T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERMATOGENEZ SÜRECİNDE KROMATİN YENİDEN MODELLENMESİNDE İŞ GÖREN PROTAMİN 1 ve 2 GEN İFADELERİNİN ERKEK İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül ŞAVLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

PROF.DR. Hilal ARIKOĞLU

.

KONYA-2023

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERMATOGENEZ SÜRECİNDE KROMATİN YENİDEN MODELLENMESİNDE İŞ GÖREN PROTAMİN 1 ve 2 GEN İFADELERİNİN ERKEK İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül ŞAVLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
PROF.DR. Hilal ARIKOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21202141 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2023

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim süresi boyunca üstün bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren çalışma disiplini ve iş ahlakını her zaman kendime örnek alacağım, ufkumu genişleten, desteğini her zaman hissettiğim, değerli Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bölüm başkanı ve aynı zamanda akademik danışmanım Prof.Dr. Hilal ARIKOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitim süresi boyunca çok değerli bilgi ve birikimlerinden yararlandığım hiçbir zaman beni geri çevirmeyen, sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

Çalışkanlığını her zaman örnek alacağım deneyler sürecinde yaşadığım her sorunda yanımda olan, yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen Arş. Gör. Fatma GÖKTÜRK'e,

Tez süresince tecrübelerini paylaşması ve desteklerinden dolayı Fatma BATIRBEK'e,

Örnek toplama sürecinde desteklerini esirgemeyen ve bilimsel olarak da beni aydınlatan Selçuk Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi Embriyoloji Laboratuvarı sorumlusu Dr. Öğr. Üyesi Duygu DURSUNOĞLU'na ve Selçuk Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarında görevli başta Rukiye ERDOĞAN olmak üzere, Kasım ÇİLEK ve Mehmet FİLİZ'e,

Tezimde yardımcı olan varlığını her daim hissettiğim sorularıma her zaman bir çözüm önerisi olan, her koşulda desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Ali KURU, Çağla DEMİREL, Burcu KAMAN, Sedef Naz TUĞ ve Emine KAYIHAN'a,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de beni sonsuz inanç ve sevgiyle hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen kıymetli annem Asiye Şavlı, babam Murat Şavlı, kardeşim Fatih Şavlı ve tüm geniş aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül Şavlı

Haziran/ 2023

İÇİNDEKİLER

SİMGELERVE KISALTMALAR ..... **v**

ÖZET ..... **vi**

SUMMARY ..... **vii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Spermatogenez 3

1.1.1. Spermatogenez Evreleri 4

1.1.2. Spermatogenezde Germ ve Sertoli Hücrelerinin Rolü 14

1.1.3. Spermatogenez Sürecinde Hormonal Kontrol ve Düzenlenmesi 18

1.2. Spermiogenez Sürecinde Kromatin Yeniden Düzenlenme ……. 20

1.2.1. Kromatin Organizasyonu ve Epigenetik Düzenlemeler 21

1.2.2. Sperm Kromatin Yeniden Modellenmesi 26

1.2.3. Kromatin Yeniden Modellenmesinin Moleküler Düzenlenmesi 30

1.3. Protaminler 36

1.3.1. *Protamin 1* ve *2* Genleri 37

1.3.2. Protamin 1 ve 2 Proteinleri 37

1.4. Erkek İnfertilitesi 38

1.4.1. Erkek İnfertilitesi Nedenleri 39

1.4.2. Açıklanamayan İnfertilite 43

2. GEREÇ VE YÖNTEM **44**

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar 44

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 44

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Saf Malzemeler 44

2.2. Hasta Seçimi ve Örneklerin Alınması 45

2.2.1. Hasta Seçimi 45

2.2.2. Örneklerin Alınması ve Semen Analizi 45

2.2.3. Gen İfade Analizi 47

2.2.4. İstatistiksel Analiz 50

3.BULGULAR 51

3.1. Hastaların Demografik Özellikleri 51

3.2. Gen İfade Analizi 52

3.3. *PRM1* ve *PRM2* Gen İfadelerinin Normalizasyon Sonuçları 53

3.4. *PRM1/PRM2* Gen İfadelerinin Normalizasyon Sonuçları 55

3.5. *PRM1* ve *PRM2* Gen İfadesinin ve *PRM1/PRM2* oranlarının Spermiyogram Parametreleriyle İlişkisi 55

3.6. *PRM1* ve *PRM2* Gen İfadesinin ve *PRM1/PRM2* oranlarının İnfertilite ile İlişkisi 56

4.TARTIŞMA 59

5.SONUÇ VE ÖNERİLER 64

6.KAYNAKLAR 65

7.EKLER 78

EK-A Etik Kurul Kararı 79

8.TURNİTİN RAPORU 81

9.ÖZGEÇMİŞ 85

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH :Antimüllerian hormon

AZF :Azospermi faktör bölgesi

CFTR :Kistik fibrozis transmembran regülatör

CF :Kistik fibrozis

DNMT :DNA metiltransferaz

FSH :Folikül uyarıcı hormon

GnRH :Gonadotropin Salıcı Hormon

HAT :Histon asetiltransferaz

HDAC :Histon deasetilazlar

IHH :İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm

KTB :Kan testis bariyeri

LH :Lüteinleştirici hormon

P1 :Protamin 1 proteini

P2 :Protamin 2 proteini

qPCR :Kantitatif gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PRM1 :*Protamin 1* geni

PRM2 :*Protamin 2* geni

SKH :Spermatogonyal kök hücrelerden

TP1 :Geçiş proteini 1

TP2 :Geçiş proteini 2

WHO :Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIKBİLİMLERİENSTİTÜSÜ

SPERMATOGENEZ SÜRECİNDE KROMATİN YENİDEN MODELLENMESİNDE İŞ GÖREN PROTAMİN 1 ve 2 GEN İFADELERİNİN ERKEK İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül Şavlı

Tıbbi Biyoloji AnabilimDalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2023

