obstrüktif azoospermi bulunmaktadır ve bu durum FSH ve LH düzeylerinin artması ile aynı yönde gerçekleşmektedir. Obstrüktif azoospermi olmayan erkekleri obstrüktif azoospermi olanlardan ayıran kesin non-invaziv prosedür bulunmamaktadır. Genel tanı için testis biyopsi örneği gereklidir (Jarvi vd., 2010).

1.12.1. Pre-Testiküler Azoospermi

Pre-testiküler azoospermi, testis dışındaki hormonal bozukluklardan veya hipotalamik-pituitar aks problemlerinden kaynaklanır. Bu durumda sperm üretimi için gerekli olan hormonlar yeterli düzeyde salgılanmaz. Hipogonadotropik hipogonadizm, Kallmann sendromu gibi genetik hastalıklar ve prolaktinoma gibi hormonal tümörler bu grupta yer alır. Ayrıca aşırı stres, obezite veya ilaç kullanımı gibi çevresel faktörler de pre-testiküler azoospermiye neden olabilir. Bu hastalarda testis boyutları genellikle küçüktür ve hormonal tetkiklerde FSH ve LH seviyelerinde bozukluklar saptanabilir. Bu grup azoospermik erkek

bireylerin %2'sini oluşturmaktadır; Pre-testiküler azoospermi durumuna sekonder testis yetmezliği de denir (Elzanaty, 2013; Hwang vd., 2018).

1.12.2. Post-Testiküler Azoospermi (OA)

Obstrüktif Azoospermi (OA) azoospermik erkek bireylerin %60'ını oranını oluşturur. sperm üretiminin normal olduğu ancak sperm hücrelerinin dışarı atılamadığı durumları ifade eder. Bu durum, genellikle epididim, vaz deferens veya ejakülatör kanal gibi yapılarıdaki tıkanıklıklar nedeniyle ortaya çıkar. Doğuştan bilateral vas deferens yokluğu, vazektomi veya genital travma gibi nedenler bu grupta yer alır. Ayrıca retrograd ejakülasyon da post-testiküler azoosperminin bir diğer nedenidir. Bu hastalarda hormonal incelemeler genellikle normaldir. Ancak tıkanıklıkların yerinin belirlenmesi için fiziksel muayene, ultrason ve diğer görüntüleme yöntemleri kullanılabilir. (Jarvi vd, 2010; Esteves vd., 2011; Hwang vd., 2018; Elzanaty, 2013).

1.12.3. Testiküler Azoospermi (NOA)

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) 2000 yılı verilerine göre, azoospermi tüm erkeklerin yaklaşık %1'ini, infertil erkeklerin %10–15'ini ve azoospermik erkeklerin %40'ını oluşturmaktadır (Cocuzza vd., 2013). Non-obstrüktif azoospermi (NOA), testis yetmezliğine neden olan bir durumdur. Y kromozom mikrodelsiyonu, seks kromozom bozuklukları, translokasyonlar, testis torsiyonu, varikozel (pampiniform pleksus damarlarının genişlemesi), inmemiş testis, radyasyon maruziyeti ve benzeri genetik bozukluklar ile çevresel faktörler testiküler yetmezliğe yol açabilir. Varikozel, testisten kirli kan taşıyan venöz damarların aşırı genişlemesidir. Genişleyen damarların içindeki kan akışı bozularak yönü değişir ve geriye doğru akarak testiste birikmeye başlar. Varikozel, genel erkek popülasyonunun %5–20'sinde, infertil erkeklerin %20–40'ında ve NOA'lı erkeklerin %5–10'unda rastlanan bir durumdur. Bu nedenle, varikozel onarımı infertil erkekler için en sık uygulanan cerrahi işlem olmaktadır (Elzanaty, 2013). Testiküler azoospermi, spermatogenez sürecindeki doğrudan bozukluklardan kaynaklanır ve testislerin kendisinden kaynaklanan problemlerle ilişkilidir. Bu duruma Klinefelter sendromu gibi doğuştan gelen genetik anomaliler, kabakulak orşiti gibi enfeksiyonlar, kemoterapi veya radyasyonun toksik etkileri neden olabilir. Ayrıca AZF bölgesi mikrodelsiyonları gibi genetik faktörler de bu gruba dahildir. Testiküler azoospermisi olan hastalarda genellikle FSH seviyeleri yüksektir ve testis hacminde azalma görülebilir. Tanıyı netleştirmek için testis biyopsisi yapılabilir ve spermatogenez

süreçlerinde duraklamalar tespit edilebilir (Esteves vd., 2011; Cocuzza vd., 2013; Hwang vd., 2018).

1.13. Non-Obstrüktif Azoospermi (NOA) Sınıflandırması ve Histopatolojik Bulgular

Normal spermatogenez görülen obstrüktif azoospermi hastalarının aksine, spermatogenez defekti bulunan non-obstrüktif azoospermi hastaları, testis biyopsilerinde histopatolojik bulgulara göre üç grupta sınıflandırılır. Birinci grup Maturasyon Duraklaması (MA) olup, spermatogenezin farklı aşamalarında sperm hücresi olgunlaşmasının durması ile karakterizedir. İkinci grup Hipospermatogenez, az sayıda sperm hücresi üretimi ile tanımlanır. Üçüncü grup ise Sertoli-cell-only Sendromu (SCOS) olarak adlandırılır ve erkek germ hücrelerinin tamamen kaybı ile birlikte testis biyopsisinde yalnızca Sertoli hücrelerinin tespit edilmesi ile ayırt edilir (Arıkan vd., 2024; Bernie vd., 2015).

1.13.1. Maturasyon Duraklaması (MA)

Maturasyon duraklaması (MA), spermatogenezin belirli bir aşamada durmasıyla karakterize edilen bir durumdur. Bu patolojik süreç, spermatogonya hücrelerin, spermatidlere dönüşmeden önceki farklılaşma basamaklarından birinde olgunlaşmaması sonucunda oluşur. MA, genellikle non-obstrüktif azoospermi (NOA) hastalarında gözlemlenir ve erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden biridir. MA'nin etiyolojisi multifaktöriyel olup genetik, çevresel ve hormonal faktörlerin bir kombinasyonu sorumlu tutulmaktadır. Genetik nedenler arasında kromozomal anormallikler, Y kromozom mikrolelesyonları ve gen mutasyonları bulunmaktadır. Ayrıca radyasyon maruziyeti, toksik kimyasallar ve enfeksiyonlar gibi çevresel faktörler de MA gelişiminde etkili olabilir. Hormonal olarak yaşanan düzensizlikler spermatogenezin ilerlemesini engelleyebilir. Histopatolojik olarak, testis biyopsilerinde spermatogenezin belirli bir aşamada tamamen durduğu gözlemlenir. Maturasyon duraklamasının meydana gelebileceği farklılaşma aşamaları, primer spermatosit, sekonder spermatosit veya spermatid evreleridir. MA'nin kesin tanısı, testis biyopsisinde germ hücre gelişiminin kesintiye uğradığı seviyenin belirlenmesi ile konur. Tedavi açısından, MA'nin geri dönüşü genellikle sınırlıdır. Ancak, mikro-TESE (mikroskopik testiküler sperm ekstraksiyonu) gibi yardımcı üreme teknikleri ile bazı durumlarda sperm hücresi elde edilmesi mümkündür. Bununla birlikte, genetik testler

ve MA'nin altında yatan nedenlerin araştırılması, hasta yönetiminde kritik öneme sahiptir (Bernie vd., 2015; Kim vd.,1996).

1.13.2. Hipospermatogenez

Hipospermatogenez'de (HP), seminifer tübüllerde çok az germ hücre bulunur. Bu duruma karşı, hipospermatogenezde spermatogenezin tüm evreleri histolojik tetkik ile anında izlenebilmektedir. Seminifer tübülüs başına düşen germ hücre sayısı azalır. Bu hastalarda maturasyon aşamaları normaldir ancak spermatogonyum, spermatositler, spermatidler ve spermatozoa dahil olmak üzere tüm basamaklarda orantılı bir azalma bulunmaktadır. Sonuç olarak, germinal epitel gevşek, incelmış ve az sayıda matür hücreye sahiptir. Etiyolojik faktörler açısından genetik, hormonal, çevresel ve toksik faktörler önemli bir rol oynamaktadır. Yardımcı üreme teknikleri (ART), özellikle mikro-TESE yöntemi, hipospermatogenezli hastalarda olgun spermatozoa elde edilmesi ve çocuk sahibi olunmasında umut verici bir seçenektir. (Cheng vd., 2017; Johannisson vd., 2003).

1.13.3. Sertoli Cell Only Sendromu

Sertoli Cell Only Sendromu (SCOS), testis biyopsisinde germ hücrelerinin tamamen eksik olduğu ve seminifer tübüllerin yalnızca Sertoli hücrelerinden oluştuğu nadir bir patolojik durumdur. Bu durum erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden biridir. SCOS, kantitatif spermatogenez defektlerini yansıtan histolojik bir patern olup, non obstrüktif azoospermi olarak ortaya çıkar. SCOS'un, azoospermik erkeklerin %26.3–%57.8'ini etkilediği gösterilmiştir.

Sertoli hücreleri kan-testis bariyeri oluşumuna katkıda bulunmakta ve germ hücre (sperm) üretiminde farklı hücre sinyal yollarında önemli rol üstlenmektedir. Bu hücreler hipotalamus tarafından FSH'a yanıt verirken spermatogenez sürekliliğini sağlamaktadır (Anniballo vd., 2000; Koh vd., 2006). Histolojik olarak, SCOS hastalarında seminifer tübüllerde germ hücrelerinin yer almadığı ve sadece Sertoli hücrelerinin bulunduğu gözlemlenir. SCOS'lu hastalar genellikle küçük testis boyutlarına, azalmış serum testosteron seviyelerine ve artmış gonadotropin (FSH ve LH) seviyelerine sahiptir. SCO sendromunun altında yatan nedenlerin anlaşılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Sendromun etyolojisi ve oluşum mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. SCOS'un etyolojisi multifaktöriyel olup genetik, çevresel ve hormonal faktörleri içerir. Y kromozomu

mikrodelesyonları ve kromozomal anormallikler (örneğin Klinefelter sendromu) SCOS'un sık görülen genetik nedenlerindendir. Çevresel faktörler arasında toksinler, radyasyon ve testis travması yer alabilir. Ayrıca hormonal eksiklikler de bu duruma katkıda bulunabilir. SCOS'un tedavisi genellikle yardımcı üreme tekniklerini içerir (Esteves vd., 2011; Wang vd., 2023).

SCO, tamamen (komplet) ya da odaklanmış (fokal) şekilde görülebilir. Komplet form, seminifer tübüllerin yalnızca Sertoli hücrelerinden oluştuğu ve hiç germ hücresi bulunmadığı bir durumdur. Fokal formunda, bazı tübüllerde germ hücreleri mevcut olsa da, spermatogenez hem kalite hem de miktar açısından bozulmuş durumdadır. (Turek ve vd., 1995). Şiddetli testis histolojisi ve sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle, SCOS hastaları doğal yolla çocuk sahibi olamazlar. Mikro-TESE ile sperm elde etme başarıları %22.5–%41, klasik TESE ile ise %6.3–%29 olarak bildirilmiştir. Ancak, SCOS hastalarında, ilk başarısız mikro-TESE sonrasında ikinci bir mikro-TESE ile başarılı sonuç elde etme oranı, diğer NOA tiplerine kıyasla çok düşüktür. Fizik muayene bulguları genellikle spesifiktir, ancak kesin tanı testis biyopsisi ile konur (McDougal vd., 2015; Singh vd., 2017; Wang vd., 2023).

1.14. Testisin Yapısı

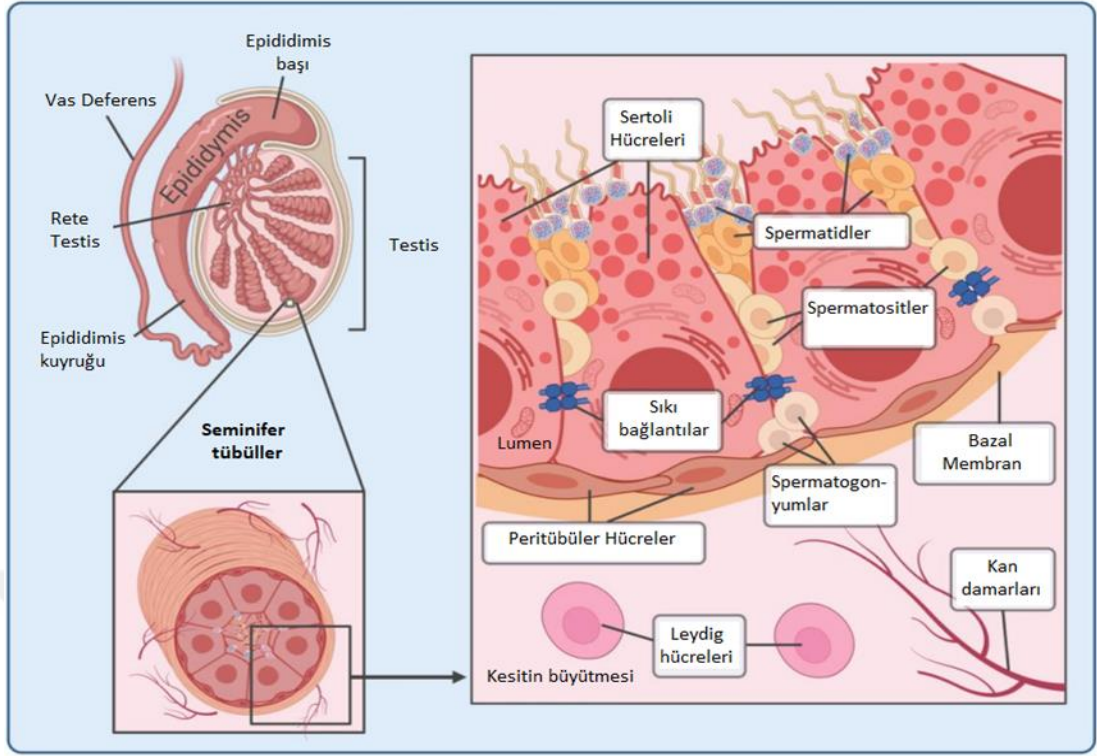
Testis, erkek üreme sisteminin temel organlarından biri olup, sperm üretimi ve testosteron salgılanmasından sorumludur. İnsan testisi, oval şekilde bir yapı olup yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2.5-3 cm genişliğinde ve 10-15 gram ağırlığındadır. Testisler, skrotum adı verilen deri ve kas yapısından oluşan bir kesede yer alır ve vücut sıcaklığından yaklaşık 2-3°C daha düşük bir sıcaklıkta bulunarak sperm üretimi için optimal bir ortam sağlar.

Testislerin oluşumu, embriyonik gonadlardan testislerin gelişmesine yönlendiren SRY geninin ekspresyonuyla ile genetik olarak kontrol edilmektedir. İnsanlarda gebeliğin dördüncü haftasına kadar, embriyonik epiblastın pluripotent hücrelerinden türetilen primordiyal germ hücreleri çoğalır ve yolk kesesinin endoderminden, insanlarda gebeliğin yedinci haftasında morfolojik olarak farklı hale gelen farklılaşmamış gonada göç eder. Testisin histolojik gelişimi gebeliğin üçüncü ayının sonuna kadar büyük ölçüde tamamlanır (Shalet, 2009).

Testisler, tunika albuginea denilen ve yoğun bağ dokusundan oluşan bir kapsülle çevrilmiştir. Testislerde, ayrıca karın zarından gelişen tunika vaginalis denilen ve tunika

albuginea'nın dışında yer alan bir kılıf daha bulunur. Kapsülden bezin içine doğru oluşan fibröz uzantılar (septum) testisi 250 adet testiküler lobüllere (bölmeler) ayırır. Lobüllerde gevşek bağ dokusuyla sarılmış 1-4 tane seminifer tübül bulunur. Her testiste 250-1000 seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller, spermatogenezin gerçekleştiği kıvrımlı kanallardır ve her tübül yaklaşık 30-70 cm uzunluğundadır. Seminifer tübüller, rete testis adı verilen bir ağ yapısına bağlanır. Rete testis, spermilerin epididimise iletilmesini sağlar. Epididimiste olgunlaşan spermier daha sonra vaz deferens aracılığıyla taşınır.

Testis'in yapısı iki farklı bölgeye ayrılmıştır bu alanlar interstisyum ve seminifer tübüller olarak bilinir. Interstiyumda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel (Leydig) hücreleri bulunur. Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron hormonu, erkeğin ikincil cinsiyet özelliklerini belirler. Seminifer tübülleri sperm hücrelerini üretir, leydig hücreleri ise androjen hormonlarını salgılar. Sperm üretimini sağlayan spermatogonial kök hücreler, seminifer tübüllerin epitelinde Sertoli hücreleriyle desteklenmektedir. Seminifer epiteli, Sertoli hücrelerini ve çoğalma ve farklılaşma geçiren çeşitli germ hücresi popülasyonlarını içeren karmaşık çok katlı bir epiteldir. Spermatogonyumlar bazal laminaden lümene doğru matür spermatozoaya farklılaşır. Germ hücreleri, bazal lamina üzerinde duran ve seminifer tübülün lümenine doğru apikal olarak uzanan Sertoli hücreleri tarafından tamamen veya kısmen çevrelenir. Çok sayıda germ hücresi, seminifer epitelin bazal bölgesinden adluminal bölgelerine doğru yer değiştirmesi, tüm germ hücreleri arasında birbirine geçen Sertoli hücrelerinin lateral sitoplazmik uzantıları tarafından desteklenir (Wanger vd., 2008; Kerr, 1992; Thumfart ve Mansuy, 2023) (Şekil 1.5).



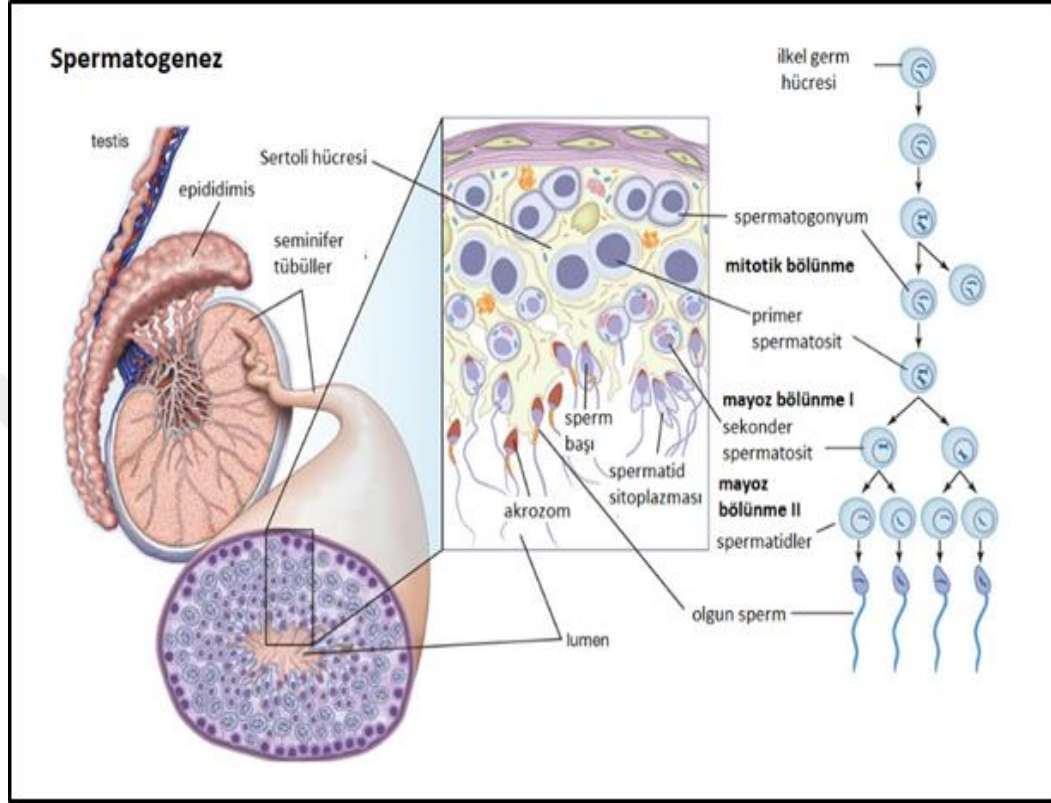
Şekil 1.5. Memelilerde seminifer tübülün kesiti (Thumfart ve Mansuy, 2023'ten modifiye edilmiştir).

1.15. Spermatogenez

Spermatogenez seminifer tübüllerde spermatogonyumdan olgun sperm hücrelerinin geliştiği bir süreçtir. Memelilerde spermatogenez en karmaşık hücresel farklılaşma olaylarından biridir ve mitoz, mayoz, spermiyogenez ve spermiyasyon olarak adlandırılan aşamalardan oluşmaktadır (Şekil 1.6). Spermatogenezde, spermatogonyumlar bazal membrandan lümene hareket eder ve olgun spermatozoa haline geldikten sonra lümene doğru ve ardından epididime geçerler. Epididimde spermatozoa tamamen olgunlaşıp ve hareket edebilir hale gelene kadar korunmaktadır. Tüm spermatogenik süreç insanda yaklaşık 64 gün ve olgun spermatozoanın ejakülatta belirmesi 74 gün sürmektedir (Walker, 2009; Mathur vd, 2011).

Endoderm'den köken alan germ hücreleri, embriyonik dönemde seminifer tübüllere geçerek spermatogonyum olarak yerleşirler. Sertoli hücreleri, puberte öncesinde seminifer epitelin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Hipofizden salgılanan gonadotropinler, puberteden önce spermatogonyumların gelişimini başlatır ve yaşam boyu devam etmektedir. Spermatogonyal kök hücreler seminifer tübülde bazal kompartımanda bulunurken, birinci ve ikinci spermatisitler, yuvarlak spermatid ve elonge spermatid adluminal bölümde bulunur.

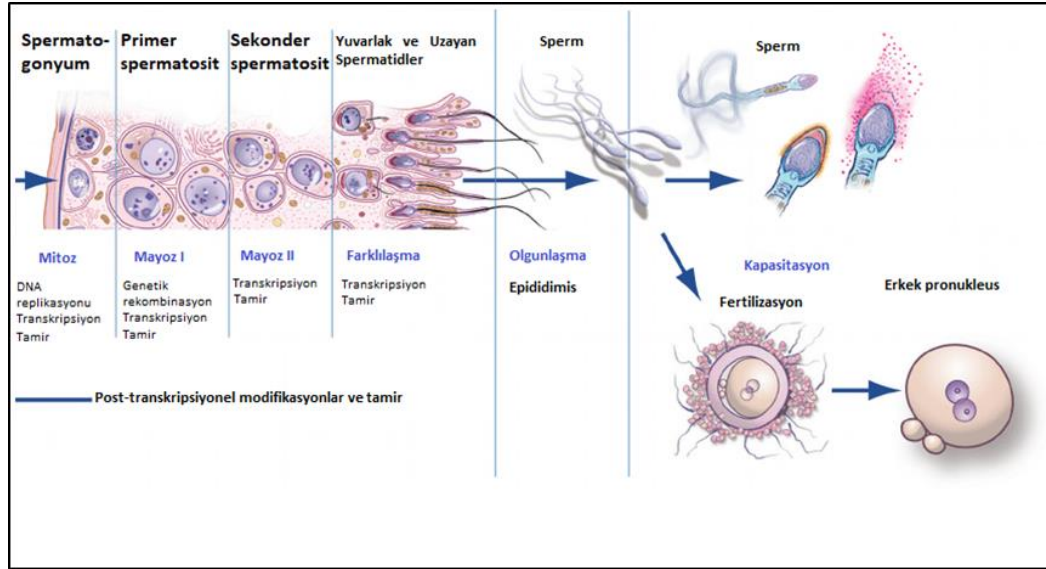
Spermatogenez sürecindeki germ hücreleri, spermatogonyum, spermatosit ve spermatid olmak üzere üç farklı aşamada incelenir (Du Plessis vd., 2011; Allais-Bonnet ve Pailhoux, 2014; Mathur vd., 2011; Griswold, 2016).