Günümüzde infertilite önemli bir problem olup yapılan çalışmalar çiftlerin %15'inde infertilite sorunu olduğu göstermektedir. İnfertil bireylerin %30'unda infertiliteye sebep olan erkek faktörü olduğu bilinmektedir. Erkek sperm hücrelerinin fertilizasyonu gerçekleştirebilmek için özgün morfoloji ve işleve sahip olması gerektiği; spermlerin sayı, hareketlilik, canlılık, yapısal ve fonksiyonel özelliklerindeki anormalliklerin ise infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. Epigenetik modifikasyonlar spermin nükleer yeniden modellenmesinde görev almaktadır. DNA metilasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi ve histon modifikasyonları bu epigenetik düzenlenmelerin parçasıdır. Spermlerin olgunlaşma sürecinde, protaminlerin histonlar ile yer değiştirmesi kritik basamak olarak bilinmektedir. İnsan spermleri Protamin 1 ve 2 olmak üzere 2 çeşit protamin içermektedir ve spermatozoodaki protamin mRNA oranının, spermatogenez kalitesinin olası prognostik göstergelerinden biri olabileceği düşünülmektedir. *Protamin 1* ve *2* gen ifade oranlarında sapmaların olması, histon/protamin değişimindeki oranın yüksek olması gibi durumlar kromatin yeniden modellenme sürecinin başarılı bir şekilde gerçekleşememesine dolayısıyla sperm morfolojisi ve fertilizasyon yeteneğinin etkilenmesine yol açabilmektedir.

Çalışmamızda erkek infertilitesinde *Protamin 1* ve *2* (*PRM1* ve *PRM2*) gen ifade düzeylerinin araştırılması ve *Protamin 1/2* oranının erkek infertilitesi ile ilişkilerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, Selçuk Üniversitesi Hastanesi, Androloji Laboratuvarına başvuran, spermiyogram analizleri sonucunda, 56 normozoospermi, 26 oligozoospermi ve 20 şiddetli oligozoospermi olduğu belirlenen bireyler çalışmaya alındı. Bireyler, fertilite durumlarına göre fertil, erkek infertilitesi ve açıklanamayan infertilite olarak gruplandırıldı Bireylerin ejakulat örneklerinin plazmaları ayrılarak sperm hücreleri elde edildi. Sperm hücrelerinden RNA izolasyonu ve cDNA eldesi sonrasında qPCR yöntemi ile hedef genler olan *Protamin 1* ve *2* genlerinin ifade düzeyleri analiz edildi. Çalışma bulgularımıza göre, *PRM2* gen ifadesinin ve *PRM1/PRM2* oranlarının erkek infertilitesi ve sebebi açıklanamayan infertilite durumlarıyla istatistiki olarak anlamlı ilişkisi belirlendi.

Güncel çalışmalarda *protamin* ifadesinin öngörülen normal aralığının değişken şekillerde bildirilmesi, popülasyonlara özgü genetik farklılıkların etkileri ve erkek fertilitesinde etken olası diğer faktörlerin varlığı çalışma sonuçlarımızın değerlendirilmesinde dikkate alınmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Protamin 1, Protamin 2,* Spermatogenez, Kromatin yeniden modellenmesi, Erkek infertilitesi

SUMMARY

T.C.

SELÇUK UNİVERSİTY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

INVESTIGATION OF THE ROLE OF *PROTAMIN 1* AND *2* GENE EXPRESSIONS WORKING IN THE CHROMATIN REMODELING IN THE SPERMATOGENESIS PROCESS IN MALE INFERTILITY

Ayşegül ŞAVLI

Department of Medical Biology

MASTER THESIS/KONYA 2023

Nowadays, infertilityis an important problem and it is known that male-induced infertility is 35%. Male sperm cells must have unique morphology and function in order to perform fertilization; It is known that anomalies in the number, motility, vitality, structural and functional properties of sperm cause infertility. Epigenetic modifications are involved in nuclear remodeling of sperm. DNA methylation, chromatin rearrangement, and histone modifications are part of these epigenetic rearrangements. The replacement of protamines with histones is known as a critical step in the maturation process of sperm. Human sperm contain 2 types of *protamines*, *Protamine 1* and *2*, and it is thought that the ratio of protamine mRNA in the spermatozoa may be one of the possible prognostic indicators of spermatogenesis quality. Situations such as deviations in *protamine 1* and *2* gene expression rates, and high rate of histone/protamine exchange may cause the chromatinremodeling process to not be successful, thus affecting sperm morphology and fertilization ability.

In our study, it was aimed to reveal the detection rates of *Protamine 1* and 2 (*PRM1* and *PRM2*) gene expression density in male infertility and the link between *Protamine 1/2* and male infertility. In this context, individuals who applied to Selcuk University Hospital Andrology Laboratory and were found to have 56 normozoospermia, 26 oligozoospermia and 20 severe oligozoospermia as a result of spermiogram analysis were included in the study. Individuals were grouped according to their fertility status as fertile, male infertility and unexplained infertility. Sperm cells were obtained by separating plasma from ejaculate samples of individuals. After RNA isolation and cDNA extraction from sperm cells, expression levels of target genes *protamine 1* and *2* were analyzed by qPCR method. According to our study findings, *PRM2* gene expression and *PRM1/PRM2* ratios were found to be statistically significant in both male infertility and unexplained infertility cases.

Variable reporting of the predicted normal range of protamine proteins in current studies, the effects of population-specific genetic differences, and the existence of other possible factors affecting male fertility should be considered in the evaluation of our study results.

Key Words: *Protamine 1, Protamine 2,* Spermatogenesis, Chromatin remodeling, Male infertility

1.GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin korunmasız iki yıl düzenli cinsel ilişki gerçekleştirmelerine rağmen gebeliğin oluşmama durumudur. Çiftlerin %15'inde infertilite sorunu olduğu gözlenmiştir. İnfertil bireylerin %30'unda infertiliteye sebep olarak erkek faktörü saptanmıştır (Organization 2021). Türkiye'deki infertilite durumuna genele oranla bakılacak olursa tüm çiftlerin yaklaşık %10'unda Dünya genelinde ise yaklaşık %13 ila %15 arasında olduğu görülmektedir (Küçükdurmaz ve ark 2015).