Şekil 1.6. Spermatogenez süreci (Allais-Bonnet ve Pailhoux, 2014'ten modifiye edilmiştir.)

1.16. Spermatogenezde Önemli Adımlar

Mitoz, mayoz, spermiyogenez ve spermiyasyon, spermatogenez sürecinin çeşitli evreleridir ve bu evreler boyunca olgun spermatozoa haline gelerek lümene doğru hareket ederler. Spermatogenezin Seminifer Epitel döngüsü (Şekil 1.7) tüm süreci tanımlar (du Plessis vd., 2011).



Şekil 1.7. Spermatogenezin sürecinde hücre bazlı değişikliklerin şeması (du Plessis vd., 2011'ten modifiye edilmiştir)

1.16.1. Spermatogonyumlar

Bireyin fetal döneminde, primordiyal germ hücreleri testislerde yer alır ve zamanla spermatogonyumlara dönüşür. Ancak, yetişkinlik dönemine gelene kadar spermatogonyumlar herhangi bir farklılaşma göstermez. Bazal membran üzerinde yer alan olgunlaşmamış hücreler olan spermatogonyumlar, ergenlik döneminde mitoz bölünme geçirerek germ hücrelerinin sayısını artırır. Mitotik bölünmeyle sayıları artan spermatogonyumlardan, mayoz bölünme sonucu haploid yuvarlak spermatidlerin oluşumu ve yuvarlak spermatidlerin olgun spermatozoaya farklılaşmasıyla sonuçlanan süreç spermatogenez olarak tanımlanmaktadır.

Germ hücreleri mitoz sonrası spermatogonyum hücresi A ve B olarak iki gruba ayrılır. Spermatogonyum A, bazal membrandan tübülün lümenine göç eden spermatogonyum B'lere farklılaşır diğer kısmı ise kök hücre olarak görev yapmaktadır. Pregenitör hücreler olarak bilinen tip B spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşır. Primer spermatositler birinci mayoz bölünme ile haploid sekonder spermatositleri oluşturur ve ikinci mayoz bölünme gerçekleşerek yuvarlak spermatidler oluşur (Barratt vd., 1995; Kierszenbaum, 2006; Aydos, 2008).

1.16.2. Spermatositler

Primer spermatositler, ergenlik döneminde spermatogonyum tip B'lerin mitoz bölünmesiyle meydana gelir. Bu hücreler mayoz bölünmesinin başlatılmasında rol almaktadır. Birinci mayoz bitince, primer spermatosit'ten iki sekonder spermatosit oluşmaktadır. İkinci mayoz'da, sekonder spermatositlerden dört adet yuvarlak spermatid oluşur. Yani, bir spermatosit, haploid sayıda kromozomu olan dört spermatid oluşturur. Bu evrenin, büyük kısmı KTB'nın iç kısmında, luminal bölümünde gerçekleşmektedir (Kierszenbaum, 2006).

1.16.3. Spermatidler

Spermatogenezin son aşaması spermatid hücrelerdir. Round spermatid sonrası hücreler spermiogeneze uğrar ve metamorfoz geçirirler. Bu süreçte spermatidin sitoplazmasında ve çekirdeğinde belirgin morfolojik, hücresel ve moleküler değişimler meydana gelir ve sitoplazmik olgunlaşma dönemi gerçekleşir. Yaklaşık 7-8 µm çapında küçük boyutları ve yoğunlaşmış kromatin bölgelerine sahip çekirdek yapılarıyla tanımlanabilen haploid spermatidler, bu özellikleriyle belirginleşir. Seminifer tübülde, özellikle lümene yakın yerlerde görülür. Spermiyogenez, spermatogenez diferansiyasyon basamağının son aşamasıdır ve spermatotidler tarafından gerçekleştirilmektedir (Kierszenbaum, 2006; L Mescher, 2013).

1.16.4. Spermiyogenez

Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasını oluşturan, spermatidlerin olgun spermatozoa haline dönüştüğü bir farklılaşma sürecidir. Bu süreç, haploid spermatidlerde hem morfolojik hem de moleküler düzeyde önemli değişikliklerle karakterizedir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermiyogenez sırasında spermatidlerin çekirdeğinde genetik materyalin yoğun şekilde paketlenmesi gerçekleşir. Histon proteinleri, transisyon proteinleri aracılığıyla protaminlerle aşamalı olarak yer değiştirir, bu da DNA'nın daha sıkı bir şekilde paketlenmesini sağlar ve çekirdek, yoğunlaşmış bir yapı kazanır. Spermiyogenezde, spermatidin ön kısmında akrozom adı verilen yapı gelişir. Akrozom, golgi aparatından köken alır ve içindeki enzimlerle döllenme sırasında oositin zarların eritilmesini sağlar. Orta kısımda mitokondriler, spiral şekilde düzenlenerek enerji üretimini optimize edecek bir yapı oluşturur. Bu enerji, sperm hücresinin hareketliliğini sağlamak için

gereklidir. Kuyruk uzamasıyla birlikte, spermatidler hareket kabiliyeti kazanır. Sitoplazmanın büyük bir kısmı kaybedilirken, organeller yeniden düzenlenir ve hücrede gereksiz yapılar elimine edilir. Bu süreçte Sertoli hücreleri, gelişen spermatidleri besler ve destekler. Ayrıca, spermiyogenez boyunca germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki hücresel bağlantılar, düzenli ilerlemeyi ve hücresel değişimleri koordine eder. Spermiyogenez tamamlandığında, spermatidler hareket yeteneği kazanmış olgun spermatozoa haline gelir ve seminifer tübüllerin lümenine salınır. Spermiyogenez, hem yapısal hem de işlevsel açıdan sperm hücresini döllenmeye hazır hale getiren karmaşık bir süreçtir ve bu süreçte meydana gelen bozukluklar erkek kısırlığına yol açabilir (Ross ve Pawlina, 2006; Gartner ve Hiatt, 2007; Cheng ve Mruk, 2012).

1.16.5. Spermiyasyon

Spermiyasyon, spermatogenezin son aşaması olan spermiyogenez sürecinin tamamlanmasıyla birlikte, olgun spermatozoaların Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübüllerin lümenine salınmasıdır. Bu süreç, olgun spermatozoanın testislerden epididime taşınmak üzere hazır hale gelmesini sağlar ve erkek üreme sistemindeki temel aşamalardan biridir. Bu süreçte gelişimini tamamlayan spermatozoa Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer lümene gider ve rete testise iletilir. Bu olay adluminal bölümde meydana gelir. Bu süreç birkaç gün içinde gerçekleşir. Spermatid'in baş kısmı ve sitoplazmasının yeniden modellenmesi, adezyon yapılarının bağlantılarının ayrılması ve spermatozoanın Sertoli hücrelerinde uzaklaşması, spermiyasyonun çeşitli aşamalarıdır. Spermiyasyon aşamasında ise bu bağlantıların kaybı, spermilerin serbest kalmasını mümkün kılar.

Spermiyasyon sürecinde adezyon kompleks yapılar normalde olgunlaşmış spermin doğru bir şekilde çıkması için beraber görev yapmaktadır. Bu aşamada ESs (Ektoplazmik spesifikasyonların) yapısının çözülmesi gerekir. İntegrin kaynaklı adezyonlar, çözme sürecinde spermatid için sıkıca bir bağlanma sağlar. Spermatid başı ve sitoplazması, spermatozoanın yapısını oluşturmak üzere kapsamlı bir yeniden düzenlenme süreci geçirir. Sertoli hücrelerinin spermatidlere bağlılığını sağlayan yapıları olan (ES) yapılarının sökülmesi gerçekleştirilir. Bu özel yapılar, spermatid sitoplazmasının uzaklaştırılmasını ve adezyon bağlantılarının çözülmesini kolaylaştırır. Spermatid, Sertoli hücresinin sitoplazması geri çekildikçe seminifer tübül lümenine doğru iter. Spermatid, Sertoli hücresinden ayrılır ve geride kalan ektoplazmik yapılar (rezidüel cisim) Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. ES yapısından ayrılma sürecinde, adezyon ile ilişkili bir protein alt grubu görev almakta

kalan proteinler kopana kadar sürekli bulunup daha sonra lümen içine spermatozoa anlık serbest bırakılmasına aracılık edebilmektedirler. Bu süreçte çeşitli aşamaları bittikten sonra ve destekleyici Sertoli hücreleri olgun spermatozoaları lümende serbest bırakmak için spermatogenez sonunda yer alan adezyon bağlantıları sürekli modifiye edilir. Spermiyasyonun etkili bir şekilde gerçekleşmesi, hormonların, özellikle testosteron ve FSH'nin (folikül uyarıcı hormon) düzenleyici etkilerine bağlıdır. Bu hormonlar Sertoli hücrelerinin işlevlerini destekleyerek spermiyasyon sürecini kontrol eder. Ayrıca, bu aşamada gelişimlerini tamamlayan spermatozoa henüz tam hareket kabiliyeti kazanmazlar ve epididimde geçirecekleri süreçle bu yeteneklerini geliştirirler. Spermiyasyonun aksamaması durumunda olgun spermler lümene salınamaz ve bu durum erkek kısırlığına yol açabilir. Bu nedenle, spermiyasyon, üreme sürecinin kritik bir aşaması olup hem yapısal hem de hormonal düzenlemelere bağlı karmaşık bir mekanizmayı içerir (O'Donnell vd., 2011).

1.17. Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları

Spermatogenez, somatik Sertoli hücreleriyle germ hücreleri arasındaki fonksiyonel etkileşime bağlı olarak gerçekleşmektedir. Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri çevreleyerek bu hücrelere destek sağlamaktadır. Seminifer epitelin bazal membranından lümene doğru uzayan somatik bileşenler olarak tanımlanan Sertoli hücreleri, spermatogenezde rol oynayan en önemli somatik hücrelerdendir.

Bu hücreler FSH ve testosteron gibi dışardan gelen hormonlara, parakrin ve endokrin uyarıya yanıt olarak, germ hücrelerin farklılaşması için fonksiyonel ve yapısal destekte bulunmaktadır. Seminifer tübülün bazal kısmına yakın yerleşim gösteren Sertoli hücreleri arasında bulunan sıkı bağlantılar epiteli bazal ve adluminal kompartman olarak ikiye bölen kan-testis bariyerini (KTB) oluşturmaktadır. Spermatogenez sırasında oluşan germ hücrelerinin geçişini sağlamak için Sertoli ve germ hücreleri arasındaki hücre-hücre bağlantıları bozulup, tekrar birleşir bu da Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan çok özelleşmiş KTB'nin sürekliliğini sağlar. Bu süreçte etkili olan mekanizmalar henüz yeterince aydınlatılamamıştır (Griswold, 1998).

Bazal kompartmanda bulunan spermatogonya dolaşımdaki kan kaynaklı maddelerle ile temas halindedir. Adluminal kompartman Sertoli hücrelerinin sekretuar ve endositik aktivitesi tarafından oluşturulmuş bir çevre içinde diğer tüm germ hücreleri ile bağlantılıdır (Griswold, 1998; Alves vd., 2013).

Spermatogenezin farklılaşma sürecinde olan germ hücrelerinin lokalizasyonunu ve lümene doğru hareketlerini Sertoli hücreleri düzenlemektedir. Bu hücreler birbirleriyle yaptıkları sıkı bağlantılarla germ hücrelerini aralarında muhafaza ederek kandaki bulunan savunma hücrelerinin otoimmünitesinden korumaktadır.

Sertoli hücreleri, büyüme faktörleri, immunomodulator faktörler (interlökinler ve sitokinler gibi), anti-apoptotik faktörler, hormonlar, ekstraselüler matriks proteinleri, transferin, eritropoetin gibi birçok proteini ve seminifer tübül içerisindeki sıvıyı üretirler. Sertoli hücreleri spermatogenez sürecinde oluşan kalıntı organelleri ve işlevsiz germ hücrelerini fagosit ederler (Luca vd., 2018).

Sertoli hücrelerinden salgılanan yeni ürünlerin keşfinden bu yana, bu hücreler hem kronik inflamatuvar hem de dejeneratif hastalıkları tedavi etmeyi amaçlayan deneysel hücre transplantasyonu ve ko-transplantasyon protokollerinde kullanılmıştır. Diyabetes mellitus, Laron cüceliği ve Duchenne kas distrofisi gibi çeşitli kronik veya otoimmün hastalıkların hücre nakli çalışmaları ve cilt allograft reddinin önlenmesine yönelik çalışmalar, Sertoli hücrelerinin kullanım alanları içinde yer almaktadır. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, Sertoli hücrelerinin allojenik ve xenogenik hücelere karşı immün koruyucu yeteneği, güçlü immünomodulator özelliklerini açıkça kanıtlamıştır.

Yayınlanmış birçok laboratuvar ve klinik öncesi deneme, ko-kültürde veya birlikte transplantasyonda izole edilmiş Sertoli hücrelerinin, hem immünomodulator hem de trofik faktörlerin üretimi ile birkaç farklı hücre tipinin hayatta kalmasını uzatma yeteneğini koruduğunu açıkça ortaya koymuştur. Sertoli hücrelerinin xenograft modellerde bile immün koruma sergilemeleri, hücre transplantasyon terapisine ilişkin kullanışlılığını, önemli ölçüde arttırmıştır (Luca vd., 2018).

1.18. Amaç

Sürekli fisyon ve füzyonla uğrayan, hücrel homeostazda önemli bir rolü olduğu bilinen ve dinamik bir organel olan mitokondrinin, insanda gerçekleşen ve yüksek enerji gerektiren spermatogenez sürecindeki rolü henüz aydınlatılamamıştır. Son yıllarda Varuzhanyan ve ark.'nın, farelerde spermatogenez sürecinde, germ hücrelerinde mitokondriyal dinamiğin rolünü inceleyen çalışmalarında, mitokondriyal füzyonun, spermatogonyumlarda farklılaşma ve mayoz bölünme için gerekli olduğu, Mff, Mfn1, Mfn2

gibi fisyon ve füzyon genlerinin yokluğunda farelerde daha az olgun sperm oluştuğu ve spermatogenez hasarı olduğu gösterilmiştir (Varuzhanyan vd., 2021). Sertoli hücreleri, spermatogenez sürecinde çok önemli rolü olan, germ hücrelerini mekanik ve metabolik olarak destekleyen, germ hücreleri ile sıkı temasta olan hücrelerdir. İnsanda nörodejenaratif hastalıklar, gelişim geriliği, mitokondriyal hastalıklar, diyabet, kanser, kalp yetmezliği gibi mitokondriyal dinamiğin incelendiği birçok hastalıkla ilgili çalışma bulunmaktadır (Serasinghe ve Chipuk, 2017; Chan, 2020). Buna karşın insanda erkek infertilitesinin en önemli nedeni olan, etyolojisi henüz tam aydınlatılamamış, tedavi konusunda yeni gelişmelere ihtiyaç duyulan NOA'da mitokondriyal dinamiğin rolünün incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında NOA ve OA tanısı almış olguların Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamik genlerinin ifade profillerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Spermatogenez sürecindeki bozuluktan kaynaklanan ve ejakülatta sperm olmaması olarak tanımlanan NOA hastalarında mitokondriyal kalite kontrolündeki değişimi analiz edebilmek amacıyla spermatogenez normal olarak kabul edilen OA tanısı almış bireyler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada NOA ve OA grubundaki olguların mikro TESE yoluyla alınan testis biyopsi örneklerinden Sertoli hücreleri izole edilmiştir (Şekil 2.1). Sertoli hücrelerinin izolasyonu takiben, Sertoli hücrelerinde mitokondriyal füzyon belirteci olarak (MFN1, MFN2, OPA1) genleri, fisyon belirteci olarak DRP1 ve DRP1 reseptörleri (FIS1, MFF, MID49, MID51, INF2) ve mitofaji belirteci olarak (PINK1, PARKIN, LC3, FIS1) gen ifadeleri QRT-PCR ile incelenmiştir.

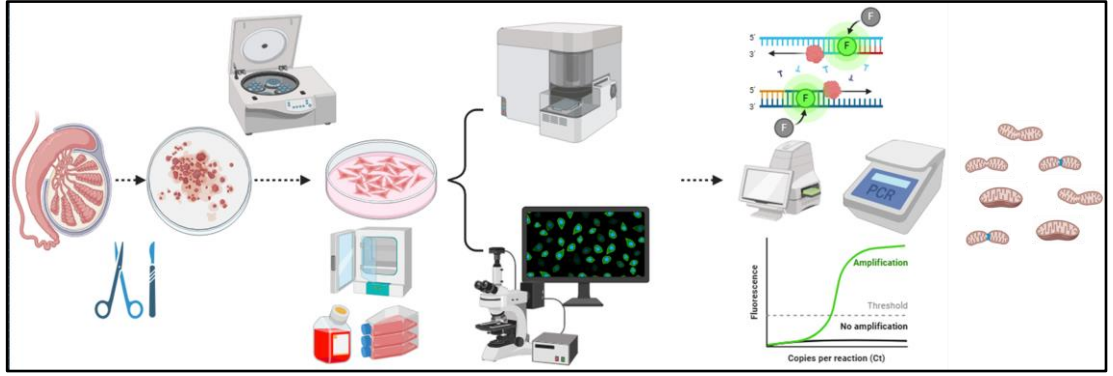
Bu çalışmada, germ hücrelerinin diferansiyasyonunda ve spermatogenezde çok önemli rolü olduğu bilinen, Sertoli hücrelerindeki mitokondriyal kalite kontrolünün etkinliği, nedeni henüz tam olarak aydınlatılamamış azoospermisi olan NOA hastalarında ilk kez araştırılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hasta Seçimi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Kliniğine ve Üreme Sağlığı Araştırma ve Uygulama Merkezi (USAUM)'ne infertilite şikayeti ile gelen, 20-40 yaş aralığında olan, kendilerine mikro TESE operasyonu yapılan, rutin klinik muayene ve rutin istenen tetkikler dahilinde, aşağıda yer alan dahil edilme ve edilmeme kriterlerine göre ayırıcı tanısı yapılmış, fizik muayene, hormon ölçümleri, skrotal eksplorasyon ve testis biyopsisi sonuçlarına göre; nonobstrüktif azoospermi (NOA, n=16) ve obstrüktif azoospermi (OA, n=6) tanısı konan, bilgilendirilmiş gönüllü onam formunda yazılanlar kendilerine sözel ve yazılı olarak anlatılıp, formdaki gerekli yerler işaretlenmiş ve imzalanmış olarak onamları alınan toplam 22 infertil erkek birey çalışmaya dahil edilmiştir. Bu infertil bireylerin, rutin tetkik ve tedavi için alınan örnekleri kullanıldıktan sonra arta kalan ve atılacak olan testis dokusundan Sertoli hücreleri izole edilmiştir.

Her hastanın FSH, LH ve testosteron hormon düzeyleri klinik olarak değerlendirilmiştir. Mikrodelesyon taşımayan Y kromozomuna ve normal karyotipe sahip NOA hastaları çalışmaya dahil edilmiştir. Ultrason ile hastaların testiküler volümleri ölçülmüştür. Transrektal ultrasonografik incelemede distal ejakülatör kanal patolojileri olanlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Semen örnekleri Dünya Sağlık Örgütü 2010 yılı çalışması esas alınarak değerlendirilmiştir (Cooper vd., 2010). 3 günlük cinsel perhizden sonra semen analizinde, santrifüj sonrasında azoospermi saptanan hastalarda, işlem en az iki hafta sonra tekrarlanarak azoospermi olduğu teyid edilmiştir. Klinik muayene, hormon değerleri, skrotal eksplorasyon, testis biyopsi sonuçlarına göre NOA tanısı konan hasta grubu (n=16), OA tanısı konan ise kontrol grubu (n=6) olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya hipogonadotropik hipogonadizm, kriptorşidizm, klinik varikosel, genital enfeksiyonu olan hastalar dahil edilmemiştir.



Şekil 2.1. İş akış şeması. Testis biyopsi örneklerinin toplanması ve Sertoli hücrelerinin izolasyonu; hücrelerin kültürü ve flow sitometri ve konfokal mikroskopla hücrelerin karakterizasyonu; Sertoli hücrelerinden RNA izolasyonu ve QRT-PCR ile gen ifade analizleri.

2.2. Testis Dokusundan Hücre İzolasyonu

- NOA ve OA hastalarından mikro TESE yöntemiyle alınan doku örneklerinden Sertoli hücre izolasyonu daha önce tanımlanan protokole göre yapılmıştır (Mirzapour vd., 2012; Lakpoour vd., 2017).
- OA ve NOA hastalarından (0.02–0.03 cm³) skrotal eksplorasyon sırasında alınan testis doku örnekleri DMEM/F12 besiyeri ve penisilin streptomisin (pen/strep) solüsyonu içeren taşıma tüplerine bu doku örnekleri koyularak buz üzerinde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki laboratuvara Sertoli hücre izolasyonu yapılmak üzere getirilmiştir.
- Alınan doku örneği %2'lik penisilin/streptomisin bulunduran fosfat tamponlu salin (PBS) ile üç kez yıkanmıştır
- Üç kez yıkama aşamasından sonra doku bistüri ve insülin iğnesi ile küçük parçalara bölünmüştür.
- Parçalanmış doku %2'lik penisilin/streptomisin içeren PBS ile falkona aktarılmıştır ve 150 g'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Falkona aktarılmadan önce hücrelerin pipet ucuna ve falkona yapışması sonucu hücre kaybı yaşanmaması için %30 FBS'li PBS ile bloklama işlemi yapılmıştır.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır ve önceden hazırlanan filtre edilmiş kollajenaz-IV ve DNase enzimi içeren Dulbecco's Modified Eagle (DMEM/F-12) ile biraz pipetleme yapılarak pelet üzerine eklenmiştir ve 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 25 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

- Enzimatik parçalanmadan sonra, 300 g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır ve süpernatant kısım 1ml FBS içeren ayrı falkona aktarılmış, ayrılmış pelet üzerine Tripsin/EDTA (TE) eklenmiştir ve 5 dakika 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir.
- 5 dk. sonunda karışım etüvden alınmış, pipetaj yaparak hafifçe karıştırılmıştır ve TE inaktivasyonunun sağlamak amacıyla üzerine 400ul enzim inhibitörü olan FBS eklenerek 500 g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası pelet 6 ml DMEM/F12 besiyerinde resüspanse edilmiş ve T25cm² flaska ekim yapılarak etüve kaldırılmıştır.
- Üst kısım ise bir önceki aşamadaki 1ml FBS içeren süpernatant ile birleştirilmiş ve 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pelet 1,5 ml besiyerinde dondurma solüsyonu ile resüspanse edilmiştir. Dondurma tüpleri içerisine alınan 1.5 ml hücre süspansiyonu üzerine %10 DMSO içeren besiyeri yavaş yavaş eklenmiş ve tüpler dondurma kabına yerleştirilmiştir.
- Öncelikle 1 saat -20°C'de bekletildikten sonra derin dondurucuya (-80°C'de) kaldırılmıştır.