Spermatogenez sürecinde, sperme özgü ve olağan dışı bir kromatin organizasyonu gerçekleşir. Somatik hücrelerde kromatin 6 µm çapındaki nükleusda organize iken, sperm kromatininin 5.1 µm çapındaki sperm nükleusuna sığması için diğer dokularda görülmeyen özel düzenlemeler gerçekleşir. Sperme özgü kromatin yeniden şekillenme sürecindeki kilit oyuncular, histonlarla yer değiştiren küçük, bazik proteinler olan protaminlerdir. Süreç sonunda sperm DNA'sının %10-15'lik kısmı hariç sperm genomu protaminlerle çok sıkı bir şekilde paketlenir. Sperm DNA'sının bu ileri düzey yoğunlaşması ile küçük bir kısmı hariç genomu erişilemez duruma gelir. Toroidler şeklinde düzenlenen bu yoğun ve çözünmez yapı, erkek ve dişi üreme yolunda taşınırken paternal genomunun genetik bütünlüğünü korur. Üstelik sperm kromatininin bu ileri organizasyonu, spermin olgunlaşırken yuvarlak baş kısmının uzaması ve basıklaşmasına uygun olarak çekirdeğinin de uzayıp basıklaşmasının sağlayarak spermin fertilizasyon ve motilite yeteneğini kazanmasında da temel rol oynar.

Protamin 1 (*PRM1*) ve *Protamin 2* (*PRM2*) genleri tarafından kodlanan sırasıyla protamin 1 (P1) ve protamin 2 (P2), sperm hücrelerinde ifade edilen iki ana protamindir. Ortaya çıkan kanıtlar, protamin genlerinin dinamik ifadesinin spermatogenez sırasında ve nükleer yeniden şekillenme sürecindeki düzgün işleyişlerinin erkek infertilitesinde çok önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Oliva 2006).

Olgun sperm hücrelerindeki bazı histonların varyantları ile yer değiştirilmesi sonucu asetilasyon düzeyi artar ve histonların hiperasetilasyonu kromatin yapının gevşemesine yol açar. Gevşeyen kromatin yapıda topoizomerazlar tarafından zincir kırıkları meydana gelir. Böylece geçiş proteinleri, kromatin yapıdan histonların

ayrılmasını sağlayarak geçici olarak kromatin yapıya katılır ve daha sonra protaminler ile yer değiştirerek kromatinin yeniden modellenmesini kolaylaştırır.

Protamin 1 ve Protamin 2, oldukça yoğun ve sıkı bir şekilde paketlenmiş küçük, pozitif yüklü proteinlerdir. Spermiogenez sırasında, protamin genlerinin, uygun nükleer yeniden şekillenme için gerektiği bilinmektedir. *Protamin 1* ve *Protamin 2* genlerinin ifadesi, epigenetik modifikasyonlar, transkripsiyon faktörleri ve transkripsiyon sonrası düzenleme dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik modifikasyonlar, gen promotor bölgelerinin transkripsiyon faktörlerine erişilebilirliğini modüle ederek *protamin* genlerinin ifadesini etkileyebilmektedir (Balhorn ve ark 1999, Carrell ve ark 2007, Oliva 2006).

Protamin 1 ve *Protamin 2* gen ifadesindeki anormallikler ve bunların nükleer yeniden şekillenmedeki işlevleri erkek infertilite ile ilişkilendirilmiştir. *PRM1* ve *PRM2* genlerindeki varyasyonlar veya silinmelerin, DNA'nın sperm çekirdeğine uygun olmayan şekilde paketlenmesine yol açarak anormal kromatin yapısına sahip sperm ve zayıflamış sperm fonksiyonu ile sonuçlanabildiği ortaya konmuştur. Örneğin, *protamin* gen ifadesindeki kusurlar, artan sperm DNA fragmantasyonu, azalan sperm hareketliliği ve sonuçta erkek infertilitesine neden olabilen bozulmuş döllenme kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir (Carrell ve ark 2007, Zquez ve ark 2008).

Genetik varyasyonlara ek olarak, çevresel ve yaşam tarzı faktörleri de spermatogenez sırasında *protamin* gen ifadesini ve nükleer yeniden şekillenmeyi etkileyebilmektedir. Radyasyon, kimyasallar ve ısı gibi çevresel toksinlere maruz kalma, *protamin* genlerinin normal ifadesini bozabilmekteve sperm kalitesini etkileyebilmektedir. Benzer şekilde, kötü beslenme, sigara ve aşırı alkol tüketimi gibi yaşam tarzı faktörlerinin *protamin* gen ifadesini ve sperm kalitesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Krausz ve Riera-Escamilla 2018).

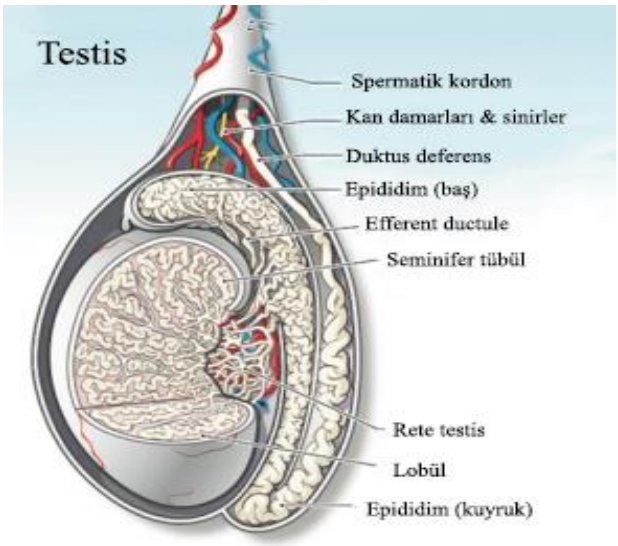
Açıklanamayan infertilite, infertil çiftler arasında en sık rastlanan tanılardan biridir. Bu durumda altta yatan pek çok olası neden ileri sürülmüş olmasına rağmen, açıklanamayan infertilite, temel tetkiklerde herhangi bir anormallik tespit edilememesi durumunu ifade eder (Medicine 2008).