2.3. Sertoli Hücrelerinin İzolasyonu

Germ hücrelerinden izole edilen Sertoli hücrelerini kültür etmek için flasklar 1ml jelatin ile 37°C'de 60 dakika inkübe edilerek kaplanmıştır. Daha sonra kaplanmış flasklar, %0.5 fetal bovin serum içeren DMEM ile yıkanmıştır. Enzimatik parçalanma ile elde edilen Sertoli hücreleri ve germ hücrelerinin karışık süspansiyonu, jelatin kaplı flasklara yerleştirilerek %5 CO₂ içeren 37°C'de inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra, yapışmayan germ hücreleri atılmıştır. Yapışan Sertoli hücreleri %20 FBS içeren DMEM besiyerinde 37°C'de inkübe edilmiştir. 5.gün sonunda örnekler steril hücre Sıyrıcı (cell-scraper) yardımı ile kazınarak toplanmıştır ve ribonükleik asit (RNA) izolasyonu için 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant dökülerek pelet 1ml trizol içinde 1.pasaj olarak RNA izolasyonu için -80°C'e kaldırılmıştır.

2.4. Sertoli Hücrelerin Karakterizasyonu

Sertoli hücrelerinin karakterizasyonu akım sitometrik yöntem ile yapıldı.

Sertoli hücrelerinin karakterizasyonu, GATA Bağlayıcı Protein 4 (GATA4-PE) ve Vimentin-AlexaFlour488 (Biolegend) antikorları kullanılarak akım sitometri ile yapıldı.

1) İlk olarak yapışan Sertoli hücrelerini T25cm2 flasktan ayırmak için içindeki besiyeri atıldı ve 1.5 ml Tripsin/EDTA solüsyonu ilave edildi. Daha sonra 37°C'deki etüvde 3 dakika bekletildi ve bu süre sonunda flaskın içine 3 ml besiyeri koyularak tripsinin inaktivasyonu sağlandı.

2) Tripsinize edilen hücreler 1ml 1X PBS ile yıkandı, 3000 g'de 4 dakika santrifüj edildi ve daha sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı.

3) Peletin üzerine yeniden PBS eklenmiş ve santrifüj işlemi yapıldıktan sonra süpernatant kısmı alındı.

4) Fiksasyon aşamasında düşük hızda vortekslenen hücrelere (pelet) 1ml %4 PFA (paraformaldehyde) damla damla eklendikten sonra oda ısısında 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Bu aşamada İnkübasyon sonrası PBS ile iki kere 8000 g'de 5 dakika santrifüj edilip yıkandı.

5) Permeabilizasyon aşamasında, pelete 1 ml Triton X-100 (%0.1) eklendi ve karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

6) İnkübasyon bitince pelet üzerine tekrar PBS eklendi ve iki kez (8000 g'de 5 dakika santrifüj) yıkandı.

7) Daha sonra %5 FBS içeren PBS ile hazırlanan blocking buffer solüsyonu ile hücreler çözülmüş ve 5x10⁵ hücre 45 µl olacak şekilde eppendorf tüplere dağıtıldı. Tüpler Vimentin, GATA4 (BioLegend) ve unstain olarak kodlandı.

8) Antikorlar kendilerine ait etiketlenen tüplere eklendikten sonra karanlıkta 60 dakika 37°C'de inkübe edildi.

9) İnkübe edildikten sonra hücreler iki kez PBS ile 8000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım uzaklaştırıldı.

10) PBS içerisinde pelet yeniden süspanse edildi, ACCURİ C6 akım sitometri cihazında sonuçlar analiz edildi.

2.5. RNA İzolasyonu, RNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü

2.5.1. RNA İzolasyonu

1) 1ml trizol içindeki Sertoli hücreleri -80°C' den çıkarılmıştır ve oda ısısında 5 dakika bekletildi.

2) Ependorf tüplere 200 µl kloroform eklenmiş 15 saniye karıştırıldıktan sonra oda ısısında 10 dakika bekletildi.

3) Daha sonra hücreler 12.000 g'de (+4 °C) 15 dakika santrifüj edildi.

4) Santrifüjden sonra üç katman oluştu; ependorfların en üst katmanı olan şeffaf RNA fazı pipetle yavaşça çekilerek yeni tüplere aktarıldı.

5) 500 µl izopropanol tüplerin üzerine eklendi 10 dakika oda ısısında inkübasyonun ardından 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi (+4°C). Santrifüj bittikten sonra tüplerin dibinde RNA peleti (beyaz renkli) oluştu.

6) En üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı, tüplere 1 ml % 75'lik etil alkol eklendi ve tüpler 7400 g'de (+4 °C) 5 dakika santrifüj edildi.

7) Tüplerin dibinde oluşan RNA peleti zarar vermemek için üstteki etil alkol dikkatlice uzaklaştırıldı.

8) Ependrof tüplerin kapakları açık olarak oda sıcaklığında temiz bir yüzeye yerleştirildi ve etil alkolün buharlaşması sağlandı.

9) Daha sonra her tüpe peletin büyüklüğüne göre 35-70 µl RNaz enzimi içermeyen steril su eklenerek RNA'ların çözülmesi sağlandı. RNA su ile çözüldükten sonra ölçüm için buz üstünde saklandı.

2.5.2. RNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü

OA ve NOA hastaların Sertoli hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinin saflıklarını ve miktarlarını belirlemek için spektrofotometrik ölçüm yöntemi kullanıldı. RNA saflık ve miktar değerleri BioTek Epoch spektrofotometre cihazında Gene 5 programında 260/280 nm'de belirlendi.

2.6. İzole Edilen RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

Örneklerimizden izole ettiğimiz RNA'larla cDNA sentezi yapmak için, her bir örnekten en az 1000 ng RNA kullanılarak iScript Reverse Transcription Supremix Reaksiyon Buffer (170-8841 Bio-Rad) ile cDNA sentezlenmiştir. Toplam tepkime hacmi 20 µL olarak hesaplandı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Master mix karışımının hazırlanması

Bileşenler	Hacim	Son Konsantrasyon
iScript Reverse Transcription Supremix 170-8841	4 µl	1X
RNA	Değişken	≥ 1000 ng
Nuclease free H ₂ O	Değişken	Son hacim H ₂ O ile 16 µl' ye tamamlanır.
Toplam Hacim	20 µl	

cDNA sentez basamakları şu şekilde gerçekleştirildi (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. cDNA sentez basamakları

<u>Basamak</u>	<u>Sıcaklık ve Süre</u>
Priming	25°C 5 dakika
Ters Transkripsiyon	46°C 20 dakika
Ters Transkripsiyon İnaktivasyon	95°C 1 dakika

cDNA sentezi yapılan örnekler üzerlerine 80 µl DNaz/RNaz içermeyen saf su eklenerek 1:5 oranında seyreltili ve kantitatif PCR tepkimesine kadar -20°C’de saklandı.

2.7. Ters Transkriptaz Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ve Analizi

PCR tepkimesinde kullanılacak her gene ait primer çiftleri, GC içerikleri (%GC), erime sıcaklıkları (T_m) ve dimer oluşturup oluşturmadıkları (dG) dikkate alınarak Perl-Primer programı kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen primer sekanslarının özgünlükleri NCBI/Primer Blast ağ sayfasından faydalanılarak denetlendi. RT-qPCR aşamasında polimerizasyon tepkimesi için gerekli olan ve SYBR Green floresan boyası, dNTP’ler ve DNA Polimeraz içeren 2X ticari tampon çözeltisi (Bio-Rad SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix) DNaz/RNaz içermeyen saf su ve ifade oranı hesaplanacak olan gen transkriptine ait ilgili primerler ile tüm örnekler ve tüm tekrarlar için yetecek şekilde karışım hazırlandı. Her bir primer çifti için bir adet karışım oluşturuldu. Bu karışımlar 96-kuyucuklu PCR plakasının ilgili gene ait ifade ölçümünün alınacağı bölgelerdeki her bir kuyucuğa, kuyucuk başına 8 µl olacak şekilde dağıtıldı ve daha önceki aşamalarda elde edilmiş olan her bir farklı örneğe ait cDNA’lar, bu SYBR Green karışımları üzerine her bir kuyucuğa 2 µl olmak üzere dağıtıldı. Negatif kontrol için cDNA yerine, karışım hazırlarken kullanılan sudan 2 µl eklendi. Böylece toplam PCR tepkime hacmi 10 µl oldu. Normalizasyon için GAPDH referans geni kullanılarak bağıl (rölatif) gen ekspresyon analizi yapıldı. RT-qPCR tepkimeleri Biorad CFX Connect cihazı kullanılarak qRT-PCR yapıldı (Çizelge 2.3). RT-qPCR sonuçları MS Excel programı kullanılarak 2 (Delta C(T)) yöntemi ile analiz edildi.

Çizelge 2.3. qRT-PCR protokolü

Komponentler:	Hacim
DNaz/RNaz içermeyen H ₂ O	2 µl
Primer (10pmol) (Forward)	0.5 µl
Primer (10pmol) (Reverse)	0.5 µl
Syber Green (2x)	5 µl
cDNA	2 µl
Toplam Hacim	10 µl
Programı:	
Denaturasyon	95°C 5 dakika
Amplifikasyon	95°C 30 saniye 60°C 30 saniye (50 siklus) 72°C 30 saniye
Melting	95°C 10 saniye 65°C 1 dakika 95°C continuous
Cooling	40°C 10 saniye

İstatiksel değerlendirme; İncelenen değişkenlerin bağımsız iki grup arasındaki karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Ortalama (standart sapma) [ortanca (minimum-maksimum)] tanımlayıcı ölçü olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 30 programından yararlanılmıştır.

2.8. İmmünofloresan (IF) Yöntemi

1) 6 kuyucuklu platelere etanol ile steril edilen cam lameller (cover slip) koyulduktan sonra her hasta ve kontrol grubundaki Sertoli hücrelerinden kuyucuk başına 500.000 hücre eklendi.

2) 24 saat sonra, kuyucuk tabanında yapışan hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez PBS ile yıkandı.

3) Daha sonra %4 PFA her kuyucuğa eklendi ve 30 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edildi sonra iki kere PBS ile yıkandı.

4) Permeabilizasyon için her kuyucuğa Triton X-100 (%0.1'lik) eklendi ve karanlıkta oda ısısında 20 dakika inkübe edildi.

5) İnkübasyon bitince kuyular PBS ile tekrar iki kez yıkandı.

6) Bu aşamasında bloklama için %5 FBS içeren PBS içerisinde Vimentin, GATA4 ve unstain olarak kodlanan her bir kuyucuğa 5 µl belirtilen antikorlar 50 µl bloklama solüsyon içerisinde çözündürölüp kendilerine ait olan yerlere konuldu.

7) Antikorlar kendilerine ait etiketlenen kuyulara eklendikten sonra karanlıkta 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

8) İnkübasyon sonrası hücreler iki kez PBS ile yıkandı.

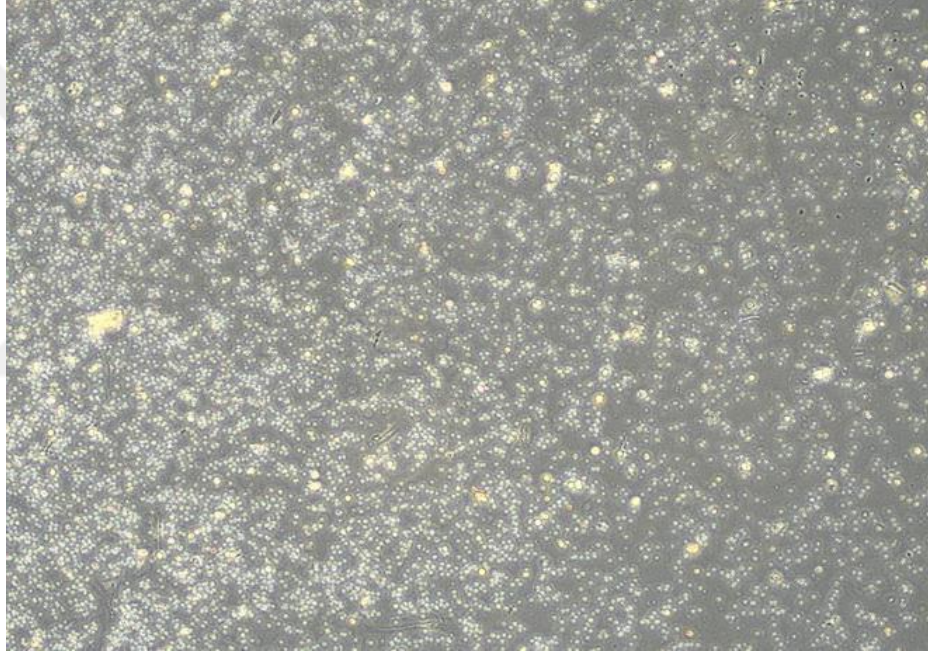
9) Daha sonra, lameller pensle alınarak PBS ile yıkandı ve lam üzerine yerleştirildi. Lamaların kenarları oje ile kapatıldı ve karanlık ortamda kuruması için bekletildi.

10) Lamalar, Lazer taramalı Konfokal mikroskopta (Zeiss LSM800, GmbH, Germany) görüntölendi.

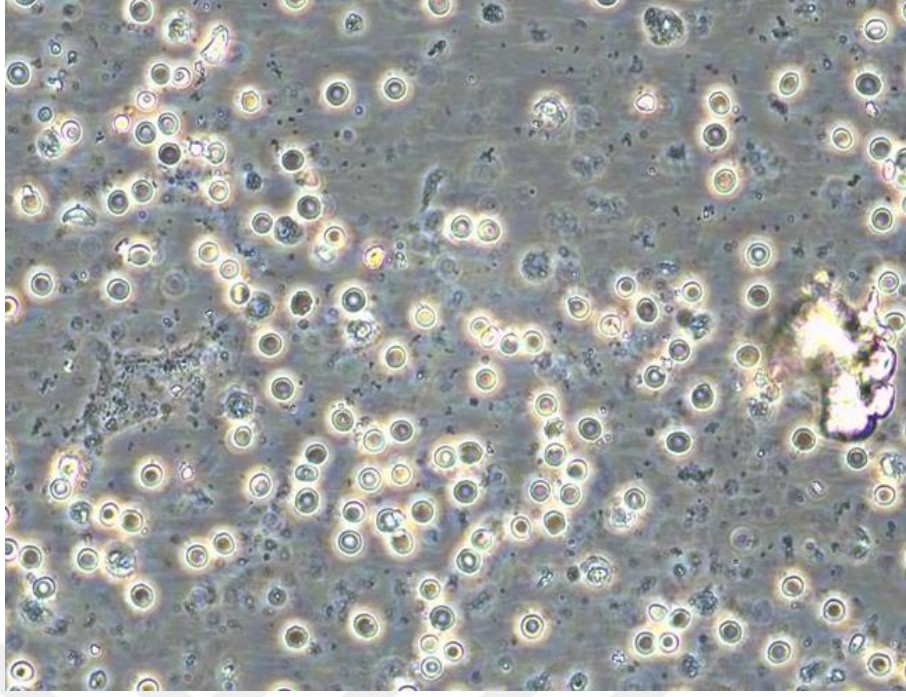
3. BULGULAR

3.1. Primer Sertoli Hücrelerinin Mikroskop Görüntüsü

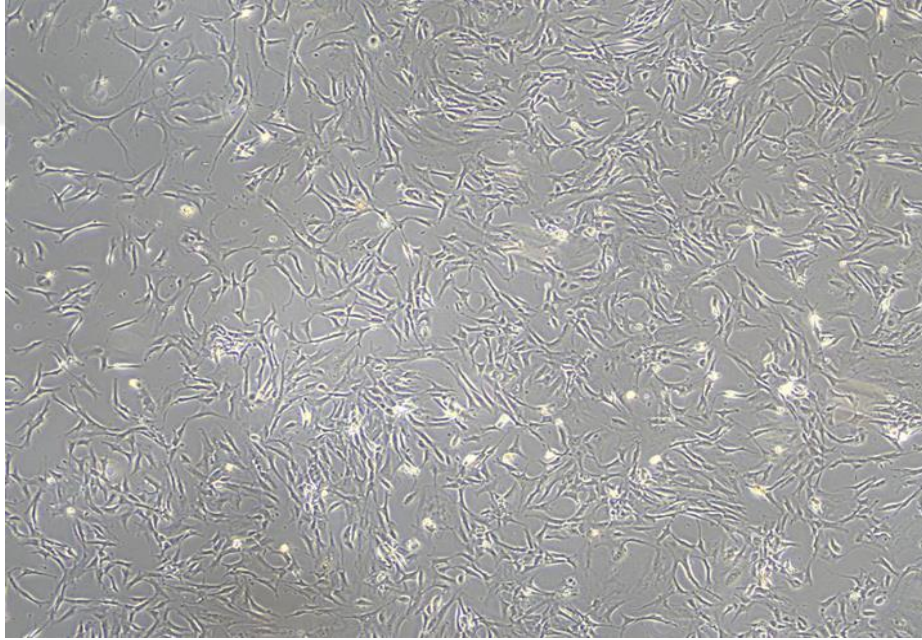
NOA hastaları ve kontrol olarak kullanılan OA hasta grubundan alınmış olan testis dokuları enzimatik parçalama işlemlerinden sonra hücre izolasyon aşamaları yapılarak Sertoli hücreleri elde edildi. Testis doku örneğinden izole edilen hücre süspansiyonunun 10x4 ve 10x40 büyütmedeki görüntüleri şekil 3.1 ve 3.2’de gösterilmiştir. Kültürü yapılan Sertoli hücrelerinin 4.gün mikroskop görüntüleri şekil 3.3 ve 3.4’de sunulmuştur.



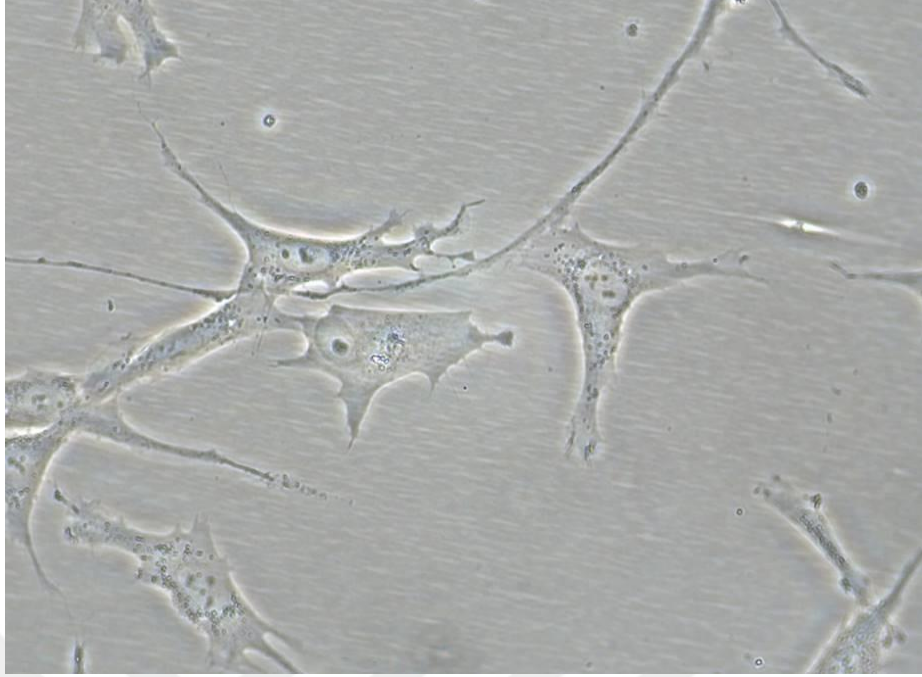
Şekil 3.1. Testis doku örneğinden izole edilen hücre süspansiyonunun 10x10 büyütmedeki görüntüsü



Şekil 3.2. Testis doku örneğinden izole edilen hücre süspansiyonunun 10x40 büyütmedeki görüntüsü



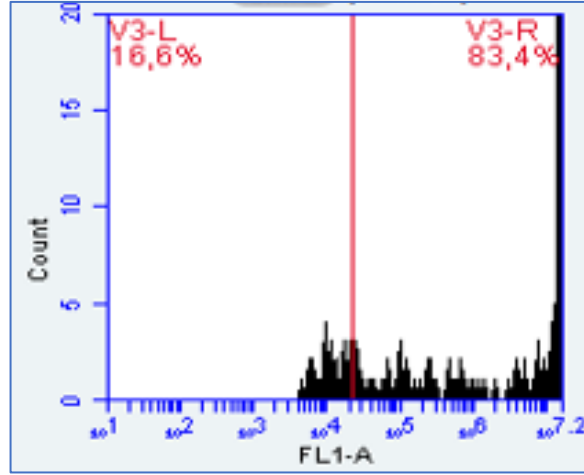
Şekil 3.3. Testis doku örneğinden izole edilen Sertoli hücrelerinin 4.gün 10x10 büyütmedeki görüntüsü



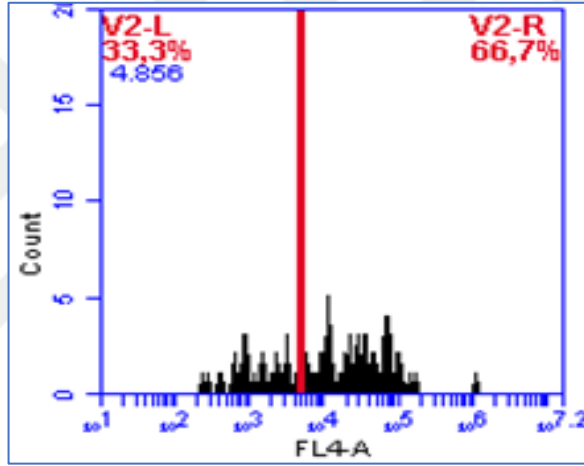
Şekil 3.4. Testis doku örneğinden izole edilen Sertoli hücrelerinin 4.gün 10x40 büyütmedeki görüntüsü

3.2. Primer Sertoli Hücrelerinin Akım Sitometri Yöntemiyle Karakterizasyonu

Hasta (NOA) ve kontrol (OA) testis dokularından izole edilen Sertoli hücrelerinin karakterizasyonu akım sitometri ile belirlendi. Bu işlemde hücreler, Sertoli hücre belirteçleri olan GATA4 ve Vimentin proteinlerine özgün antikorlarla boyanmış ve akım sitometri cihazında analiz edilmiştir (You vd., 2021). İzole edilen ve kültüre edilen hücrelerin % 83.4 Vimentin pozitif ve % 66.7 GATA4 pozitif olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.5 ve 3.6’da bir hastadan elde edilen Sertoli hücrelerinin Vimentin ve GATA4 pozitiflik yüzdesi örnek olarak gösterilmiştir.



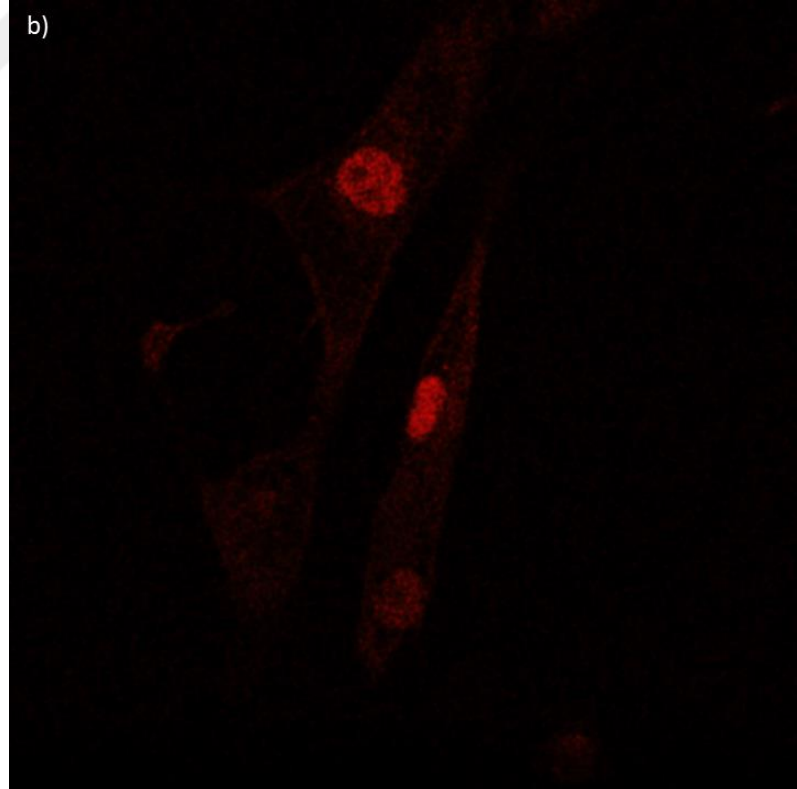
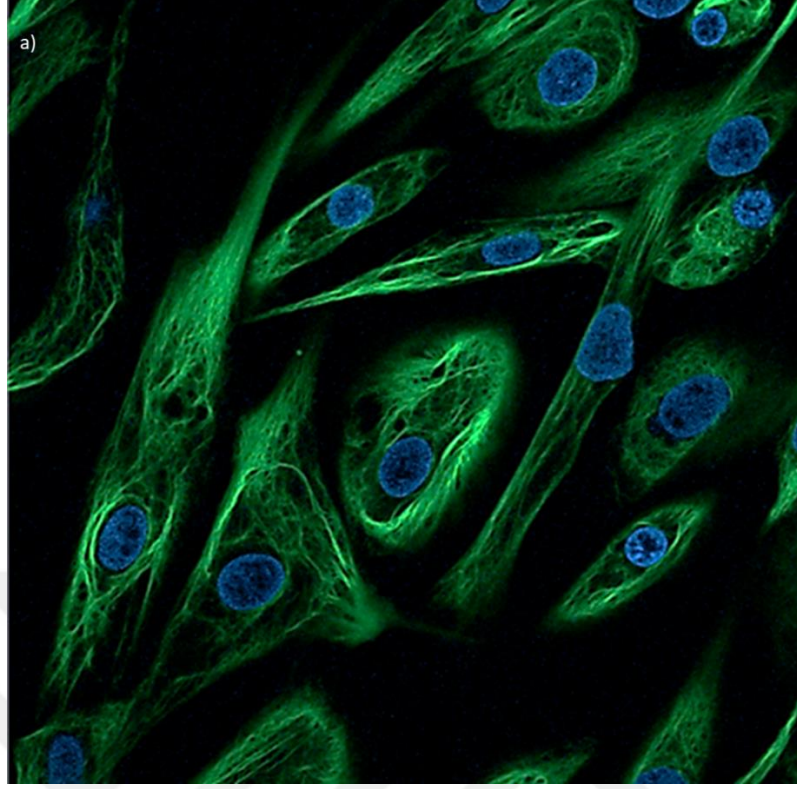
Şekil 3.5. Sertoli hücrelerinde Vimentin antikoru için akım sitometri analizi



Şekil 3.6. Sertoli hücrelerinde GATA4 antikoru için akım sitometri analizi

3.3. Primer Sertoli Hücrelerinin IF Yöntemiyle Konfokal Mikroskopta Karakterizasyonu

Sertoli hücrelerinde vimentin proteininin ekspresyonu akım sitometriye ek olarak immünofloresan boyama ile de gösterildi. Bu yöntemde Sertoli hücreleri Vimentinve GATA4 proteinlerine özgün antikolarla boyandıktan sonra konfokal mikroskobu altında incelendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Primer Sertoli hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri **a)** Primer Sertoli hücrelerinin AlexaFluor® 488 anti-Vimentin Antikoru ile konfokal mikroskop görüntüsü. Yeşil: Vimentin; Mavi: DAPI çekirdek. **b)** Primer Sertoli hücrelerinin anti-GATA4-PE Antikoru ile konfokal mikroskop görüntüsü. Kırmızı: GATA4.

3.4. Sertoli Hücrelerinden RNA İzolasyonu

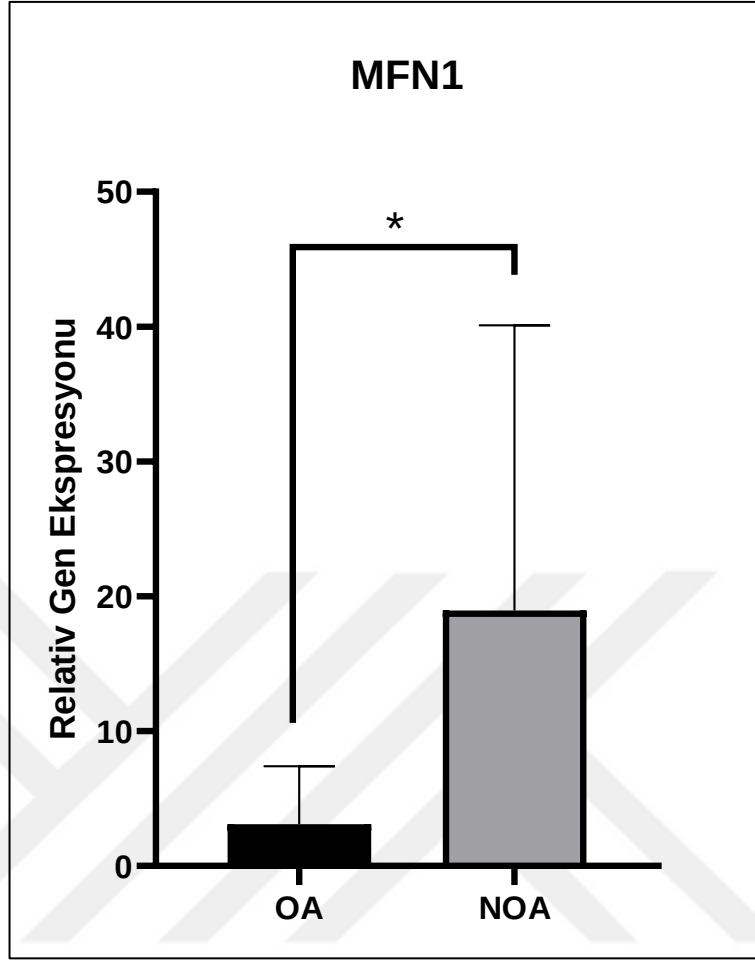
Her hasta örneğinden izole edilen Sertoli hücreler kültüre edildi. Hücreler birinci pasaja gelince Sertoli hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. RNA örneklerinin spektrofometrik olarak 260nm ve 280nm’de ölçümleri yapıldı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Bazı RNA örneklerinin spektrofometrik ölçüm sonuçları

260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
0,272	0,175	0,048	0,214	0,122	1,761	171,249
0,266	0,168	0,043	0,214	0,119	1,791	170,809
0,257	0,166	0,043	0,206	0,118	1,74	164,65
0,258	0,167	0,046	0,204	0,117	1,747	163,128
0,246	0,154	0,045	0,193	0,104	1,854	154,144
0,253	0,157	0,045	0,198	0,107	1,86	158,611
0,587	0,326	0,056	0,514	0,26	1,975	411,29
0,527	0,294	0,051	0,459	0,234	1,964	367,305
0,699	0,382	0,058	0,621	0,313	1,983	496,522
0,694	0,378	0,055	0,614	0,31	1,982	491,453
0,432	0,254	0,043	0,373	0,202	1,847	298,046
0,47	0,279	0,057	0,395	0,212	1,863	316,045
2,026	1,08	0,088	1,883	0,963	1,956	1506,711
1,384	0,736	0,058	1,281	0,654	1,958	1024,791

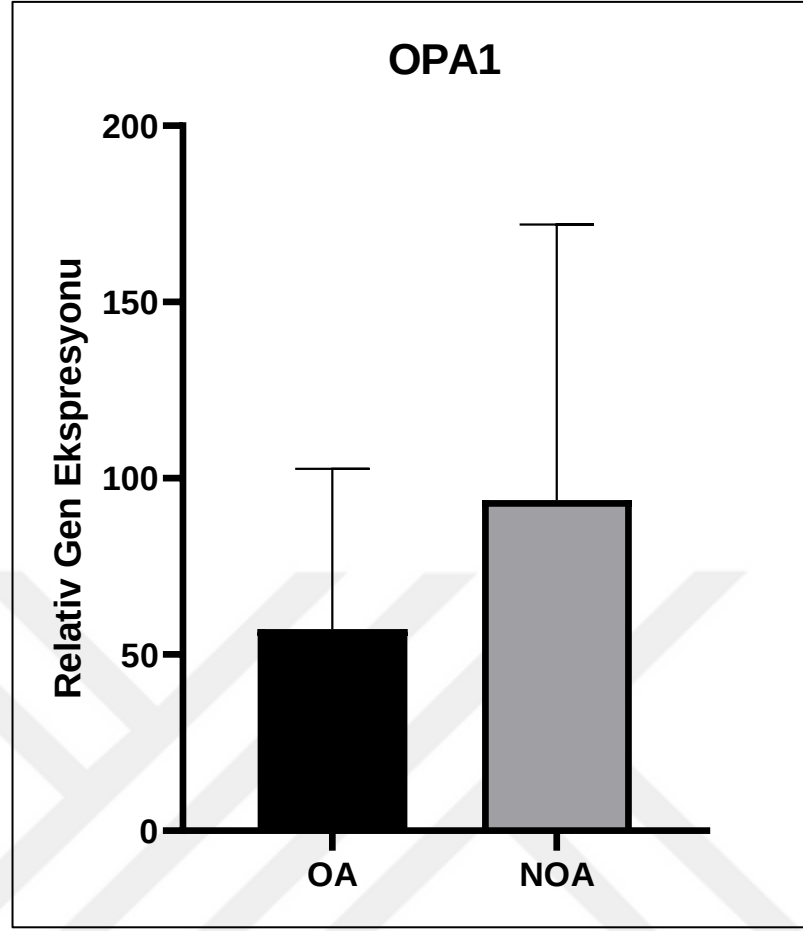
3.5. Gen İfadelerinin qRT-PCR Analiz Bulguları

Çalışmamızda Sertoli hücrelerinde hasta ve kontrol gruplarında mitokondri dinamiğinde rol oynayan genlerin ifadelerindeki olası farklılıkları tespit etmek için, bu genlerin kantitatif gen ekspresyon analizleri yapılmıştır. Bu amaçla MFN1, MFN2, OPA1 (Füzyon), DRP1 (Fisyon), MFF, MID49, MID51, INF2 (DRP1’in reseptörü) FIS1, PINK1, PARKIN, LC3 (Mitofaji) genleri hedeflenmiş ve ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. 12 adet mitokondri dinamiğinde rol oynayan gen ve 1 adet referans houskeeping geninin (GAPDH) gen ekspresyonu qRT-PCR ile değerlendirilmiştir.



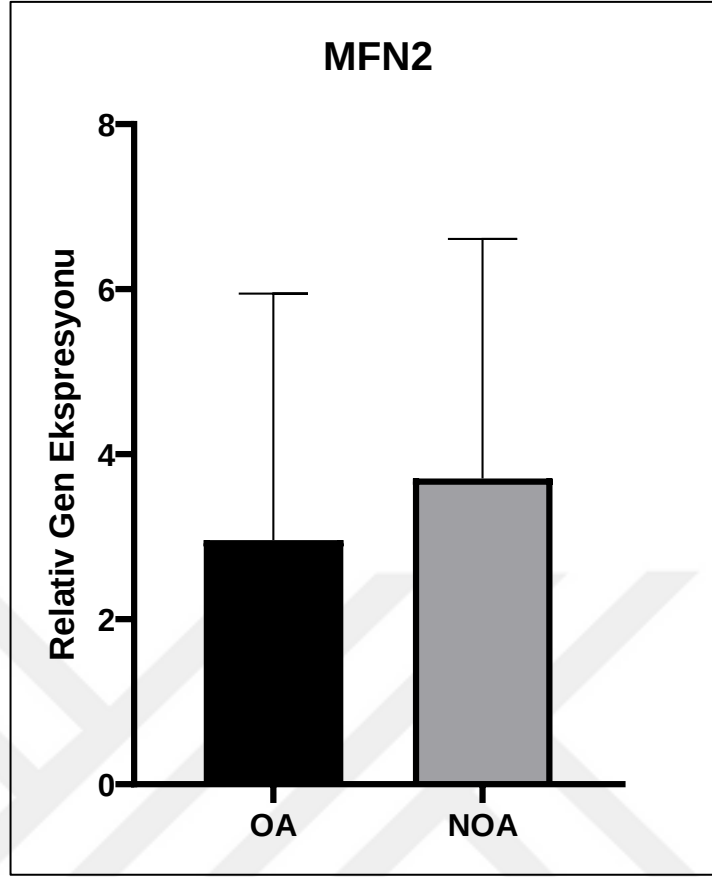
Şekil 3.8. *MFN1* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

OA ile NOA Sertoli hücrelerinde *MFN1*'in ekspresyon seviyesine bakıldığında (Şekil 3.8) NOA'ların Sertoli hücrelerinde OA'ların Sertoli hücrelerine göre *MFN1* ekspresyon seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlemlendi ($p=0,004$).



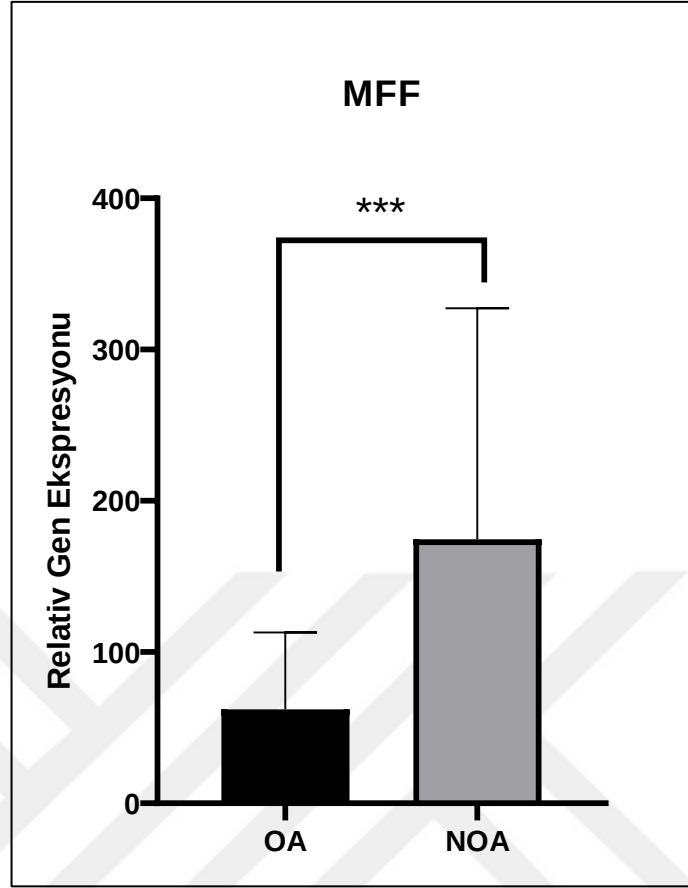
Şekil 3.9. *OPA1* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

Hasta grupları (NOA), kontrol grubu (OA) ile kıyaslandığında *OPA1*’e ait gen ifadelerinde artış saptandı (Şekil 3.9) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,089$).



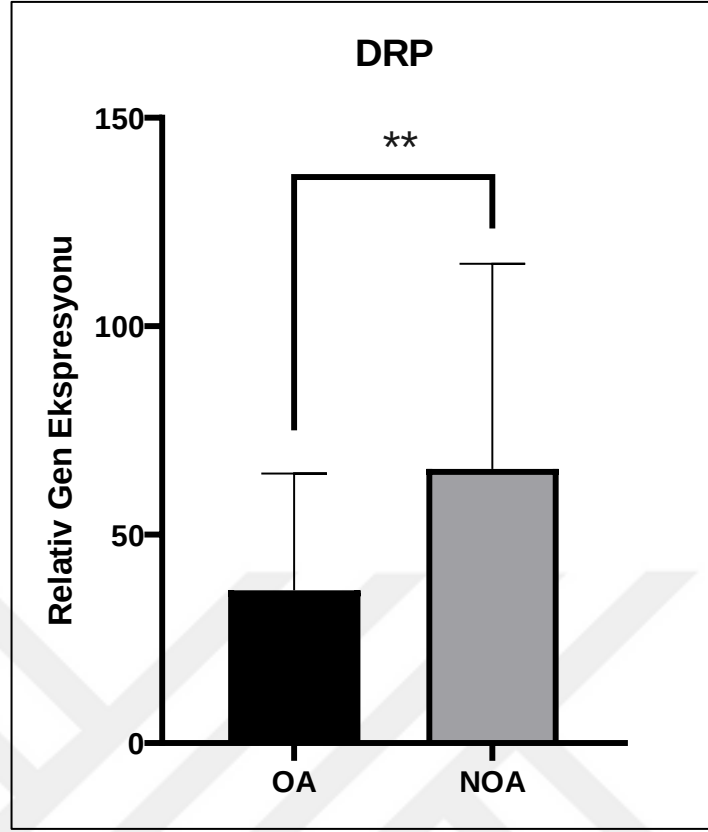
Şekil 3.10. *MFN2* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması.

Hasta grupları (NOA), kontrol grubu (OA) ile kıyaslandığında *MFN2*'ye ait gen ifadelerinde artış saptandı (Şekil 3.10) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,407$).



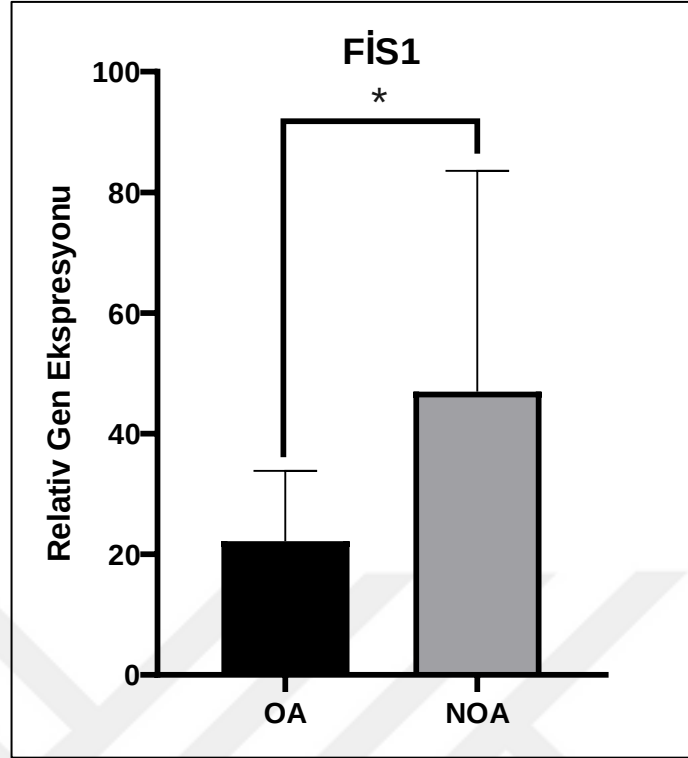
Şekil 3.11. *MFF* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

OA ile NOA Sertoli hücrelerinde *MFF*'nin gen ifade seviyesine bakıldığında (Şekil 3.11) NOA'ların Sertoli hücrelerinde OA'ların Sertoli hücrelerine göre *MFF* gen ifade seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı artış görüldü ($p=0,033$).



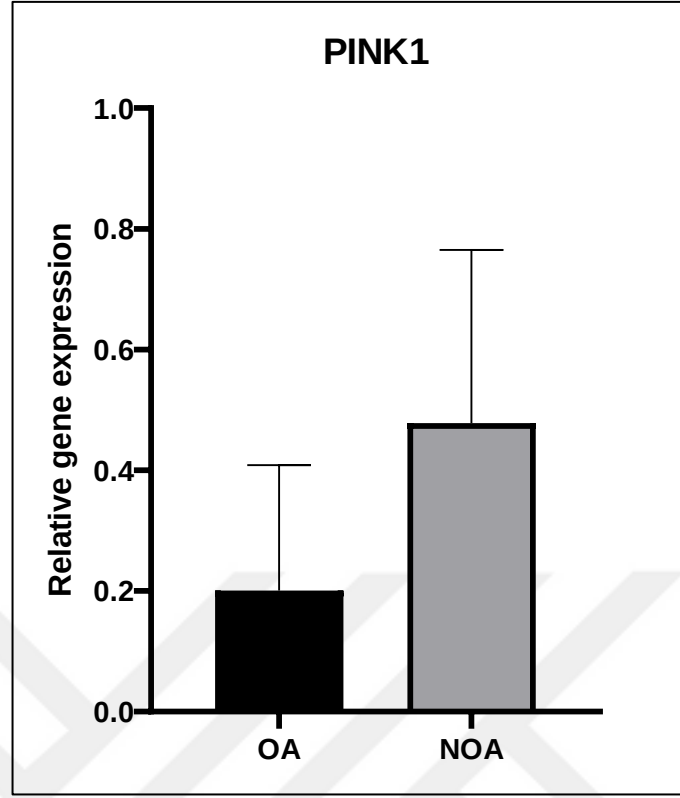
Şekil 3.12. *DRP1* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

OA ile NOA Sertoli hücrelerinde *DRP1*'nin gen ifadesine bakıldığında (Şekil 3.12) NOA'ların Sertoli hücrelerinde OA'ların Sertoli hücrelerine göre *DRP1* gen ifade seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlemlendi ($p=0,039$).