Yapılan çalışmalarda *protamin ½* oranının 1 civarında olduğu bu oranda saptamaların erkek infertilittesi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda Türk toplumunda erkek infertilitesinde *Protamin 1* ve *2* gen ifade düzeylerinin araştırılması ve *protamin* gen ifadelerinin oranının erkek infertilitesi ve ilgili fenotiplerle ile ilişkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

1.1. Spermatogenez

Spermatogenez, puberte döneminde başlayan ve Spermatogonyal kök hücrelerden (SKH) sperm oluşumunu içeren bir süreçtir. Bu süreç, testiste seminifer tübüllerde gerçekleşir(Pawlina ve Ross 2018, Ross ve Pawlina 2014, Shetty ve ark 2004).

Erkek gamet üretiminden, depolanmasından ve testosteron salınımından sorumlu olan organlar testislerdir (Şekil 1.1). Testisler skrotum içine inerken, bir miktar periton dokusunu da kendileriyle birlikte skrotumun içine taşırlar. Bağ dokusu yapısındaki septalar testis dokusunu bölümlere ayırır. Her bir testis için yaklaşık 250 testiküler lobüller bulunur. Lobüller, vaskülerize gevşek bağ dokusu, lenf damarları ve sinir hücreleri ile sarılmıştır. Ayrıca lobüller 1 ile 4 adet seminifer tübüllerini bulundururlar. İnterstisyel hücreler adı verilen Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki bağ dokusu içinde bulunur. Seminifer tübüller spermatozoonları üretirler.İnterstisyel hücrelerin görevi ise testis androjenlerini salgılamaktadır (Chen ve ark 2021).



Şekil 1.1. Testisin anatomik yapısı (Sharma ve Agarwal 2011).

Merkezi bir boşlukla çevrili olan özelleşmiş seminifer epitel, somatik Sertoli hücreleri ve sperm üretiminde görevli spermatogenik hücreler gibi iki ayrı hücre popülasyonu içerir. Seminifer epitel bir duvarla birlikte bazal membranla kaplıdır. Bu duvar fibroblastlar, kollajen lifler ve kasılabilir myoid hücrelerden oluşur. Myoid hücrelerinin görevi ritmik kasılmalar oluşturmaktır. Bu kasılmalar sonucunda hareketsiz sperm hücreleri testislere yönlendirilir. Spermatozoalar önce epididimalden geçer ve daha sonra ileri motilite özelliklerini kazanırlar (Aşcı ve ark 2013, Gartner ve Hiatt 2007b).

Boşaltım tübüllerindeki bağ dokusu, lenf damarları, sinirler ve pencereli kapillerler ile doludur. Bu bölgede, bağ dokusu hücrelerinin yanı sıra, erken ergenlik döneminden sonra başka bir hücre daha önem kazanır. Bu hücre, çok kenarlı ve merkezi nükleuslu yuvarlak bir şekle sahiptir. Küçük, lipid damlacıkları içeren eozinofilik sitoplazması ile tanınan bu hücre Leydig hücresi olarak adlandırılır. Testosteron hormonu salgılayan Leydig hücreleri, embriyonal olayların düzenlenmesini, spermatogenezi ve gonadotropin salgısını kontrol eder (Aşcı ve ark 2013, Krutzsch 2000).

SKH'ler farklılaşmaya başladıkça, seri asimetrik bölünmeler geçirerek seminifer tübül epitelinin bazalinden apikaline doğru ilerlerler. Spermatogenez süresi insanlarda 64-74 gün olup, spermlerin matürasyon süreci yani olgunlaşma periyodu ise 14 günlük bir süreci içerir (Pawlina ve Ross 2018, Ross ve Pawlina 2014, Shetty ve ark 2004).

1.1.1. Spermatogenez Evreleri

Spermatogenez; spermatogonyal faz, spermatosit fazı, spermatid fazı olmak üzere üç fazdan oluşmaktadır (Şekil 1.2) (Ross ve Pawlina 2014, Shetty ve ark 2004).

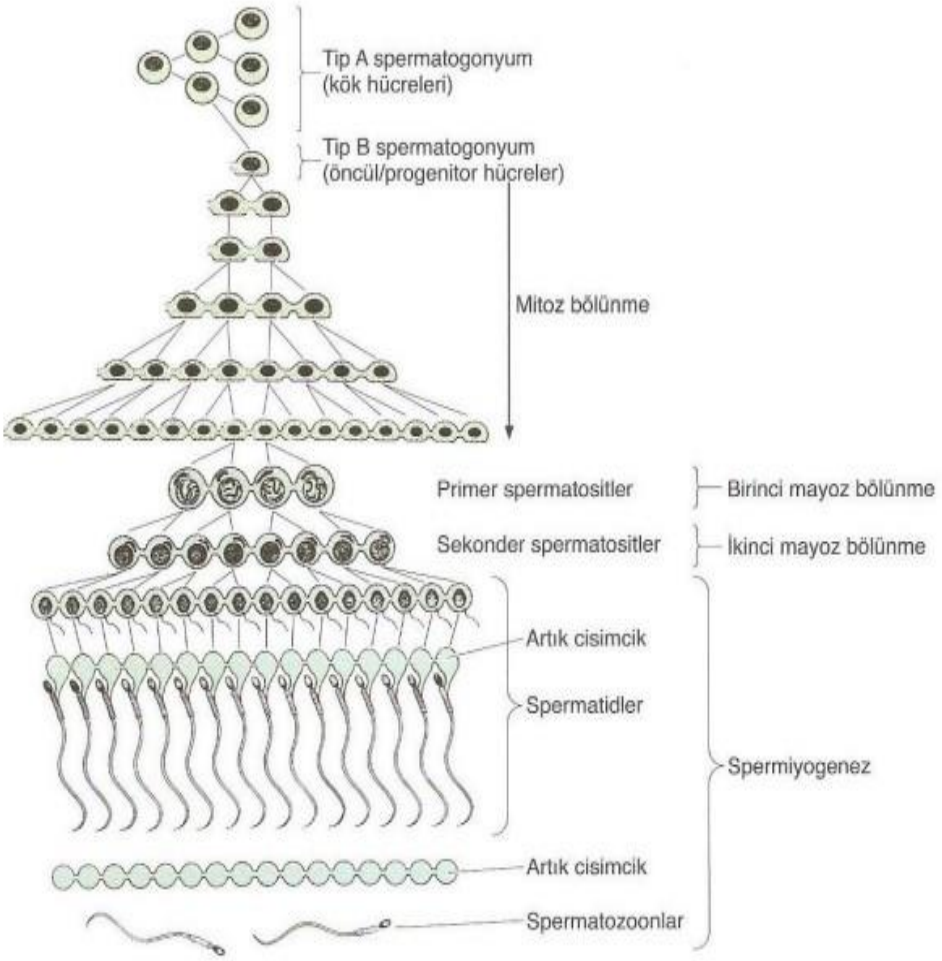
Spermatogonyal Faz (Mitoz Bölünmeler)