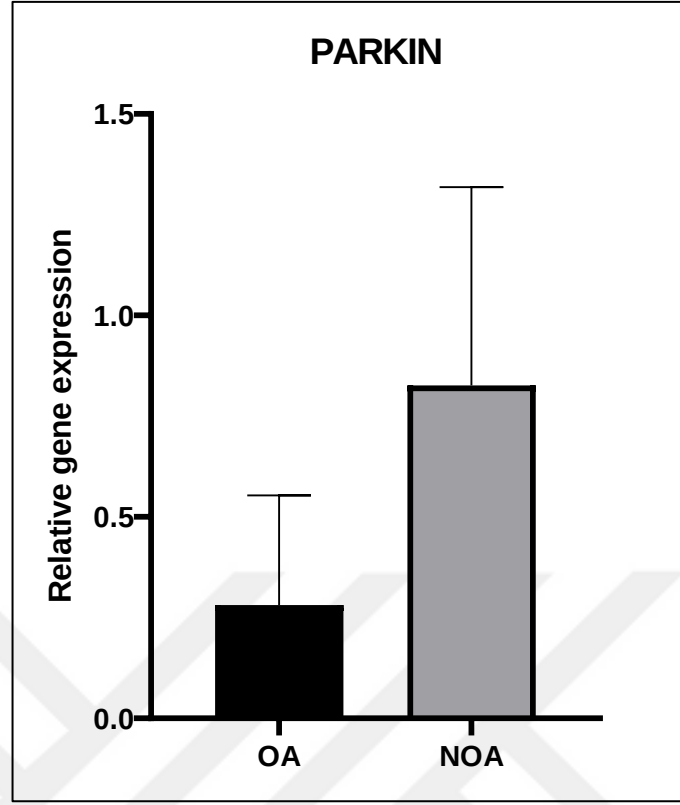
Şekil 3.13. *FIS1* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

OA ile NOA Sertoli hücrelerinde *FIS1*'nin gen ifade seviyesine bakıldığında (Şekil 3.13) NOA'ların Sertoli hücrelerinde OA'ların Sertoli hücrelerine göre *FIS1* gen ifade seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlemlendi ($p=0,023$).



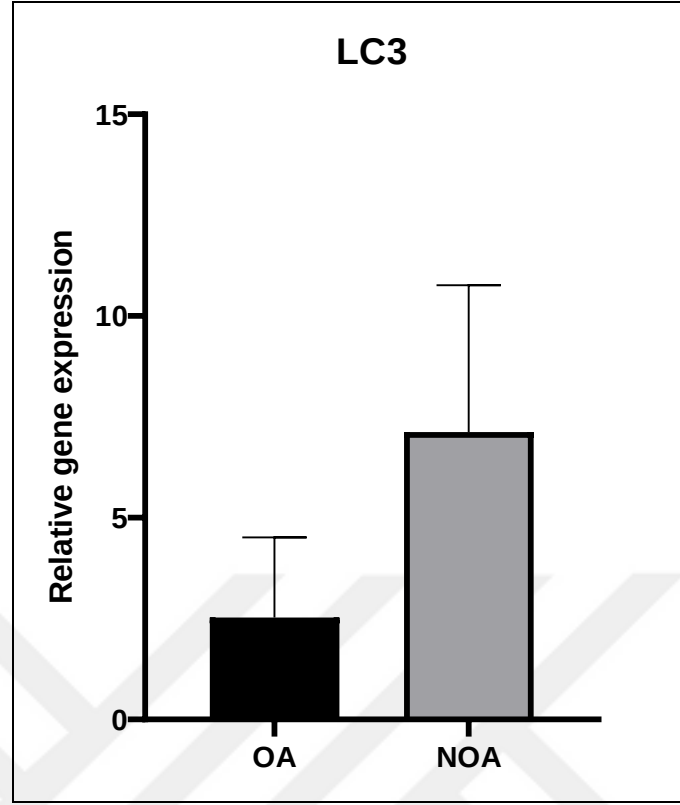
Şekil 3.14. *PINK1* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

Hasta grupları (NOA), kontrol grubu (OA) ile kıyaslandığında *PINK1*'e ait gen ifadelerinde artış saptandı (Şekil 3.14) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,650$).



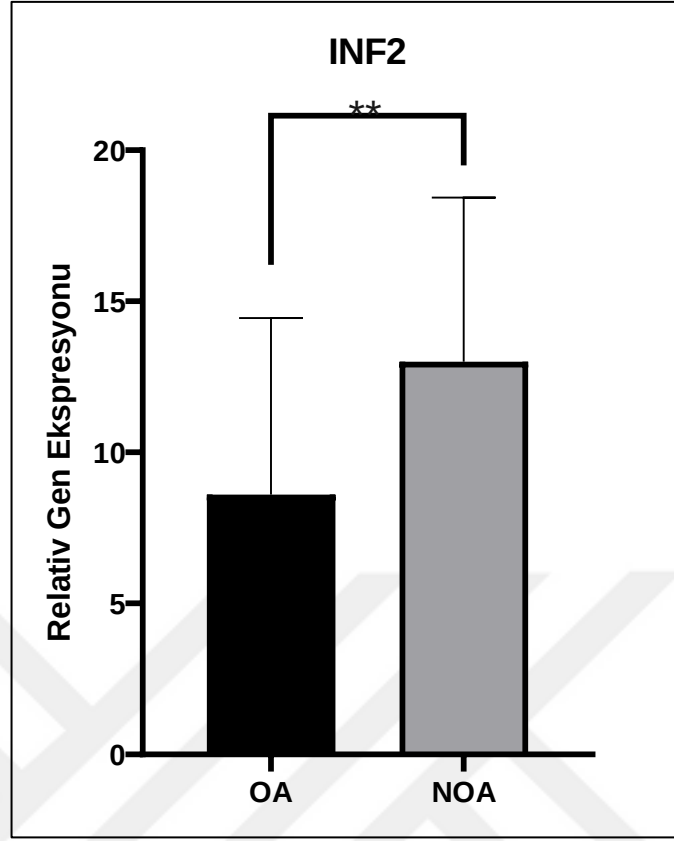
Şekil 3.15. *PARKIN* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

Hasta grupları (NOA), kontrol grubu (OA) ile kıyaslandığında *PARKIN*'e ait gen ifadelerinde artış saptandı (Şekil 3.15) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,662$).



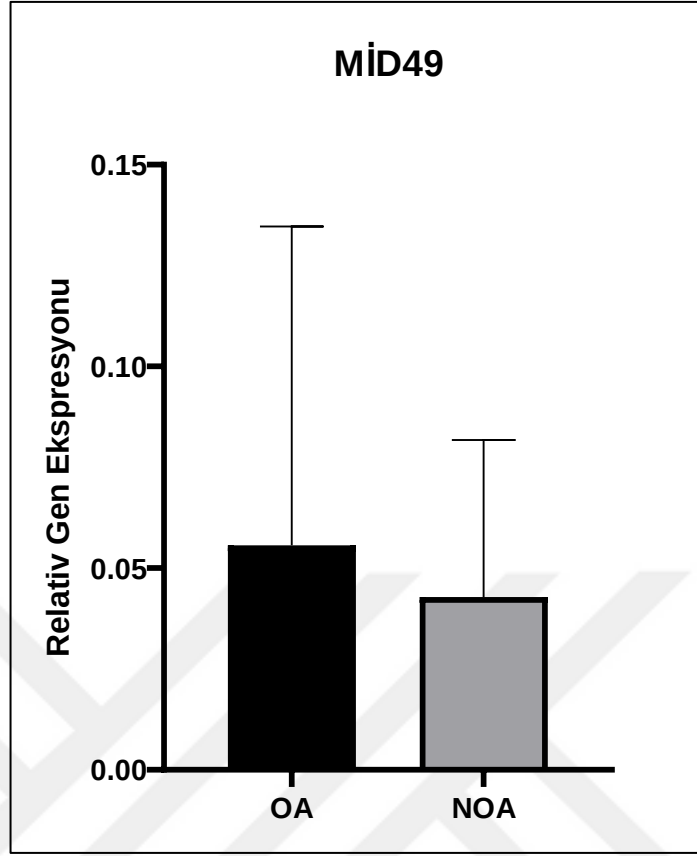
Şekil 3.16. *LC3* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

Hasta grupları (NOA), kontrol grubu (OA) ile kıyaslandığında *LC3'e* ait gen ifadelerinde artış saptandı (Şekil 3.16) ancak anlamlı bulunmadı ($p=0,567$).



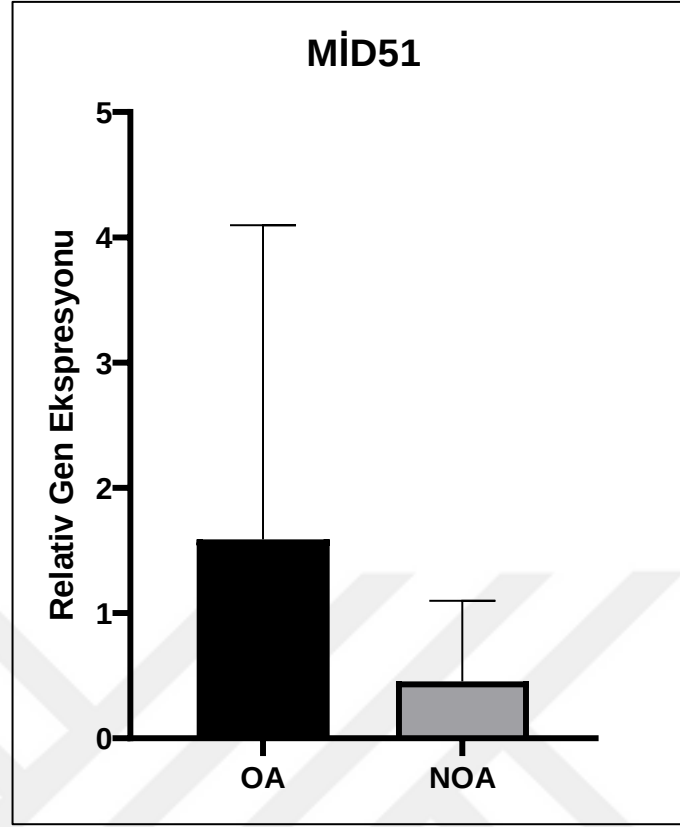
Şekil 3.17. *INF2* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

OA ile NOA Sertoli hücrelerinde *INF2*'nin gen ifade seviyesine bakıldığında (Şekil 3.17) NOA'ların Sertoli hücrelerinde OA'ların Sertoli hücrelerine göre *INF2* gen ifade seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlemlendi ($p=0,0184$).



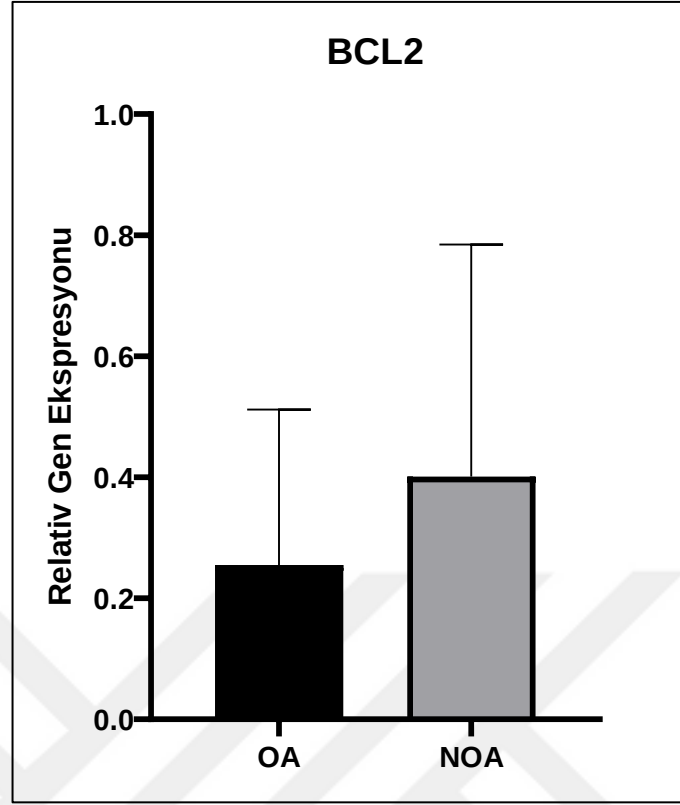
Şekil 3.18. *MID49* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

Hasta grupları (NOA), kontrol grubu (OA) ile kıyaslandığında *MID49*'a ait gen ifadelerinde azalma saptandı (Şekil 3.18) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 3.19. *MID51* Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

Hasta grupları (NOA), kontrol grubu (OA) ile kıyaslandığında *MID51*'e ait gen ifadelerinde azalma saptandı (Şekil 3.19) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 3.20. BCL2 Gen ifadelerinin değerlerinin OA (kontrol) ve NOA (hasta) ile karşılaştırılması

Hasta grupları (NOA), kontrol grubu (OA) ile kıyaslandığında *BCL2* ait gen ifadelerinde artış saptandı (Şekil 3.20) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

4. TARTIŞMA

Erkek infertilitesi, dünya genelinde çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen bir durum olup, vakaların %40-50'sinde erkek faktörü temel neden olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkek infertilitesinin en yaygın nedenleri arasında hormonal dengesizlikler, genetik anomaliler, sperm üretimindeki bozukluklar, çevresel faktörler ve yaşam tarzı alışkanlıkları yer almaktadır. Bunun yanı sıra, enfeksiyonlar, testis travmaları ve hücresel düzeydeki bozukluklar da önemli etkenlerdendir. Özellikle, spermatogenez sürecindeki moleküler mekanizma bozuklukları, sperm üretiminin azalmasına veya tamamen durmasına yol açarak infertiliteye neden olabilir (Cocuzza vd., 2013). Obstrüktif azoospermi (OA) ve Non-obstrüktif azoospermi (NOA), erkek infertilitesinde en sık karşılaşılan durumlar olup, NOA vakaları, sperm üretiminde ciddi bozukluklarla karakterizedir. Erkek infertilitesinin biyolojik ve moleküler temellerinin daha iyi anlaşılması, bu durumun tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Üreme sisteminde spermatogenez sürecinde enerji ihtiyacının karşılanması, mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesiyle yakından ilişkilidir. Germ hücreleri olgunlaşma süreçleri boyunca, hem fiziksel yer değiştirme hem de enerji üretim kapasitesini optimize etmek için dinamik adaptasyonlar sergiler. Testis dokusundaki seminifer tübüllerde, germ hücreleri farklılaşma basamaklarını tamamlarken, onları çevreleyen Sertoli hücreleri sıkı bağlantılar aracılığıyla yapısal ve metabolik destek sağlar (Varuzhanyan ve Chan, 2020). Sertoli hücrelerinde ortaya çıkan mitokondriyal disfonksiyonun, germ hücrelerinin gelişimini olumsuz yönde etkileyerek erkek fertilitasını negatif yönde etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Bu bağlamda, çalışmamızda erkek infertilitesinde Sertoli hücrelerinde mitokondriyal füzyon, fisyon ve mitofaji süreçlerini incelemeyi planladık. NOA ve OA hasta gruplarından mikro TESE yöntemiyle alınmış testis biyopsilerinden elde edilen Sertoli hücrelerinin mitokondriyal dinamik genlerinin ifadelerini analiz ederek spermatogenez süreci üzerindeki etkilerini incelemeyi ve erkek infertilitesinin altında yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sunmayı amaçladık.

Mitokondriyal dinamikler, hücresel homeostazın korunmasında ve gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinde temel bir mekanizma olarak görev yapmaktadır. Füzyon, fisyon

ve mitofaji gibi süreçlerin uyum içinde çalışması, mitokondriyal kalite kontrol mekanizmasının temel unsurlarındandır. Bu süreçlerde meydana gelen bozuklukların, nörolojik hastalıklar ve kas distrofileri gibi birçok patolojik durumla ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Mitokondriyal dinamiklerin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, bu bozuklukların nedenlerini ortaya çıkarmakla kalmayıp, aynı zamanda yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

Çalışmamızda, NOA ve OA hastalardan testis dokusundan elde edilen Sertoli hücrelerinde mitokondriyal füzyon, fisyon ve mitofaji süreçlerinde görev alan genlerin ekspresyon düzeylerini karşılaştırdık. Elde edilen sonuçlar, infertil olan, spermatogenez bozukluğuna bağlı olarak ejakulatlarında sperm hücresi olmayan NOA hastalarının Sertoli hücrelerinde, mitokondriyal dinamik genlerinin ifadelerinin spermatogenez süreci normal olarak kabul edilen fakat obstrüksiyona bağlı olarak ejakulatlarında sperm hücrei olmayan kontrol grubuna (OA) kıyasla genel olarak daha yüksek ifade edildiğini göstermiştir.

Mitokondriyal dinamikler, hücrel enerji üretimi, kalite kontrol mekanizmaları ve oksidatif stres yönetimi için hayati bir role sahiptir (Benard vd., 2013). Elde ettiğimiz sonuçlar NOA hastalarında, mitokondriyal füzyon ve fisyon süreçlerinin fazla aktive olduğu göstermektedir. Bu durum, hücrenin artan enerji talebini karşılamak, mitokondriyal bütünlüğün korunması ve hücrel stresle başa çıkma çabalarının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Buna karşılık, kontrol grubunda mitokondriyal dinamiklerin daha stabil kaldığı gözlemlenmiştir. OA hastalarında spermatogenez normal olarak kabul edilir, ancak mekanik bir tıkanıklık nedeniyle ejakülatta sperm hücresi görülmez (Elzanaty, 2013). Elde ettiğimiz sonuçlar, yani bu olguların Sertoli hücrelerinde mitokondriyal homeostazın stabil olması beklenildiği gibidir. Ancak NOA'da mitokondriyal stresin ve enerji talebinin artması, mitokondriyal dinamik genlerinin transkript seviyesinin artmasına yol açmış olabilir. Bu durum, NOA hastalarında mitokondriyal homeostaz mekanizmalarının normalden farklı bir işleyişi olduğunu düşündürmektedir.

Mitokondriyal füzyon, mitokondriyal membranların birleşmesini sağlayarak hasarlı mitokondrilerin yeniden yapılandırılmasına olanak tanır. Bu süreçte yer alan NOA olgularının Sertoli hücrelerinde saptadığımız MFN1, MFN2 ve OPA1 genlerinin yüksek ifadesi, hücrenin mitokondriyal stresle başa çıkma stratejilerinin bir sonucu olarak yorumlanabilir. MFN1 ve MFN2, dış mitokondriyal membranların birleşmesini düzenlerken, OPA1 iç membran füzyonunu sağlar ve mitokondriyal kristallerin yapısını korur. Bu genlerin

ifadesinin artışı, hücrenin mitokondriyal bütünlüğünü sürdürme ve enerji üretim kapasitesini artırma çabasını yansıtabilir.

Mitokondriyal fisyon süreci, DRP1, MFF, INF2, MID49/51 ve FIS1 proteinleri aracılığıyla düzenlenir. Bu süreç, hasarlı mitokondrilerin sağlıklı olanlardan ayrılmasını ve mitofaji yoluyla ortadan kaldırılmasını sağlar. Saptadığımız DRP1 ifadesinin artışı, NOA hastalarında, mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarının devrede olduğunu ve hücrenin enerji talebini karşılamak için adaptasyon gösterdiğini işaret eder. Aynı zamanda, bu artış mitokondriyal stres koşullarında hayatta kalmaya yönelik bir yanıt olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte, DRP1 ifadesinin artışının, NOA hastalarında hasarlı mitokondrilerin fazlalığına işaret ettiği de söylenebilir. Mitokondriyal kalite kontrol mekanizmaları, bu tür hasarlı mitokondrilerin etkili bir şekilde ayrıştırılması ve ortadan kaldırılması için tetiklenir, bu da hücrenin enerji üretim kapasitesini koruma çabası olarak yorumlanabilir.

NOA hastalarında füzyon ve fisyon süreçlerinin birlikte fazla aktive olması, hücresel stresin ve enerji ihtiyacının artışına bağlıdır. Füzyon süreçleri, sağlıklı mitokondrilerin oluşturulmasını hedeflerken, fisyon süreçleri mitokondriyal kalite kontrolü sağlar. Bu iki sürecin dinamik dengesi, mitokondriyal homeostazın korunmasında kritik bir rol oynar. Ancak, NOA grubunda mitokondriyal dinamik genlerin ifade seviyesinin artması, mitokondriyal kalitenin bozulmasına, enerji üretiminde aksamalara ve spermatogenez yetersizliğine de neden olabilir.

Sonuç olarak, NOA hastalarında füzyon ve fisyon süreçlerinin artışı, mitokondriyal stres altında hücrenin bir tür “ikili yanıt mekanizması” geliştirdiğini gösterir. Füzyon, sağlıklı mitokondri oluşturulmasına odaklanırken, fisyon hasarlı mitokondrilerin elimine edilmesine aracılık eder. Ancak, bu süreçlerin uyumunun bozulması, mitokondriyal disfonksiyonun ilerlemesine ve enerji metabolizmasının zayıflamasına yol açabilir. Bu dinamiklerin daha iyi anlaşılması, NOA tedavisinde hedef olabilecek yeni moleküler yolların belirlenmesine katkı sağlayabilir.

Erkek infertilitesinde mitokondriyal dinamiklerin rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Klinik bir çalışmada, spermde düşük MFN2 protein miktarının astenozoospermi (azalmış sperm hareketliliği) ve azalmış sperm mitokondriyal membran potansiyeli ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, insan spermlerindeki mitofusin 2 (MFN2) ekspresyonunun, sperm hareketliliği (motilitesi) ve kriyoprotektif potansiyelleriyle

olan ilişkisi incelenmiştir. Çalışma, Mfn2'nin sperm mitokondrilerinde önemli bir rol oynayabileceğini, özellikle mitokondriyal dinamikler ve enerji üretimi yoluyla hareketlilik ve kriyoproteksiyon süreçlerini etkileyebileceğini göstermektedir. Araştırmacılar, Mfn2 seviyelerinin sperm kalitesi ve dondurma sonrası hayatta kalma oranlarıyla bağlantılı olduğunu, dolayısıyla fertilité tedavilerinde ve kriyoprezervasyon yöntemlerinde potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmektedir (Fang vd., 2018). Sperm hücrelerinde yapılan bu çalışma, MFN2 protein düzeyinin düşük olmasının sperm hareketliliği ve mitokondriyal membran potansiyeli ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, bizim çalışmamızda ilk kez NOA hastalarının Sertoli hücrelerindeki *MFN2* gen ekspresyon düzeyi incelenmiş ve OA grubuna göre daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Sonuçlarımız, NOA hastalarındaki artmış *MFN2* gen ekspresyonunun, destekleyici Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamiklerin farklı bir düzenleyici role sahip olabileceğini düşündürmektedir. Fang ve arkadaşlarının spermelerde MFN2 protein seviyesinin düşüklüğünü saptaması, mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarının hareketlilik ve enerji üretimi üzerindeki etkilerini gösterirken, bizim sonuçlarımız, NOA hastalarının Sertoli hücrelerinde, artmış *MFN2* ekspresyonunun, bu hücrelerin enerji metabolizması ve destekleyici rollerinde bir adaptif yanıt olabileceğini düşündürmektedir.