Spermatogenez sürecinde, SKH)'ler mitoz bölünmeler geçirerek yeni hücre popülasyonunu oluştururlar. Bu kök hücreler, postnatal testiste bulunan gonositlerden türemiştir ve spermatogenezin sürekliliğini sağlarlar. Spermatogonyal hücreleri, nükleus görünümüne göre açık tip A spermatogonyum, tip B spermatogonyum ve koyu tip A spermatogonyum olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Koyu

tip A spermatogonyumlar, farklılaşmadan kök hücre olarak kalırken, açık tip A spermatogonyumlar farklılaşarak olgunlaşır veya tip B spermatogonyumları oluşturmak için ardışık mitoz ve asimetrik bölünmeler geçirirler. Tip B spermatogonyumlar ise yoğun kromatinli hücrelerdir ve spermatogonyal fazın son aşamasında görülürler. Açık tip A, tip B hücreleri ve koyu tip A hücreleri çekirdek yapısı ve boyama özelliklerine göre farklılık gösterir ve spermatogenezin ilerleyişinde farklı roller üstlenirler. Açık tip A hücreleri mitoz bölünmelerle artarak sperm hücresine farklılaşırken, koyu tip A hücreleri kendilerini yenileyebilme özelliği taşır. A tipi hücreler arasındaki sitoplazma köprüleri, hücreler arası iletişimi sağlar ve gelişimlerinin senkronizasyonunu sağlar. Tip B spermatogonyumlar ise yoğun kromatin ile karakterizedir ve spermatogonyal fazın son basamağında görülürler (Erdoğan ve Kuruş 2022, Kuşçu ve Çelik-özenci 2013, Ross ve Pawlina 2014).

Spermatosit Faz (Mayoz Bölünmeler)

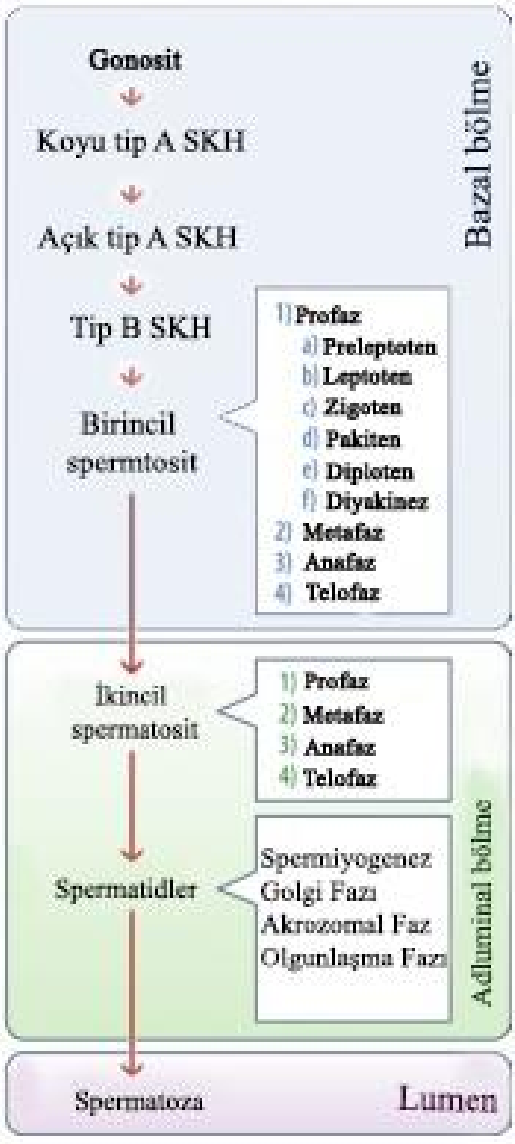
Spermatosit fazı, spermatogenezin önemli bir aşamasıdır ve mayoz bölünmenin gerçekleştiği bir süreçtir. Spermatosit fazı genellikle kan-testis bariyerinin iç kısmında, luminal bölümde gerçekleşir. Bu faz, Tip B spermatogonyumlarının bölünerek primer spermatositleri oluşturmasıyla başlar. Primer spermatositler mayoz bölünmeye uğrar. Bu bölünme, kromozom sayısını yarıya indirerek haploid hücreler olan sekonder spermatositleri oluşturur (Griswold 2016, Mescher 2018, Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 1.2. Spermatogenez evreleri (Junqueira ve Carneiro 2009).

Spermatogenez, mayoz bölünme sürecini içeren bir dizi aşamayla karakterize edilir. Bu süreç, tip B spermatogoninin bazal membranla temasını kaybetmesiyle başlar ve preleptoten primer spermatositlerin oluşumunu içerir. Profazın leptoten aşamasında kromozomlar, uzun filamentler şeklinde düzenlenir (Şekil 1.3). Zigoten aşamasında, homolog kromozomlar sinaptonemal kompleksler aracılığıyla birbirine doğrusal olarak düzenlenir ve sinapsları oluştururlar. Bu aşamada, krossing-over gerçekleşir ve pakiten aşamasında kromozomlar kısalmaya devam eder. Diyakinaz aşamasında homolog kromozomlar daha da yoğunlaşırlar ve krossing-over'in gerçekleştiği kiazma noktalarından birbirine bağlı kalırlar. Profazın sonunda nükleer zarf bozulur ve metafazda homolog kromozomlar ekvator plakasında düzenlenirler. Anafazda, homolog kromozomlar arasındaki kiazmaların çözülmesiyle, iki

kromatidden oluşan her bir kromozom zıt kutuplara göç eder. Telofazda sitoplazmik bölünmeler tamamlanır ve bu, kromozom sayısının yarısına sahip sekonder spermatositlerin oluşumuna yol açar. Birincil spermatositler, germinal epitelin en büyük germ hücreleridir (Sharma ve Agarwal 2011).

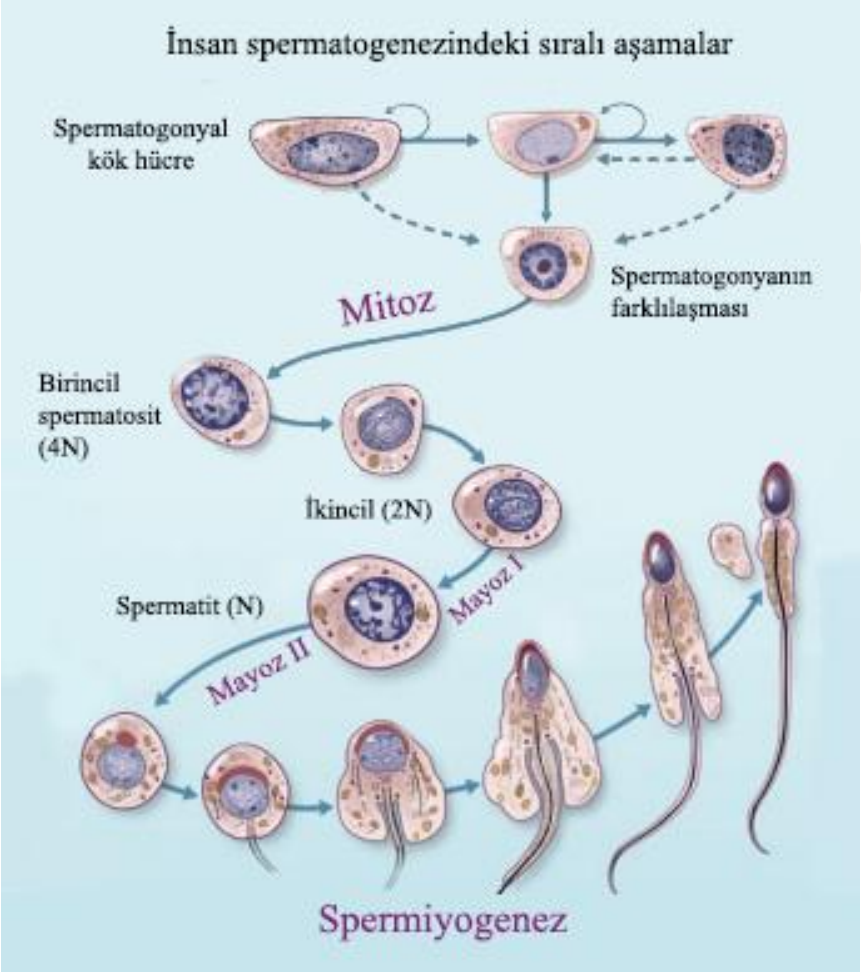


Şekil 1.3. Spermatogenez sürecindeki bir eşey hücresinin gelişiminin, bazal boyunca adluminal bölmeye kadar tamamen işlevsel bir haploid spermatozoana dönüşmesinin ve son olarak lümene salınmasının şematik gösterimi (Sharma ve Agarwal 2011).

Yaklaşık 10 ila 22 gün geçtikten sonra, ilk mayoz bölünme ile primer spermatositlerden iki tane haploid kromozoma sahip sekonder spermatositler oluşur. Sonrasında, sekonder spermatositler hızla ikinci mayoz bölünmeye girer. Mayoz

II'de, her bir sekonder spermatosit iki adet spermatid oluşturmak için bölünürler (Şekil 1.4). Bu şekilde, bir spermatositten dört adet haploid kromozoma sahip spermatid oluşur (Griswold 2016).

İkinci mayotik bölünmenin profaz aşaması oldukça kısadır. Anafaz aşamasında mitoz bölünmede olduğu gibi her kromozomun iki kromatidi ayrılarak zıt kutuplara hareket eder, böylece DNA içeriği yarıya iner. Telofazın sonunda, spermatidler tamamen ayrılmazlar, ancak senkronize bir gelişim için ince köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Bu spermatidler, (22, X) veya (22, Y) kromozomlu haploid hücrelerdir. Sekonder spermatositler, primer spermatositlere kıyasla tam farklılaşma ve morfogenez sürecinden geçerler, bu sürece spermiogenez denir (Ross ve Pawlina 2014, Sharma ve Agarwal 2011).