Bu durum, NOA hastalarında Sertoli hücrelerinin, hasarlı mitokondrileri yönetme ve hücrel homeostazi sürdürme çabası içinde olduğu şeklinde yorumlanabilir. *MFN2*'nin NOA ve OA grupları arasında sperm ve Sertoli hücrelerinde farklı ekspresyon profillerine sahip olması, fertilité üzerindeki rolüne dair daha fazla araştırmayı gerektirmektedir.

Varuzhanyan ve ark. farede erkek germ hücresinin gelişimi sırasında mitokondriyal füzyonun fonksiyonunu açıklığa kavuşturmak için, erkek germ hattından Mfn1, Mfn2'yi ayrı ayrı ve her ikisini birlikte inaktive ederek (nakavt) spermatogenezin tüm aşamalarını incelemişler ve mitokondriyal füzyonun, farklılaşma ve mayoz sırasında metabolik değişim için gerekli olduğunu göstermişlerdir.

Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, farede spermatogenez sürecinde mitokondriyal füzyonun rolünü incelemişlerdir. Mfn1 ve Mfn2 mutantların olgun sperm üretmediklerini, bu genlerin spermatogenez sırasında mitokondriyal füzyon için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Normal farelerde mayoz bölünmede enerji gereksinimleriyle tutarlı olarak, mayoz sırasında zigotenden pakitene geçiş, OXPHOS'un yukarı doğru regülasyonu ile ilişkilidir. Mfn1, Mfn2 çift mutantlarının, bu gelişimsel geçiş sırasında mayotik arrest

sergileyip, OXPHOS aktivitesini azaltan daha az pakiten hücresi oluşturduğu saptanmıştır. Bu veriler, mayozun mitokondriyal füzyon kaybına en duyarlı aşama olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada çift mutant olan farelerde farklılaşmamış spermatogonya azalmadığı saptanmıştır, bu da *Mfn1* ve *Mfn2*'nin bu progenitör hücrelerin oluşumu için gerekli olmadığını göstermektedir (Varuzhanyan vd., 2019).

Fare spermatogenezi sırasında incelenen ilk mitokondriyal dinamik faktör *Mfn1*'dir. Zhang ve arkadaşları, embriyonun 15.günde (E15) erkek germ hattından *Mfn1*'i susturarak, oluşan *Mfn1* mutantlarını incelediklerinde bunlarda infertilite geliştiğini, testis boyutlarının küçüldüğünü, olgun spermin oluşmadığını ve spermatositlerde azalma olduğunu saptamışlardır (Zhang vd., 2016).

Çalışmamızda, NOA hastalarındaki Sertoli hücrelerinde *MFN1* gen ekspresyonunun, OA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğunu gözlemledik. Bu bulgu, Sertoli hücrelerinin, germ hücrelerine enerji ve destek sağlama rolü doğrultusunda, NOA durumunda mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Varuzhanyan ve arkadaşlarının (2019) fare germ hücrelerinde yaptıkları çalışma, *Mfn1* ve *Mfn2*'nin spermatogenez sırasında mitokondriyal füzyon için kritik olduğunu göstermiştir. Ancak bu çalışma, özellikle germ hücrelerini hedef alırken, bizim çalışmamız, Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamiklerin NOA patofizyolojisindeki rolünü ilk kez incelenmiştir.

Sertoli hücreleri, germ hücrelerinin sağlıklı gelişimi ve fonksiyonları için kritik enerji ve destek sağlayan hücrelerdir. Germ hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonlarındaki bozulmalar, enerji üretiminin azalmasına ve oksidatif fosforilasyonun yetersizleşmesine yol açabilir. Bu bağlamda, Sertoli hücreleri bu enerji eksikliğini telafi etmeye çalışarak, germ hücrelerine destek sağlamaya yönelik bir çaba gösterebilirler.

Bizim bulgularımız, NOA hastalarının Sertoli hücrelerinde *MFN1* gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiğini ve bunun, Sertoli hücrelerinin, bozulmuş mekanizmalar nedeniyle enerji üretiminde zorluk yaşayan germ hücrelerine destek sağlamaya yönelik bir yanıt olarak ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, NOA'da *MFN1*'in önemli bir rol üstlendiğini ve Sertoli hücrelerinde mitokondriyal homeostazın korunmasına yönelik bir mekanizma geliştirdiğini ortaya koymaktadır.

Ayrıca, literatürde Mfn1'in, Mfn2'ye kıyasla daha kritik bir rol oynadığı ve mitokondriyal füzyon için daha öncelikli olduğu vurgulanmaktadır (Ishihara vd., 2004). Bu bağlamda, Sertoli hücrelerinde *MFN1* artışının, mitokondriyal homeostazın sağlanması ve enerji üretiminin optimizasyonu ile doğrudan ilişkili olabileceğini söylemek mümkündür. Bu bulgular, Sertoli hücrelerinin spermatogenezde sorun olduğu maturasyon durumunda, germ hücrelerine enerji desteği sağlamak için mitokondriyal dinamiklerini nasıl düzenlediğini ve mitokondriyal stresle başa çıkmak için nasıl farklılaşmış bir yanıt geliştirdiğini gösteren önemli ipuçları sunmaktadır.

NOA durumunda, Sertoli hücrelerinin düzenleyici işlevlerindeki değişikliklerin, spermatogenez sürecindeki farklı maturasyon aşamalarında bulunan germ hücrelerinin olgunlaşmasını olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Sertoli hücreleri, germ hücrelerinin gelişimini destekleyen ve yönlendiren kritik roller üstlenir; ancak bu hücrelerin farklı maturasyon aşamalarındaki germ hücrelerine nasıl bir etki sağladığı ve NOA'da bu etkinin nasıl değiştiği hala tam olarak anlaşılmamıştır. Sertoli hücrelerindeki işlevsel bozulmaların, germ hücrelerinin olgunlaşma süreci ve spermatogenez üzerindeki etkileri belirsizliğini korumaktadır. Bu araştırma, NOA'nın patofizyolojisini daha iyi anlamak ve potansiyel tedavi stratejileri geliştirmek için önemli bir temel oluşturacaktır.

Lei Wei ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, idiopatik non-obstrüktif azoospermi (iNOA) hastalarının testis biyopsilerinden izole edilen Sertoli hücrelerinde mitokondri morfolojisinin değiştiğini ve mitokondrilerin obstrüktif azoospermi (OA) hastalarına kıyasla daha uzun ve tübüler bir yapıda olduğunu göstermiştir. Bu durum, iNOA hastalarında mitokondriyal füzyonun daha belirgin olduğunu düşündürmektedir (Wei vd., 2024).

Biz de bu çalışmamızda, mitokondriyal füzyonda rol alan genlerin (MFN1, MFN2, OPA1) ekspresyon seviyelerini inceledik. Sertoli hücrelerinde, bu genlerin ifadelerinin NOA hastalarında OA hastalarına kıyasla daha yüksek olduğunu belirledik. Özellikle MFN1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemledik. Bu bulgular, mitokondriyal füzyonun iNOA patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Zhao ve arkadaşlarının çalışmasında, Sertoli hücre disfonksiyonunun NOA ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz sonuçlar, OA'ya kıyasla NOA hastalarında mitokondriyal dinamiklerde belirgin bir değişiklik olduğunu ve bu durumun

hem hücre fonksiyonlarını olumsuz etkileyebileceğini hem de spermatogenez, olgun sperm oluşumu ve infertilitede önemli bir etmen olabileceğini düşündürmektedir (Zhao vd.,2020).

Çalışmamızda, NOA hastalarının Sertoli hücrelerinde mitokondriyal fisyonun önemli bir markırı olan DRP1 seviyesinin yüksek olduğunu gözlemledik. Bu durum, NOA hastalarında DRP1'in yüksekliğinin germ ve Sertoli hücrelerindeki hasarlı mitokondrileri ortadan kaldırmaya yönelik bir çaba olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu hastaların Sertoli hücrelerinde mitokondriyal füzyonun da yüksek bulunması, enerji ihtiyacını karşılamak, oksidatif hasarı hafifletmek ve germ hücrelerine destek sağlamak için bir adaptasyon mekanizması olarak yorumlanabilir.

Mitokondriyal fisyon faktörü (MFF), mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar ve dinaminle ilgili protein 1 (DRP1) için bir reseptör olarak görev yapar. MFF, DRP1'in mitokondriyal yüzeye bağlanmasını ve fisyon süreçlerinin başlatılmasını sağlar. Mitokondriyal fisyondaki bu mekanizma, hücrel enerji metabolizması ve homeostaz için hayati öneme sahiptir.

Lei Wei ve arkadaşları (2024), 5 OA ve 5 NOA hastasından elde ettikleri Sertoli hücreleriyle yaptıkları çalışmada, NOA grubunda MFF'in OA grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu tespit etmiş, ancak sınırlı örneklem nedeniyle bu artışı istatistiksel olarak anlamlı bulamamışlardır (Wei vd., 2024). Biz ise NOA grubunda MFF düzeylerindeki artışı istatistiksel olarak ilk kez anlamlı bulduk.

Bizim çalışmamızda, Sertoli hücrelerinde; NOA hastalarında DRP1 ve MFF ekspresyonunun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ve NOA hastalarında mitokondriyal fisyonun artmış olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Artmış mitokondriyal fisyonun, mitokondriyal disfonksiyon, mitofaji göstergesi olabileceği ve spermatogenezde aksamalara neden edebileceği şeklinde yorumlanabilir. Mitokondriyal fisyon kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojilerle ilişkilendirildiği için, mitokondriyal fisyonu hedeflemek terapötik bir strateji olarak cazip olabilir. Ancak, fizyolojik mitokondriyal fisyon, hücrel dağılım, kalite kontrol ve organellerle etkileşim gibi temel işlevler için gereklidir. DRP1 ve MFF'in işbirliği içinde mitokondriyal fisyonu düzenlemesi, NOA hastalarındaki aşırı fisyonun mitokondriyal disfonksiyon ve Sertoli hücrelerinin işlev bozukluğuna yol açabileceğini düşündürmektedir. Özellikle MFF ve DRP1 arasındaki etkileşimi hedefleyen terapötik stratejilerin, fizyolojik

fisyonun dengesini koruyarak mitokondriyal disfonksiyonun önlenmesine katkı sağlayabileceği düşünülebilir. Bu bağlamda, fizyolojik fisyon ve patolojik fisyon arasındaki farkların net bir şekilde ayrılması, tedavi stratejilerinin etkinliğini artırabilir (Kornfeld vd., 2018).

Zhao ve Palmer (2011) çalışmalarında, mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesinde MID49, MID51 ve FIS1 arasındaki karmaşık etkileşimleri açıklamışlardır. MID49 ve MID51'in DRP1'i mitokondriyal membrana çekerek, aşırı ekspresyonları ile DRP1'in etkili şekilde inhibe edildiğini ve mitokondriyal fisyonu engellediğini gösterilmiştir. Ancak, FIS1'in yüksek ekspresyonu bu mekanizmayı değiştirerek MID49/MID51'e bağlar ve DRP1'in mitokondriyal fisyonu teşvik edecek şekilde bağlanmasını sağlar. Buna karşılık, FIS1'in aşağı regülasyonu, serbest MID49/MID51 seviyelerini artırarak DRP1'in inhibe edilmesini kolaylaştırır. Bu mekanizmalar, mitokondriyal füzyon ve bölünme dengesinin kontrolünde önemli rol oynar. FIS1, MID49/MID51 ve DRP1 arasındaki denge, mitokondriyal dinamiklerin belirlenmesinde kritik bir rol oynuyor gibi görünmektedir ve bu durum OA ile NOA grupları arasında gözlemlenen farklı mitokondriyal fenotiplerin oluşumunu sağlıyor olabilir. Çalışmamızda, OA grubunda MID49 ve MID51 seviyelerinin NOA grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, NOA grubunda DRP1 ve FIS1 seviyelerinin anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlenmiştir, bu da mitokondriyal fisyonun NOA grubunda daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu durum, FIS1'in MID49/MID51'i bağlayarak DRP1'in mitokondriyal membrana etkili şekilde bağlanmasını teşvik etmesiyle açıklanabilir (Palmer vd., 2011; Zhao vd., 2011).

Mitokondriyal dinamik proteinleri arasındaki karmaşık etkileşimlerin ve spermatogenez ile erkek infertilitesindeki etkilerinin daha ayrıntılı olarak ortaya konulması için bu konuyla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Mitokondriyal dinamiğin önemli bir bileşeni olan mitofaji, disfonksiyonel mitokondrilerin seçici olarak ortadan kaldırılmasını sağlayarak hücrel homeostazın korunmasında kritik bir rol oynar. Memeli hücrelerinde Fis1, hem mitokondriyal fisyonda Drp1 reseptörü olarak hem de mitofajideki rol oynar. Mitokondriyal dış membran proteini olan Fis1'in, farelerde döllenmeden kısa bir süre sonra paternal mitokondrinin degradasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (Rojansky vd., 2016). Fis1 ayrıca Pink1/Parkin'den bağımsız olan mitofajide de rol alabilmektedir. Böylece memeli Fis1'i, mitokondrinin mitofaji yoluyla yok edilmesinde önemli rol oynar (Yamashita vd., 2016).

Bizim çalışmamızda, *FIS1* gen ekspresyonunun NOA grubunda OA grubuna kıyasla Sertoli hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. *FIS1*'in *DRP1* ile paralel şekilde artan ekspresyonu, NOA grubunda mitokondriyal dinamiklerde mitofajinin ön planda olduğunu düşündürmektedir. NOA'da mitofajinin daha aktif olmasının, hasarlı mitokondrilerin temizlenmesine yönelik bir hücrel adaptasyon mekanizması olduğu öne sürülebilir. Bu bulgu, Sertoli hücrelerinde mitofaji mekanizmalarının NOA'da farklı çalıştığını ve bu süreçte *FIS1*'in kritik bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. İlerleyen çalışmalarda, *FIS1*'in Sertoli hücrelerindeki mitofajiye olan katkısının mekanik düzeyde ve diğer mitofaji belirteçleri ile ilişkili olarak detaylı bir şekilde araştırılması önem taşımaktadır.

Mitofaji, yalnızca mitokondrilerin seçici olarak uzaklaştırılmasına odaklanan özel bir otofaji türüdür. Spermatogenez sırasında mitofaji, hücrel homeostazı sürdürmek ve membran trafiği aktivitelere katılmak için kritik bir mekanizma olarak tanımlanmıştır. Eksik veya hatalı mitofajinin spermatogenezi olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Mitokondrilerin sağlıklı bir şekilde korunması için, Pink1/Parkin gibi yollar aracılığıyla hatalı mitokondriler ortadan kaldırılır. Bu süreçte otofaji reseptörleri ve adaptör proteinler önemli bir rol oynar. Pink1/Parkin mekanizmasının yanı sıra, LC3 etkileşim motiflerine sahip diğer proteinler (BNIP3, FUNDC1, vb.) de mitofajiyi tetikleyebilir. Mitofaji, spermatogenezin son aşaması olan spermiogenez sırasında fazla mitokondrilerin ve sitoplazmanın uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar (Rotimi vd., 2024).

Mitofaji kontrolünün mitokondriyal dinamiklerle ilişkili olduğuna dair artan kanıtlar bulunmaktadır. Hasarlı mitokondriye Parkin alınmasına mitokondriyal füzyon faktörü MFN2'nin aracılık ettiği bulunmuştur. Pink1'in, Mfn2'yi fosforilasyonu ile Parkin'in mitokondriye translokasyonunu ve ardından mitokondriyal proteinlerin ubiquitinlenmesini kolaylaştırabilir. Mfn2'nin ifadesinin yokluğunda parkin mitokondriye taşınmaz (Chen ve Dorn, 2013).

Bizim çalışmamızda ise NOA hastalarının Sertoli hücrelerinde *PINK1*, *PARKIN* ve *MFN2* gen ekspresyon düzeylerinin OA grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu belirledik. Bu bulgu, NOA Sertoli hücrelerinde artmış mitokondriyal stresin ve kalite kontrol mekanizmalarının devreye girdiğinin bir göstergesi olabilir. Ayrıca, Pink1/Parkin-Mfn2 yolunun artmış ekspresyonu, mitokondriyal dinamiklerin NOA hastalarında farklı bir

düzenleme gösterdiğini ve bu süreçlerin, hasarlı mitokondrilerin eliminasyonu ile hücrel homeostazın korunmasına yönelik adaptif bir yanıt olduğunu düşündürmektedir.

INF2 (Inverted Formin-2), mitokondriyal fisyon ve aktin sitoskeleton dinamikleri ile ilişkilidir ve bu süreçlerin bir regülatörü veya belirteci olarak değerlendirilir. INF2'nin bilinen bazı rollerine dayanarak mitokondriyal fisyon markırı olarak sınıflandırılabilir (Giacomello vd., 2020). INF2, mitokondriyal fisyon sürecinde önemli bir rol oynar. Özellikle, aktin polimerizasyonunu tetikleyerek mitokondriyi bölünme için hazır hale getirir ve DRP1'in mitokondri üzerine toplanmasını kolaylaştırır. Bu nedenle, INF2 mitokondriyal fisyonun bir markırı olarak kullanılabilir. Ayrıca, INF2, endoplazmik retikulum (ER) ile mitokondri arasında iletişim sağlayan bölgelerde de işlev görür ve ER-mitokondri dinamiklerinde kritik bir rol oynar. Bu, onu hem mitokondriyal fisyon hem de hücrel dinamik süreçlerde önemli bir aktör haline getirir (Hatch vd., 2014).

Çalışmamızda, NOA hastalarının Sertoli hücrelerinde *INF2* ve *DRP1* gen ekspresyonlarının anlamlı derecede arttığını tespit ettik. Bu artış her iki gen için de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hatch ve arkadaşlarının çalışmasında, INF2'nin aktin polimerizasyonunu tetikleyerek mitokondrinin bölünmeye hazırlanmasında ve DRP1'in mitokondriyal yüzeyde birikmesini kolaylaştırmasında kritik bir rol oynadığı belirtilmiştir. Bu literatür bulguları, çalışmamızdaki *INF2* ve *DRP1* ekspresyonundaki artışların mitokondriyal fisyon süreçlerindeki etkilerini destekler niteliktedir.

INF2'nin ekspresyon artışı, mitokondriyal fisyon süreçlerini doğrudan etkileyerek hücrel homeostazın bozulmasına neden olabilir. *DRP1*'in eşzamanlı yüksekliği ise bu fisyon süreçlerinin NOA'daki Sertoli hücrelerinde aktif bir şekilde gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bu bulgular, mitokondriyal dinamiklerin NOA patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğini ve INF2 ile DRP1'in bu süreçlerde potansiyel hedefler olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Çalışmamız, NOA hastalarının Sertoli hücrelerinde *INF2* ve *DRP1* gen ekspresyonunun OA gruplarına kıyasla istatistiksel düzeyde anlamlı artış gösterdiğini ortaya koyan ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır. Sonuç olarak, INF2 ve DRP1'in birlikte artışı, NOA hastalarında artmış mitokondriyal fisyonu göstermektedir. Bu bulgular, mitokondriyal dinamiklerin NOA'daki rolünü daha iyi anlamak için gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

Mitokondriyal dinamikler, hem fisyon hem de füzyon süreçlerini kapsayarak hücrel homeostazın korunmasında kritik bir rol oynar. Mitokondriyal fisyon, hücre büyümesi ve bölünmesi sırasında yeterli sayıda mitokondri sağlamanın yanı sıra hücrel polariteyi sürdürmek ve hasarlı mitokondrileri ortadan kaldırmak için gereklidir. Buna karşılık, mitokondriyal füzyon, mitokondriyal içeriğin değişimi ve bağlantısını sağlayarak yeterli enerji üretimi, oksidatif hasarın hafifletilmesi ve zar potansiyelinin korunmasına katkıda bulunur (Ren vd., 2020).

Son dönemde yapılan çalışmalar, mitokondriyal füzyonun da tıpkı fisyon gibi ER-mitokondri temas noktalarında gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Bu durum, bu zıt süreçler arasında dinamik bir ağınlı sürekliliğini sağlamak için beklenenden daha fazla bir düzenleme olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, mitokondriyal dinamikler arasındaki bu etkileşim, NOA patofizyolojisinde mitokondriyal disfonksiyonu anlamak için önemli bir perspektif sunmaktadır. Bu bulgular, hücrel homeostazı koruma ve germ hücrelerinde meydana gelen problemleri telafi etme çabalarının bir yansıması olarak değerlendirilebilir.

Mitokondriyal morfolojilerin, belirli hücrel ve doku talepleri doğrultusunda adaptif değişikliğe uğrabilirdiği ve sitozolik sinyallere karşı mitokondriyal yanıtı yönetebildiği gösterilmiştir. Mitokondriyal morfolojik değişiklikler sadece hücre ölüm yolları uyarıldığında değil, aynı zamanda besin stresine yanıt olarak da meydana gelir; bu durumda mitokondri önce uzar, sonra parçalanır. Bu nedenle, mitokondriyal dinamiklerin (özellikle füzyon ve fisyonun) bozulmasının, insanlarda çeşitli genetik hastalıklarla ilişkilendirilmesi ve bu süreçlerin moleküler etkenlerinin çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara tabi olması şaşırtıcı değildir; bu modifikasyonlar, mitokondriyal zar dinamiğini hücre sinyalizasyonu ile eşleştirmeyi sağlar ve mitokondriyal dinamiklerin hücrel durumlara karşı duyarlılığını ve yanıt verebilirliğini yansıtır (Giacomello vd., 2020).

Mitokondriyal dinamikler, hücrel enerji üretimi ve metabolik ihtiyaçların karşılanmasında önemli bir rol oynar. T hücrelerinde olduğu gibi, metabolik yeniden programlama, mitokondriyal dinamiklerle birlikte hücrel işlevlerin düzenlenmesinde kritik bir süreçtir. Çoğalan efektör T hücreleri yüksek derecede glikolitik olup, mitokondrileri büyük ölçüde parçalanmış haldedir buna karşın hafıza ve düzenleyici T hücreleri metabolizmalarını OXPHOS'a doğru kaydırır ve mitokondriler, fisyonun azalması nedeniyle daha uzun hale gelir. T hücrelerinde, çoğalan hücrelerin glikolitik metabolizmaya yönelmesi ve mitokondriyal parçalanma, hücrelerin hızlı enerji ihtiyacını karşılamak için adaptif bir

strateji olarak ortaya çıkar. Bu bağlamda, mitokondriyal füzyon ve fisyon arasındaki denge, hücrelerin enerji üretimindeki esnekliğini ve fonksiyonel ihtiyaçlarını karşılamak için oldukça önemlidir (Kraus vd., 2021).

Benzer şekilde, spermatogenez sürecinde de mitokondriyal dinamiklerin ve metabolik geçişlerin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Varuzhanyan ve Chan, 2020). Sertoli hücreleri, spermatogenezde germ hücrelerine metabolik destek sağlayan temel hücrelerdir. Bu hücreler, spermatogenez için kritik bir enerji kaynağı olarak işlev görür. Ancak, sonuçlarımız NOA durumunda, bu normal metabolik süreçlerin bozulmuş olabileceğini ve mitokondriyal dinamiklerin farklılaştığını düşündürmektedir.

Bugüne kadar, NOA'da Sertoli hücrelerindeki düzenleyici işlev bozukluklarının germ hücrelerinin olgunlaşması ve spermatogenez süreci üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda, NOA Sertoli hücrelerinde hem mitokondriyal füzyon ve hem de fisyonun artmış olduğunu gözlemledik, bunun füzyon ve fisyon arasındaki dengeyi devam ettirmek üzere gelişmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bulgular aynı zamanda, mitokondriyal dinamiklerin, NOA Sertoli hücrelerinde spermatogenezin normal olduğu OA Sertoli hücrelerindeki gibi gerçekleşmediğini ve mitokondriyal enerji üretiminin etkili bir şekilde sağlanamadığının da göstergesi olarak yorumlanabilir.

Sertoli hücrelerinin mitokondriyal dinamiklerindeki bozulma, spermin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını ciddi şekilde etkileyebilir. Sertoli hücreleri, spermatogenez sürecinde besleyici ve destekleyici bir rol oynar, aynı zamanda mitokondriyal dinamikleri düzenleyerek spermatositlerin olgunlaşmasına katkıda bulunurlar. Bu hücrelerin mitokondriyal işlevlerinde bir bozulma olduğunda, spermin farklılaşmasında olumsuz etkiler gözlemlenebilir. Mitokondriler, hücrelerde enerji üretiminden sorumludur. Sertoli hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonlarındaki bozulma, ATP üretimini düşürür. Spermatogenez, yüksek enerji gerektiren bir süreçtir, çünkü spermin farklılaşması ve olgunlaşması için ciddi bir enerji harcanır. Sertoli hücrelerinin enerji desteği olmadan, spermatositler düzgün bir şekilde olgunlaşamaz, bu da sperm üretiminde azalmaya ve kalitesiz spermin oluşmasına yol açar. Mitokondriler, hücresel enerji üretimi sırasında serbest radikaller (reaktif oksijen türleri) üretir. Normalde, Sertoli hücreleri antioksidanlar aracılığıyla bu serbest radikalleri temizler ve oksidatif stresi dengeler. Ancak mitokondriyal

bozulmalar oksidatif stresin artmasına neden olabilir. Bu da hücrelere zarar verir, genetik materyalin bozulmasına yol açar ve spermatogenez sürecinde hatalı veya ölmesi gereken hücrelerin birikmesine yol açar. Bu durum, spermin kalitesini, motilitesini ve genetik bütünlüğünü olumsuz yönde etkiler. Mitokondriyal fisyon ve füzyon dengesinin bozulması, hücre fonksiyonu bozulmasına ve sonunda spermatogenez sürecinin herhangi bir aşamasında sperm gelişimini engellenmesine neden olabilir. Sertoli hücreleri, olgunlaşmamış veya hasarlı germ hücrelerini apoptoz (hücre ölümü) yoluyla temizler. Bu süreç, sperm gelişiminde önemli bir aşamadır. Mitokondriyal bozulmalar, apoptoz mekanizmalarını etkileyebilir, bu da anormal veya hasarlı hücrelerin birikmesine neden olabilir. Bu durum, olgunlaşmamış ve fonksiyonel olmayan spermelerin sayısında artışa yol açar. Ayrıca Sertoli hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonlarındaki bozulma, spermiyogenez aşamasında sperm hücresinin orta kısmındaki mitokondriyal yoğunluğunu negatif etkiler. Bu, spermin hareketliliğini ve doğru şekilde yönlendirilmesini zorlaştırır, bu da infertilite sorunlarına neden olabilir. Özetle, Sertoli hücrelerinin mitokondriyal dinamiklerindeki bozulmalar, spermatogenez sürecinin farklı aşamalarını olumsuz şekilde etkileyebilir.

Eid vd., (2019) yaptıkları çalışmada, etanolün rat Sertoli hücrelerinde mitokondriyal hasara neden olduğunu ve bu hasarın mitofaji yoluyla yönetildiğini ortaya koymaktadır. Araştırmada, etanolün PINK1-Parkin yolunu aktive ederek mitofajiyi artırdığı ve bunun hücrelerin apoptoza karşı korunmasını sağladığı gösterilmiştir. Hasarlı mitokondriler, LC3-II proteini ile işaretlenerek otofagozomlar içine alınmış, ardından lizozomlarla birleşerek mitofagolizozomları oluşturmuştur. Çalışma, mitofajinin oksidatif stres gibi etanol kaynaklı hücre hasarlarına yanıt olarak aktivasyonunu doğrulamış, bunun Sertoli hücrelerinde apoptozu baskılayan ve testiküler homeostazı koruyan bir mekanizma olduğunu göstermiştir. Ayrıca, mitokondriyal proteinlerin azalması mitofajiyi desteklediği bulunmuştur. Parkin'in mitokondriye translokasyonu ve PINK1 ile iş birliği, hasarlı mitokondrilerin temizlenmesini sağlayarak hücre stresin etkilerini hafifletmiştir. Bu bulgular, mitofajinin yalnızca toksik etkilerden korunmada değil, aynı zamanda erkek kısırlığı gibi durumlar için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini ortaya koymaktadır (Eid vd., 2019).

Bizim çalışmamızda NOA hastalarında Sertoli hücrelerinde PINK1 ve Parkin ekspresyonunun yüksek olması, bu hücrelerde mitokondriyal stresin arttığını ve bunun mitofajiyi tetiklediğini düşündürmektedir. Bu durum, NOA'da mitokondriyal hasarın artmış olabileceğini ve hücrelerin hayatta kalmasını sağlamak için bu hasarı temizlemeye yönelik bir savunma mekanizmasının devreye girdiğini işaret eder. BCL-2 ekspresyonundaki artışın

NOA'da gözlemlenmesi de dikkat çekicidir. BCL-2, genellikle anti-apoptotik bir protein olarak bilinir ve hücrelerin apoptoza direnmesine yardımcı olur. Ancak yüksek PINK1 ve Parkin ile birlikte BCL-2'nin artışı, mitokondriyal stresin artışı ve hücre adaptasyon şeklinde yorumlanabilir. Yani Sertoli hücreleri, bu durumdan sağ çıkabilmek için hem mitofajik hem de anti-apoptotik mekanizmaları aktif hale getirmiş olabilir. NOA'da germ hücre kaybıyla birlikte Sertoli hücreleri üzerindeki metabolik yükün artması, hücreleri mitokondriyal temizlenmeyi artırmaya ve apoptoza baskılamaya zorlamış olabilir. Ayrıca, kronik mitokondriyal stresin hem PINK1/Parkin yolunu hem de BCL-2'nin aktivasyonunu tetiklediği düşünülebilir. Bu durum, Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarını sürdürebilmek için direnç göstermeye çalıştığını, ancak germ hücre desteğini tam olarak sağlayamamalarının NOA'nın patofizyolojisinde rol oynayabileceğini gösterir. Bu bulgular, NOA tedavisinde mitokondriyal hedeflere yönelik terapötik yaklaşımlar için değerli ipuçları sunmaktadır.

Mitokondriyal füzyon normal koşullarda hücreyi apoptoza yönlendirmez, ancak post-translasyonel modifikasyonlarla bu durum değişebilir. Pyakurel vd.'nin çalışmasında ERK kinaz'ın Mitofusin1'i fosforile etmesi, füzyonu baskılayarak apoptotik mitokondriyal permeabilizasyonu ve BAK oligomerizasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Bu bulgu, füzyonun hücre kaderindeki rolünün post-translasyonel modifikasyonlarla hücre tipine göre farklılaşabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, protein ekspresyon seviyelerinin yanı sıra, füzyonu indükleyen veya baskılayan bu tür modifikasyonları değerlendirmek önemlidir (Pyakurel vd., 2015).

Gen ekspresyon seviyesi yüksek olmasına rağmen, proteinin aktivitesi post-translasyonel modifikasyonlarla düzenleniyor olabilir. Örneğin, fosforilasyon, ubiquitinasyon veya asetilasyon gibi modifikasyonlar, füzyon veya füzyon proteininin işlevselliğini baskılayarak bu artışın fonksiyonel bir etkisinin ortaya çıkmasını engelleyebilir. Bu durum, erkek infertilitesinde bu makırların sadece gen düzeyinde değil, protein seviyesinde ve post-translasyonel modifikasyonlarının da dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Mitokondriyal dinamiklerin erkek infertilitedeki önemi ve bu süreçlerin NOA gibi durumlarda nasıl bozulduğuna dair daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Sertoli hücreleri, normalde mitokondriyal fonksiyonları düzenleyen hücreler olarak görev alırken, NOA durumunda bu işlevin aksadığı ve mitokondriyal füzyon ve fisyon süreçlerinin dengesizleştiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, mitokondriyal dinamiklerin spermatogenezdeki rolünü anlamamıza yardımcı olmakla birlikte, gelecekte yapılacak

alışmalarla bu süreçlerin daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Erkek kaynaklı infertilite, dünya genelindeki kısır çiftlerin %50'sini etkiler. Bunun en ağır formu olan non-obstrüktif azoospermi (NOA), infertil erkeklerin %10-15'inde görülür. NOA tedavisi genellikle mikroskopik cerrahi sperm ekstraksiyonu ve tüp bebek yöntemiyle yapılan intraplasmik sperm enjeksiyonunu içerir. Ancak, bu işlemlerle sperm elde etme oranı yaklaşık %50 olup, canlı doğum oranları %21-46 arasında değişmektedir (Piechka vd., 2024).

Rejeneratif tedaviler potansiyel bir çözüm sunabilir, ancak bu hedefe ulaşmak için hücre tipine özgü mekanizmaların detaylı bir şekilde anlaşılması gereklidir. NOA'da, testis hücrelerindeki disfonksiyon mekanizmalarına dair pek çok faktör ortaya konmuştur. Bu mekanizmalar arasında somatik hücre olgunlaşmaması, büyüme faktörü sinyalleşmesindeki bozukluklar, artmış inflamasyon, hücre ölümü (apoptoz) oranlarının yükselmesi ve anormal hücre dışı matris düzenlemeleri yer alır.

Gelecekte, somatik ve germ hücrelerdeki spermatogenez nişi disfonksiyonunu anlamak için, hücresel transkripsiyon ve translasyon modülatörlerini incelemeye yönelik daha spesifik araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Memeli spermatogenezi, enerji ihtiyacının yüksek olmasının yanı sıra, spermatogonyal kök hücreden olgun sperm hücresinin oluşumunu içeren ve bu aşamalar esnasında germ hücrelerinin maturasyonu için binlerce genin, farklı hücrelerin görev aldığı biyolojideki en karmaşık ve uzun farklılaşma süreçlerinden biridir. Bu farklılaşma süreci, gelişimsel olarak düzenlenmiş birkaç mitokondriyal ve metabolik geçişi gerektirmektedir, bu da spermatogenez sürecindeki mitokondriyal dinamiklerin incelenmesini çekici bir model sistem haline getirmektedir.

İnsan spermatogenezinin genetik kontrolünde binlerce genin rol oynadığı tahmin edilmektedir, ancak bu genlerin çoğunluğunun erkek infertilitesindeki fonksiyonel rolü halen yeterince anlaşılamamıştır. İnfertil erkeklerde, mitokondriyal dinamikte önemli rolü olan genlerin ifadeleri farklılık gösterebilir ve bu farklılıklar infertilite etyolojisinin aydınlatılmasına, yeni biyobelirteçlerinin belirlenmesine ve mitokondriyal dinamik defekti olan infertil hastalarda tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Mitokondriyal dinamiğin birçok sistemdeki önemi son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Erkek infertilitesiyle ilgili Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamiği incelemek üzere yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması insan Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamiğin incelendiği **ilk çalışma** olması nedeniyle özgün değeri yüksektir.

Literatürde bu konuyla ilgili çalışma bulunmaması ve bu yönüyle mitokondriyal dinamiğin Sertoli hücrelerindeki öneminin bu çalışma ile ortaya konulması nedeniyle özgün değeri yüksek olan çalışmamızın, NOA etyolojisinin aydınlatılması ve tedavisi ile ilgili yeni ufuklar açma potansiyeli taşıdığını ve literatüre önemli katkılarda bulunacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışmada NOA hastalarında mitokondriyal dinamiklerin yeniden düzenlenmesinin, hücrel enerji metabolizmasını desteklemek ve hasarlı mitokondrilerin temizlenmesini optimize etmek amacıyla bir adaptasyon mekanizması olarak işlediğini düşündürmektedir. Özellikle füzyon ve fisyon süreçlerindeki bu artış, NOA patofizyolojisinde mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarının rolünün önemli olabileceğini ve Sertoli hücrelerinin enerji taleplerine yönelik farklılaşmış bir yanıt geliştirdiğini göstermektedir. NOA hastalarında bu süreçlerin eş zamanlı olarak daha fazla aktive olması, hücrelerin enerji metabolizmasını düzenlemek ve hayatta kalmak için özelleşmiş bir yanıt geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, erkek infertilitesinde mitokondriyal dinamiklerin etkisinin daha detaylı bir şekilde araştırılmasının gerekliliğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada, hasta grubu olarak Non-obstrüktif azoospermi (NOA) tanısı almış infertil erkekler ve spermatogenezi normal kabul edilen kontrol grubu olarak obstrüktif azoospermili (OA) infertil erkekler çalışmaya dahil edildi, hasta ve kontrol grubundaki erkek bireylerden mikroTESE ile elde edilen testis dokularından izole edilen ve kültürü yapılan Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamiği regüle eden önemli genlerin ifadelerinin QRT-PCR ile analizi ve mitokondriyal dinamiğin fertilite üzerine olası etkileri incelendi.

NOA hastaların Sertoli hücrelerinin tanımlanması, Sertoli hücrelerine özgü belirteçler olan Vimentin ve GATA4 özgün antikoriyla boyanarak ve akım sitometri cihazı kullanılarak yapıldı, sonuçlar yüzdesel olarak değerlendirildi. Çalışmamızda elde edilen Sertoli hücrelerinin beklenildiği gibi Vimentin ve GATA4 için yüksek oranda pozitif olduğu tespit

edildi. Sertoli hücrelerinde mitokondriyal füzyon belirteci olarak *MFN1*, *MFN2*, *OPA1* genleri, fisyon belirteci olarak *DRP1* ve *DRP1* reseptörleri *FIS1*, *MFF*, *MID49*, *MID51*, *INF2* genleri ve mitofaji belirteci olarak *PINK1*, *PARKIN*, *LC3*, *FIS1* genlerinin ifadeleri QRT-PCR ile incelenmiştir.

1. NOA grubunda kontrol grubu olarak belirleyen OA grubuna göre Sertoli hücrelerindeki mitokondriyal füzyonunda önemli rolü olan *MFN1*, *MFN2* ve *OPA1* genlerinin ekspresyonlarının arttığı görüldü. Çalışmamızda, NOA grubunda mitokondriyal dış membran füzyonunda rol oynayan *MFN1* gen ekspresyonunun OA grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği, *MFN2* gen ekspresyonunda artış olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Mitokondriyal içi membran füzyonunda önemli olan *OPA1* gen ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, *OPA1* geni ekspresyonunun NOA grubunda OA grubuna göre arttığı bulunmuştur.

Memeli hücrelerinde *MFF*, mitokondriyal fisyonunda *DRP1* reseptörü olarak bir role sahiptir. Çalışmamızda, mitokondriyal fisyonunda önemli rol oynayan *DRP1* ve reseptörü olan *MFF* gen ekspresyonlarının NOA grubunda OA grubuna kıyasla Sertoli hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. *DRP1* ve *MFF*'nin Sertoli hücrelerinde ekspresyon seviyelerinin bu şekilde incelendiği **ilk çalışma** olması nedeniyle elde edilen sonuçların literatür açısından önemli bir bulgu olduğu düşünülmektedir.

Öneri:

- Sonuçlarımız, NOA grubundaki mitokondriyal fisyon süreçlerinin daha detaylı bir şekilde incelenmesini gerektirmekte olup bu bağlamda, ilerleyen çalışmalarda gen ekspresyon seviyelerinin protein düzeyindeki karşılıklarının ve bu süreçlerin fonksiyonel etkilerinin değerlendirilmesi önerilmektedir. Ayrıca, *DRP1* ve *MFF*'nin Sertoli hücrelerindeki rollerini ve aralarındaki mekanizmayı anlamak için ileri düzey çalışmalar yapılması ve fisyonun spermatogenez sürecindeki etkilerinin detaylı bir şekilde incelenmesinin gerektiği düşünülmektedir.
- Fisyonun stres koşullarında arttığı, özellikle mitokondri hasarı durumunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) yükseldiği göz önüne alındığında, OA ve NOA gruplarında fisyonun artışını tespit etmemiz, bu iki grupta ROS seviyelerinin ölçülmesini önemli bir öneri haline getirmektedir. Ayrıca, mitokondriyal fonksiyonları daha kapsamlı değerlendirebilmek için OA ve NOA gruplarında ATP düzeylerinin ölçülmesi de

çalışmanın devamı için planlanmıştır. ROS ve ATP seviyelerinin analizi, mitokondriyal dinamiklerdeki değişikliklerin spermatogenez üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak ve OA ile NOA arasındaki olası farkları ortaya koymak adına kritik bilgiler sağlayabilir.

- Çalışmanın devamında, *DRP1* ve mitokondriyal dinamiklerde önemli olan belirteçlerin translasyon sonrası modifikasyonlarının, hem spesifik bölgelerdeki etkileri hem de biyolojik dinamiklerdeki aktivitelerinin düzenlenmesindeki rollerinin detaylı bir şekilde incelenmesi planlanmaktadır. Bu sayede, örneğin *DRP1*'in farklı hücreler ve dokulardaki işlevlerini daha iyi anlamak ve bu belirteçleri hedefleyen potansiyel tedavi yaklaşımları geliştirmek mümkün olabilir.

2. Bu çalışmada, NOA Sertoli hücrelerinde *MID49* ve *MID51* gen ekspresyonlarının seviyelerinde OA Sertoli hücrelerine kıyasla bir artış tespit edilmemiş, aksine OA grubunda daha yüksek seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, NOA'da mitokondriyal fisyonun devam ettiği, ancak *MID49* ve *MID51*'in bu süreçte baskılayıcı bir etkisinin olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu çalışma, erkek infertilitesinde NOA ve OA Sertoli hücrelerinde *MID49* ve *MID51* gen ekspresyonunu inceleyen **ilk çalışma** olması bakımından önem taşımaktadır.

Öneri

- Mitokondriyal fisyonu modüle eden yolların daha fazla incelenmesi, NOA'nın patofizyolojisine yönelik potansiyel tedavi stratejileri geliştirilmesi açısından önemli olabilir. Ayrıca, *DRP1* inhibisyonunun mitokondriyal dinamikleri kontrol etmek için terapötik bir hedef olarak değerlendirilebileceği önerilmektedir.

Çalışmamızda, ER'den lokalize olan ve aktin polimerizasyonunda rol oynayan, aynı zamanda ER ile mitokondri arasındaki etkileşimde kritik bir işlev üstlenen Inverted Formin 2 (*INF2*) gen ekspresyonunun, NOA grubunda OA grubuna kıyasla Sertoli hücrelerinde *DRP1* ile orantılı ve yüksek düzeyde olduğu **ilk kez** gösterilmiştir. Bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. *INF2*'nin *DRP1* ile birlikte mitokondriye gelmeden önce ön daralma mekanizmasında yer alması, bu genin NOA grubunda fizyolojik önemi olabileceğini düşündürmektedir.

INF2, Sertoli hücrelerinde ER-mitokondri etkileşimleri ve aktin polimerizasyon mekanizmaları için potansiyel bir biyobelirteç olabilir.

- İlerleyen çalışmalarda, ER kaynaklı diğer reseptörlerin ve proteinlerin bu süreçlerdeki rollerine odaklanması ve INF2'nin DRP1 ile etkileşiminin mekanik düzeyde daha detaylı incelenmesi önerilmektedir. Özellikle, bu genlerin spermatogenez üzerindeki etkilerinin aydınlatılması, tedavi yaklaşımları geliştirmek açısından önem arz etmektedir.

3. Mitofaji'de önemli markır olarak görev yapan *FIS1* gen ekspresyonunun NOA grubunda OA grubuna göre Sertoli hücrelerinde anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. *FIS1*'in DRP1 ile paralel artışı, mitokondriyal mitofaji sürecinin NOA'da daha aktif olduğunu ve hasarlı mitokondrilerin temizlenmesine yönelik bir adaptasyon mekanizması olarak işlediğini göstermektedir.

Öneri

- *FIS1*'in Sertoli hücrelerindeki rolü ve mitofajiye etkisinin daha ayrıntılı şekilde incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca, *FIS1* ve diğer mitofaji belirteçlerinin etkileşiminin araştırılması, NOA tedavisi için yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesine katkı sağlayabilir.

4. Çalışmamızda hasarlı mitokondri degradasyonunda rolü olan *PINK1*, *PARKIN* ve *LC3* gen ifadelerinin NOA olgularında kontrol gurubu olan OA olgularına göre arttığı saptanmıştır. Bu durum, NOA patogenezinde hasarlı mitokondri degradasyonu ve otofaji süreçlerinin önemli bir rol oynayabileceğini, ayrıca *PINK1*-*PARKIN* bağımsız mitofaji yollarının da etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Öneri

- NOA'nın altında yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılması için *PINK1*-*PARKIN* bağımsız mitofaji yollarının da araştırılması önerilir. Bu bağlamda, mitokondriyal fonksiyon ve mitofaji düzenleyicilerini hedef alan yeni tedavi stratejileri geliştirilebilir.

5. Çalışmamız, NOA hastalarında anti-apoptotik etkili *BCL2* gen ifadesinin arttığını göstermiştir. Bu artış, NOA'da hücrel hayatta kalma mekanizmalarının aktive olduğunu düşündürmektedir. NOA tedavisinde, *BCL2* aracılı hücrel hayatta kalma mekanizmalarını hedef alan terapötik yaklaşımlar için *in vivo* hayvan veya üç boyutlu kültür çalışmaları planlanması uygun olabilir.