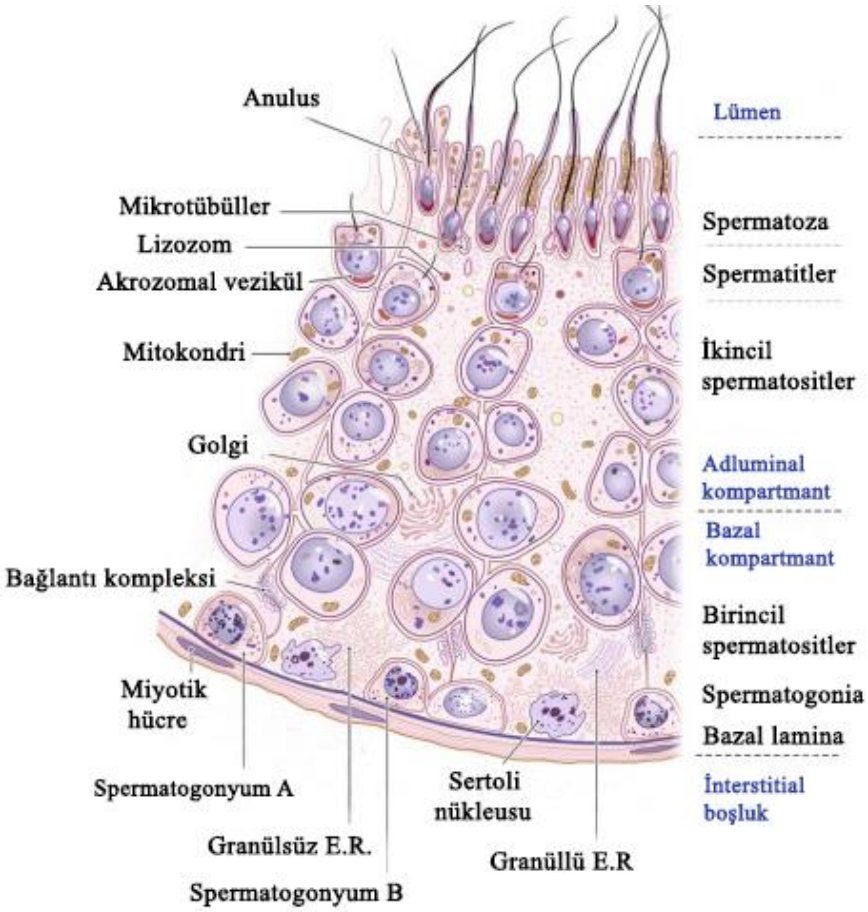
Şekil 1.4. İnsan germ hücresinin olgunlaşmış bir spermatozoaya dönüşmesi (Sharma ve Agarwal 2011).

Spermatid Fazı (Spermiogenez)

Spermiogenez, germ hücrelerinin olgunlaşma süreci olarak tanımlanır. Bu süreçte, yuvarlak spermatidler olgun spermatozoaya dönüşmek için diferansiyasyona uğrar. Bu aşamada spermatidlerin sitoplazması ve nükleusu önemli morfolojik, hücresel ve moleküler değişikliklere uğrar (Şekil 1.5) (Junqueira 2005).

Spermiogenez sürecinde bir dizi karmaşık değişiklik meydana gelir. Bu değişiklikler arasında akrozom oluşması, nükleusun yoğunlaşark uzaması, flagellumun gelişmesi ve sitoplazmanın önemli ölçüde bir kısmının kaybolması yeralır. Ayrıca, sitoplazma içinde bulunan organellerin yeniden organizasyonu ve kromatin yeniden modellenme süreci gerçekleşir (Cheng ve Mruk 2012).

Spermiyasyon ise spermatidlerin olgunlaşma sürecinde gerçekleşen bir dizi yapısal değişikliği içeren karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte, farklı yapılar ve adezyon kompleksleri birlikte çalışarak normal bir şekilde olgunlaşmış spermin lümene dökülmesini sağlar. Adezyon bağlantıları, spermatidin çözünme sırasında sıkı bir şekilde tutunmasını sağlar. Bu durumda, Sertoli hücreleri spermatidin baş kısmınatutunarak spermatidin sitoplazmasının seminifer tübül lümenine doğru uzamasını sağlar. Spermiyasyon ilerledikçe adezyon bağlantılarının bileşimi değişir. Bazı adezyonla ilişkili proteinler sadece spermiyasyon başlangıcında yüksek miktarda ifade edilirken, diğerleri spermatid-Sertoli hücre arayüzündespermiogenezin uzama aşamasında ifade edilir. Sertoli hücreleri spermatidsürecinde serbest bırakma için hazırlanırkenadezyon bağlantıları sürekli olarak değişir. Spermiyasyon, sperm olgunlaşma sürecinin son aşaması olduğundan, bu süreç sperm morfolojisinde çeşitli değişikliklere neden olur (O'Donnell ve ark 2011).



Şekil 1.5. Seminifer tübüldeki germinal epitel kesiti. Sertoli hücreleri, germinal epiteli Sertoli hücresi aracılığıyla bazal ve adluminal bölmeye ayırır. Spermatozoa lümene salınır (Sharma ve Agarwal 2011).

Spermiogenez süreci 3 aşamadan oluşur:

- Golgi fazı
- Akrozomal faz
- Olgunlaşma fazı(Gartner ve Hiatt 2007a).

Golgi Fazı

Spermatidlerin Golgi fazı, golgi komplekslerinde bulunan glikoproteinlerden zengin proakrozomal granüllerin bir araya gelerek akrozomal vezikülü oluşturmasıyla karakterize edilen bir süreçtir. Bu süreçte, akrozomal vezikül çekirdek zarı yakınında membranla çevrili bir yapıdır. Sentriyoller akrozomun karşı tarafına doğru hücre yüzeyine yakın bir konuma hareket eder. Aynı zamanda, flagellar aksonem adı verilen yapı da oluşmaya başlar. Sentriyoller göç ettikçe, aksonemal

bileşenleri etrafına sararak onları çevreler (Gartner ve Hiatt 2007a, Ross ve Pawlina 2006).