Çalışmamız, Sertoli hücrelerinde mitokondriyal füzyon ve fisyon süreçlerine ait gen ekspresyonlarının NOA hastalarında yüksek olduğunu **ilk kez** ortaya koymuştur. Bu bulgular NOA Sertoli hücrelerinde mitokondriyal dinamik süreçlerin farklı biçimde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Sonuçlarımız, mitokondriyal fisyon ve füzyon genlerinin ifadelerinin artışı; normal spermatogenezin gerçekleşmemesi için bir neden olabileceği gibi, anormal spermatogenez sürecini kompanse etmek üzere adaptif bir sonucun göstergesi de olabilir. Her iki durum da enerji üretiminde aksaklığın olduğunu ve bunun NOA patogeneğinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Bu sonuçlar, NOA olgularının Sertoli hücrelerinde füzyon ve fisyon süreçlerinin farklı çalıştığını göstermekte olup NOA tedavisinde mitokondriyal hedeflere yönelik terapötik yaklaşımlar için değerli ipuçları ortaya koymaktadır. Mitokondriyal dinamikleri düzenlemeye yönelik, mitokondriyal füzyon ve fisyon süreçlerini hedefleyen yeni yaklaşımlar, infertilite etyolojisini aydınlatmada ve tedavisinde umut verici olabilecek nitelikte olup, tedaviye yönelik yapılacak *in vivo* hayvan çalışmaları ve üç boyutlu *in vitro* kültür çalışmalarına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Agarwal, A., Roychoudhury, S., Sharma, R., Gupta, S., Majzoub, A., & Sabanegh, E. (2017). Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reproductive biomedicine online*, 34(1), 48-57.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., ... & Wissinger, B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature genetics*, 26(2), 211-215.
- Allais-Bonnet, A., & Pailhoux, E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2, 56.
- Alves, M. G., Rato, L., Carvalho, R. A., Moreira, P. I., Socorro, S., & Oliveira, P. F. (2013). Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cellular and molecular life sciences*, 70, 777-793.
- Anniballo, R., Ubaldi, F., Cobellis, L., Sorrentino, M., Rienzi, L., Greco, E., & Tesarik, J. (2000). Criteria predicting the absence of spermatozoa in the Sertoli cell-only syndrome can be used to improve success rates of sperm retrieval. *Human reproduction*, 15(11), 2269-2277.
- Arıkan, Y., Keskin, M. Z., & Karabacakoğlu, B. (2024). Non-obstrüktif azospermiye güncel yaklaşım. *Androloji Bülteni (Andrology Bulletin)*, 26(1).
- Aydos, K. (2008). Androlojinin Yeni Uğraş Alanı: Spermatogonial Kök Hücre Nakli. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 28(6), 122-124.
- Bahat, A., & Gross, A. (2019). Mitochondrial plasticity in cell fate regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(38), 13852-13863.
- Baklouti-Gargouri, S., Ghorbel, M., Ben Mahmoud, A., Mkaouer-Rebai, E., Cherif, M., Chakroun, N., ... & Ammar-Keskes, L. (2014). Identification of a novel m. 9588G> a missense mutation in the mitochondrial COIII gene in asthenozoospermic Tunisian infertile men. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31, 595-600.
- Barratt, C. L. R., Naeeni, M., Clements, S., & Cooke, I. D. (1995). Andrology: clinical value of sperm morphology for in-vivo fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992. *Human Reproduction*, 10(3), 587-593.
- Benard, G., Trian, T., Bellance, N., Berger, P., Lavie, J., Espil-Taris, C., ... & Rossignol, R. (2013). Adaptive capacity of mitochondrial biogenesis and of mitochondrial dynamics in response to pathogenic respiratory chain dysfunction. *Antioxidants & redox signaling*, 19(4), 350-365.
- Bernie, A. M., Shah, K., Halpern, J. A., Scovell, J., Ramasamy, R., Robinson, B., & Schlegel, P. N. (2015). Outcomes of microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia due to maturation arrest. *Fertility and sterility*, 104(3), 569-573.

- Boussouar, F., & Benahmed, M. (2004). Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(7), 345-350.
- Bui, H. T., & Shaw, J. M. (2013). Dynamin assembly strategies and adaptor proteins in mitochondrial fission. *Current Biology*, 23(19), R891-R899.
- Chan, D. C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annual review of genetics*, 46, 265-287.
- Chan, D. C. (2020). Mitochondrial dynamics and its involvement in disease. *Annual review of pathology: mechanisms of disease*, 15, 235-259.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology*, 160(2), 189-200.
- Chen, L., Liu, B., Qin, Y., Li, A., Gao, M., Liu, H., & Gong, G. (2021). Mitochondrial fusion protein Mfn2 and its role in heart failure. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 681237.
- Chen, Y., & Dorn, G. W. (2013). PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*, 340(6131), 471-475.
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, 64(1), 16-64.
- Cheng, Y. S., Lu, C. W., Lin, T. Y., Lin, P. Y., & Lin, Y. M. (2017). Causes and clinical features of infertile men with nonobstructive azoospermia and histopathologic diagnosis of hypospermatogenesis. *Urology*, 105, 62-68.
- Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), 15927-15932.
- Cocuzza, M., Alvarenga, C., & Pagani, R. (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics*, 68, 15-26.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., ... & Scorrano, L. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155(1), 160-171.
- Cooper, T. G., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. G., Behre, H. M., ... & Vogelsong, K. M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update*, 16(3), 231-245.
- Costa, J., Braga, P. C., Rebelo, I., Oliveira, P. F., & Alves, M. G. (2023). Mitochondria quality control and male fertility. *Biology*, 12(6), 827..

- Demain, L. A., Conway, G. S., & Newman, W. G. (2017). Genetics of mitochondrial dysfunction and infertility. *Clinical genetics*, 91(2), 199-207.
- Du Plessis, S. S., Kashou, A. H., Benjamin, D. J., Yadav, S. P., & Agarwal, A. (2011). Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 1-12.
- Durairajanayagam, D., Singh, D., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*, 53(1), e13666.
- Eid, N., Ito, Y., Horibe, A., Otsuki, Y., & Kondo, Y. (2019). Ethanol-induced mitochondrial damage in sertoli cells is associated with parkin overexpression and activation of mitophagy. *Cells*, 8(3), 283.
- Elzanaty, S. (2013). Non-obstructive azoospermia and clinical varicocele: therapeutic options. *International urology and nephrology*, 45, 669-674.
- Escobar-Henriques, M., & Joaquim, M. (2019). Mitofusins: disease gatekeepers and hubs in mitochondrial quality control by E3 ligases. *Frontiers in physiology*, 10, 455542.
- Esteves, S. C., Miyaoka, R., & Agarwal, A. (2011). An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*, 66(4), 691-700.
- Fang, F., Ni, K., Shang, J., Zhang, X., Xiong, C., & Meng, T. (2018). Expression of mitofusin 2 in human sperm and its relationship to sperm motility and cryoprotective potentials. *Experimental Biology and Medicine*, 243(12), 963-969.
- Fealy, C. E., Mulya, A., Lai, N., & Kirwan, J. P. (2014). Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 117(3), 239-245.
- Filadi, R., Pendin, D., & Pizzo, P. (2018). Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell death & disease*, 9(3), 330.
- Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., & Voeltz, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 334(6054), 358-362.
- GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. 2007. *Color Textbook of Histology*, Saunders/Elsevier.
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(4), 204-224.
- Griswold, M. D. (1998, August). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 9, No. 4, pp. 411-416). Academic Press.
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological reviews*, 96(1), 1-17.

- Hales, K. G., & Fuller, M. T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, 90(1), 121-129.
- Harchegani, A. B., Shafaghathian, H., Tahmasbpour, E., & Shahriary, A. (2018). Regulatory functions of MicroRNAs in male reproductive health: a new approach to understanding male infertility. *Reproductive Sciences*, 1933719118765972.
- Hatch, A. L., Gurel, P. S., & Higgs, H. N. (2014). Novel roles for actin in mitochondrial fission. *Journal of cell science*, 127(21), 4549-4560.
- Hu, C., Huang, Y., & Li, L. (2017). Drp1-dependent mitochondrial fission plays critical roles in physiological and pathological progresses in mammals. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 144.
- Hwang, K., Smith, J. F., Coward, R. M., Penzias, A., Bendikson, K., Butts, S., ... & Vernon, M. (2018). Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 109(5), 777-782.
- Ishihara, N., Eura, Y., & Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of cell science*, 117(26), 6535-6546.
- Jarvi, K., Lo, K., Fischer, A., Grantmyre, J., Zini, A., Chow, V., & Mak, V. (2010). CUA Guideline: The workup of azoospermic males. *Canadian Urological Association Journal*, 4(3), 163.
- Johannisson, R., Schulze, W., & Holstein, A. F. (2003). Megalospermatocytes in the human testis exhibit asynapsis of chromosomes. *Andrologia*, 35(3), 146-151.
- Kerr, J. B. (1992). 1 functional cytology of the human testis. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*, 6(2), 235-250.
- Kierszenbaum, A. L. (2006). Cell- cycle regulation and mammalian gametogenesis: A lesson from the unexpected. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 73(8), 939-942.
- Kim, E. D., Greer, J. A., Abrams, J., & Lipshultz, L. I. (1996). Testicular touch preparation cytology. *The Journal of urology*, 156(4), 1412-1414.
- Koç, F., & Sarıca, Y. (2003). Mitokondri; Biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(5).
- Koh, E., Maeda, Y., Choi, J., & Namiki, M. (2006). Sertoli cell-only syndrome. *Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 241-244.
- Kornfeld, O. S., Qvit, N., Haileselassie, B., Shamloo, M., Bernardi, P., & Mochly-Rosen, D. (2018). Interaction of mitochondrial fission factor with dynamin related protein 1 governs physiological mitochondrial function in vivo. *Scientific reports*, 8(1), 14034
- Korobova, F., Ramabhadran, V., & Higgs, H. N. (2013). An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science*, 339(6118), 464-467.

- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305(5685), 858-862.
- Kraus, F., Roy, K., Pucadyil, T. J., & Ryan, M. T. (2021). Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature*, 590(7844), 57-66.
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology*, 13, 1-11.
- L Mescher, A. (2013). Junqueira's basic histology: text and atlas.
- Lakpour, M. R., Aghajani, S., Koruji, M., Shahverdi, A., Sadighi-Gilani, M. A., Sabbaghian, M., ... & Rajabian-Naghandar, M. (2017). Isolation, culture and characterization of human sertoli cells by flow cytometry: Development of procedure. *Journal of Reproduction & Infertility*, 18(2), 213.
- Li, D., Wang, J., Jin, Z., & Zhang, Z. (2019). Structural and evolutionary characteristics of dynamin-related GTPase OPA1. *PeerJ*, 7, e7285.
- Liesa, M., Palacín, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews*, 89(3), 799-845.
- Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., & Hajnóczky, G. (2009). Mitochondrial 'kiss- and- run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *The EMBO journal*, 28(20), 3074-3089.
- Lord, T., & Nixon, B. (2020). Metabolic changes accompanying spermatogonial stem cell differentiation. *Developmental cell*, 52(4), 399-411.
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*, 24(5), 659-667.
- Luca, G., Arato, I., Sorci, G., Cameron, D. F., Hansen, B. C., Baroni, T., ... & Calafiore, R. (2018). Sertoli cells for cell transplantation: pre- clinical studies and future perspectives. *Andrology*, 6(3), 385-395.
- Mathur, P. P., Francispillai, M., Vaithinathan, S., & Agarwal, A. (2011). NF-κB in male reproduction: A boon or a bane?. *Open Reproductive Science Journal*, 3(1), 85-91.
- McDougal, W. S., Wein, A. J., Kavoussi, L. R., Partin, A. W., & Peters, C. A. (2015). *Campbell-Walsh urology 11th edition review E-book*. Elsevier Health Sciences.
- Mirzapour, T., Movahedin, M., Tengku Ibrahim, T. A., Koruji, M., Haron, A. W., Nowroozi, M. R., & Rafieian, S. H. (2012). Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short- term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia*, 44, 41-55.

- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., & Chan, D. C. (2014). Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell metabolism*, 19(4), 630-641.
- Napolitano, G., Fasciolo, G., & Venditti, P. (2021). Mitochondrial management of reactive oxygen species. *Antioxidants*, 10(11), 1824
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., ... & Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology*, 8(1), e1000298.
- O'Donnell, L., Nicholls, P. K., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., & Stanton, P. G. (2011). Spermiogenesis: the process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1(1), 14-35.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., & Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7743-7746.
- Osellame, L. D., Singh, A. P., Stroud, D. A., Palmer, C. S., Stojanovski, D., Ramachandran, R., & Ryan, M. T. (2016). Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *Journal of cell science*, 129(11), 2170-2181.
- Otera, H., Miyata, N., Kuge, O., & Mihara, K. (2016). Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling. *Journal of Cell Biology*, 212(5), 531-544.
- Palmer, C. S., Osellame, L. D., Laine, D., Koutsopoulos, O. S., Frazier, A. E., & Ryan, M. T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO reports*, 12(6), 565-573.
- Pickles, S., Vigie, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Current Biology*, 28(4), R170-R185.
- Piechka, A., Sparanese, S., Witherspoon, L., Hach, F., & Flannigan, R. (2024). Molecular mechanisms of cellular dysfunction in testes from men with non-obstructive azoospermia. *Nature Reviews Urology*, 21(2), 67-90.
- Pyakurel, A., Savoia, C., Hess, D., & Scorrano, L. (2015). Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis. *Molecular cell*, 58(2), 244-254.
- Ren, L., Chen, X., Chen, X., Li, J., Cheng, B., & Xia, J. (2020). Mitochondrial dynamics: fission and fusion in fate determination of mesenchymal stem cells. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 580070.
- Rojansky, R., Cha, M. Y., & Chan, D. C. (2016). Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *elife*, 5, e17896.

- ROSS, M. H. & PAWLINA, W. 2006. *Histology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Serasinghe, M. N., & Chipuk, J. E. (2017). Mitochondrial fission in human diseases. *Pharmacology of Mitochondria*, 159-188.
- Rotimi, D. E., Iyobhebhe, M., Oluwayemi, E. T., Evbuomwan, I. O., Asaleye, R. M., Ojo, O. A., & Adeyemi, O. S. (2024). Mitophagy and spermatogenesis: role and mechanisms. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 38, 101698.
- Shalet, S. M. (2009). Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatric blood & cancer*, 53(2), 285-288.
- Sharpe, R. M. (2012). Sperm counts and fertility in men: a rocky road ahead: Science & Society Series on Sex and Science. *EMBO reports*, 13(5), 398-403.
- Shen, Q., Yamano, K., Head, B. P., Kawajiri, S., Cheung, J. T., Wang, C., ... & van der Bliek, A. M. (2014). Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria. *Molecular biology of the cell*, 25(1), 145-159.
- Singh, D., Paduch, D. A., Schlegel, P. N., Orwig, K. E., Mielnik, A., Bolyakov, A., & Wright, W. W. (2017). The production of glial cell line-derived neurotrophic factor by human sertoli cells is substantially reduced in sertoli cell-only testes. *Human Reproduction*, 32(5), 1108-1117.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G., & Chan, D. C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Molecular biology of the cell*, 20(15), 3525-3532.
- Tahmasbpour, E., Balasubramanian, D., & Agarwal, A. (2014). A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31, 1115-1137.
- Tang, D., Huang, Z., He, X., Wu, H., Peng, D., Zhang, L., & Zhang, X. (2018). Altered miRNA profile in testis of post-cryptorchidopexy patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16, 1-11.
- Thumfart, K. M., & Mansuy, I. M. (2023). What are Sertoli cells? Historical, methodological, and functional aspects. *Andrology*, 11(5), 849-859.
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*, 62(3), 341-360.
- Turcotte, L. P. (2003). Mitochondria: biogenesis, structure, and function--symposium introduction. *Medicine and science in sports and exercise*, 35(1), 82-85.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., ... & Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal*, 27(2), 433-446.

- Tzagoloff, A., & Tzagoloff, A. (1982). Mitochondrial structure and compartmentalization. *Mitochondria*, 15-38.
- Varuzhanyan, G., & Chan, D. C. (2020). Mitochondrial dynamics during spermatogenesis. *Journal of cell science*, 133(14), jcs235937.
- Varuzhanyan, G., Rojansky, R., Sweredoski, M. J., Graham, R. L., Hess, S., Ladinsky, M. S., & Chan, D. C. (2019). Mitochondrial fusion is required for spermatogonial differentiation and meiosis. *Elife*, 8, e51601.
- Vijayalakshmi, J. (2012). Genetic Studies of Male Infertility. <http://hdl.handle.net/10603/17907>
- Wagner, M. S., Wajner, S. M., & Maia, A. L. (2008). The role of thyroid hormone in testicular development and function. *The Journal of endocrinology*, 199(3), 351.
- Walker, W. H. (2009). Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids*, 74(7), 602-607.
- Wang, X., Liu, X., Qu, M., & Li, H. (2023). Sertoli cell-only syndrome: advances, challenges, and perspectives in genetics and mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(3), 67.
- Wei, L., Feng, Z., Dou, Q., Tan, L., Zhao, X., & Hao, B. (2024). Dysregulation of MTFR2, ATP5IF1 and BAK1 in Sertoli cells relates to idiopathic non-obstructive azoospermia via inhibiting mitochondrial fission and inducing mitochondrial dysfunction. *Biology of Reproduction*, 110(2), 408-418.
- Xian, H., & Liou, Y. C. (2021). Functions of outer mitochondrial membrane proteins: mediating the crosstalk between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Cell Death & Differentiation*, 28(3), 827-842.
- Yamano, K., Fogel, A. I., Wang, C., van der Bliek, A. M., & Youle, R. J. (2014). Mitochondrial Rab GAPs govern autophagosome biogenesis during mitophagy. *Elife*, 3, e01612.
- Yamashita, S. I., Jin, X., Furukawa, K., Hamasaki, M., Nezu, A., Otera, H., ... & Kanki, T. (2016). Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *Journal of Cell Biology*, 215(5), 649-665.
- You, X., Chen, Q., Yuan, D., Zhang, C., & Zhao, H. (2021). Common markers of testicular Sertoli cells. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(6), 613-626.
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1), 9-14.
- Zhang, J., Wang, Q., Wang, M., Jiang, M., Wang, Y., Sun, Y., ... & Wang, Y. (2016). GASZ and mitofusin- mediated mitochondrial functions are crucial for spermatogenesis. *EMBO reports*, 17(2), 220-234.

- Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Wang, X., Qu, M., Uhlén, P., ... & Nistér, M. (2011). Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *The EMBO journal*, 30(14), 2762-2778.
- Zhao, L., Yao, C., Xing, X., Jing, T., Li, P., Zhu, Z., ... & Li, Z. (2020). Single-cell analysis of developing and azoospermia human testicles reveals central role of Sertoli cells. *Nature communications*, 11(1), 5683
- Zerihun, M., Sukumaran, S., & Qvit, N. (2023). The Drp1-mediated mitochondrial fission protein interactome as an emerging core player in mitochondrial dynamics and cardiovascular disease therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5785.
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., ... & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, 50-59.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU				
ETİK KURULUN ADI	ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU			
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA			
TELEFON				
FAKS				
E-POSTA				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	NONOBRÜKTİF AZOOSPERMİ OLGULARININ SERTOLİ HÜCRELERİNDE MITOKONDRIYAL DİNAMİĞİN İNCELENMESİ		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Oya Sena AYDOS		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:İ7-505-21	Tarih: 12 Ağustos 2021		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			
İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU				
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu			
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Nuray YAZIHAN			
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişkisi	İmza
Prof.Dr.Nuray YAZIHAN	Fizyopatoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Serenay ELGÜN ÜLKAR	Tıbbi Biyokimya	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hakan ERGÜN	Tıbbi Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hatice ILGIN RUHI	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevim AYDIN	Histoloji ve Embriyoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Berna SAVAŞ	Tıbbi Patoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Yasemin YAVUZ	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Deniz BALCI	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.M.Kürşat GÖKCAN	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Yüksel ÖRÜN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Cihangir AKYOL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Başak Ceyda MEÇO	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Halil ÖZDEMİR	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Emel OKULU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mustafa Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	

Ek-2. Onam Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: NONOBRÜKTİF AZOOSPERMİ OLGULARININ SERTOLİ HÜCRELERİNDE MİTOKONDRİYAL DİNAMİĞİN İNCELENMESİ.

Sorumlu Araştırmacı: Doç.Dr. O.Sena AYDOS

Araştırmanın yürütüleceği yer: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. Sıhhiye-ANKARA

Sayın gönüllü,

Bu form katılmanız önerilen araştırmaya ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmış olup; araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmanın Amacı: Erkek üreme sisteminde olan tıkanıklık veya herhangi bir hormonal bozukluk kısırlığa, infertiliteye neden olabilmektedir. Bu infertil hastaların tedavisi için üremeye yardımcı teknikler geliştirilmiştir. Bu yöntemle hastalardan cerrahi işlemle (mikroTESE) testis dokusundan küçük bir parça alınmaktadır. Daha sonra alınan testis dokusundan olgun sperm aranmakta ve olgun sperm bulunursa bunlar alınarak yumurtaya enjekte edilmektedir. Tedaviye ve infertilitenin nedenini araştırmaya katkı sağlamak amacıyla yapılacak bu çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalına müracaat eden sizinle birlikte 20-40 yaş aralığında; en az bir yıl süreyle çocuk sahibi olmak istemelerine ve korunmasız, düzenli cinsel ilişkileri olmasına rağmen eşi gebe kalamamış, menisinde sperm hücresi bulunmayan, üreme kanallarında tıkanıklık olan ve olmayan hastalar çalışmaya dahil edilecek olup, bu hastaların infertilite tetkiki ve tedavisi için mikrocerrahi yöntemle alınan TESE dokularından arta kalan, atılacak olan kısmı çalışılacaktır.

Eğer katılmayı kabul ederseniz, rutin tedavi ve tetkik için alınmış olan ve rutin tedavi ve tetkik için kullanılan kısımdan arta kalan ve artık doku olduğu için atılacak olan testis dokusu örnekleri kullanılacak olup sizden ilave doku örneği alınmayacaktır. Size herhangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir. Ayrıca tedavi görüyorsanız tedavinizde değişiklik yapılmayacaktır. Çalışmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katıldıktan sonra da istediğiniz zaman herhangi bir neden göstermeksizin çalışmadan çıkabilirsiniz, ayrıca teknik nedenlerden dolayı araştırmacı tarafından da

çalışmadan çıkarılabilirsiniz. Bu çalışma size ve bağlı olduğumuz Sosyal Güvenlik Kurumunuza herhangi mali bir yük getirmeyecektir (yapılacak tüm tetkiklerin bedeli projeyi destekleyen kurum ve/veya araştırmacılar tarafından karşılanacaktır)

Araştırma için alınacak olan numuneler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Genetik Laboratuvarında incelenecektir.

Çalışma süresince herhangi soru veya sorunuz olduğunda çalışmada araştırmacı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi, Prof. Dr. Kaan AYDOS'a ulaşabilirsiniz. Bu yazının imzalı bir kopyası da size verilecektir.

Sizden elde edilecek örneklerin başka bilimsel araştırmalarda kullanılması konusu ile ilgili olarak aşağıdaki bölümü işaretlemeyi lütfen unutmayınız

ONAM FORMU

Ben yukarıdaki açıklamaları okudum. Okuduğum bilgiler bana sözlü olarak da iletildi. Bu çalışmaya gönüllü olarak katılmak istiyorum.

Bu bilgiler ışığında elde edilen örneğimin;

☐ Kimliğim gizli tutularak, sadece bu çalışmada kullanılmasına izin veriyorum

☐ Kimliğim gizli tutularak bilimsel amaçlı diğer çalışmalarda da kullanılmasına izin veriyorum.

Hasta Adı- Soyadı

İmza

Tarih

Araştırmacı Dr. Adı Soyadı

İmza

Tarih