Akrozomal Faz

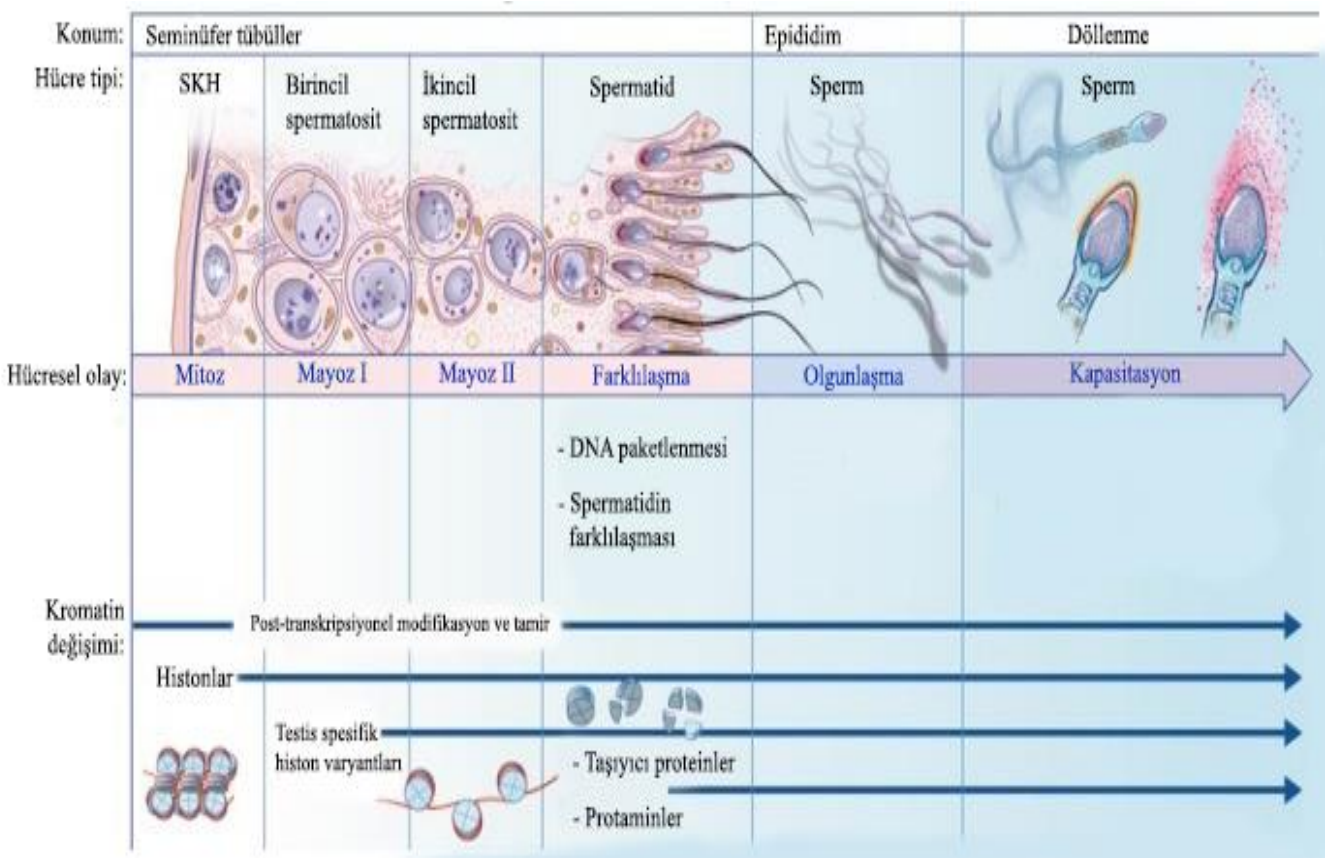
Bu aşamada spermatidler, baş kısımlarını Sertoli hücresine daha derinlemesine gömülecek şekilde yeniden yönlendirilirler ve bazal laminaya doğru hizalanırlar. Kuyruk bölgesi ise seminifer tübül lümenine uzanır. Akrozomal aşamada, akrozomal vezikül ve granüller nukleus ile membran arasındaki alanda, yoğunlaşan nukleusun ön tarafında bulunan yapıya akrozom denir. Akrozom, hyaluronidaz, nörominidaz, asit fosfataz, akrozin, proteaz, B-N-asetilglukozamidaz, aril sülfataz gibi hidrolitik enzimler içerir. Bu aşamada spermatid, seminifer tübülün tabanına doğru yönelirken aksonem de lümene doğru uzar. Nukleus da uzar ve daha yoğun bir yapı kazanır. Sentriyollerden biri gelişerek flagellumu oluştururken, mitokondriler de flagellumun üst kısmında birleşerek kalınlaşmış bir bölge olan "orta parça"yı oluştururlar (Gartner ve Hiatt 2007a, Niederberger ve ark 1997, Ross ve Pawlina 2006).

Olgunlaşma Fazı

Olgunlaşma aşamasında, fazla sitoplazma atılır ve bu atık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Bu süreçte nukleus uzar ve yoğunlaşarak son şeklini alır. Mitokondriler dağılır ve kuyruk iskeletinin yapısal düzenlemesini tamamlarlar. Spermatidler artık birbirlerine bağlı değillerdir ve "spermiasyon" adı verilen bir mekanizma ile Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine salıverilirler. Olgunlaşma ve gelişimlerini tamamlayan spermler, morfolojik olarak gelişmiş olsalar da henüz fonksiyonel olarak olgunlaşmamışlardır, çünkü aktif hareket yeteneklerini henüz kazanmamışlardır. Fonksiyonel olgunlaşmaları ise erkek üreme kanallarında gerçekleşir.

Normal sperm üretimi, testis, ön hipofizdeki gonadotropin hormonları ve hipotalamus arasındaki uygun etkileşime bağlıdır. Luteinizan hormon (LH), Leydig hücrelerinde testosteron üretimini uyarmak suretiyle spermatogenez için gereken hormonal sinyali sağlar. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ise Sertoli hücrelerinin optimal fonksiyonları için gereklidir. Sertoli hücreleri, iç tübüler ortamın stabilitesini koruyarak ve üreme hücreleriyle hormonlar aracılığıyla etkileşerek spermatogenezin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar.

Sperm hücreleri, gelişimlerini tamamladıktan sonra epididimis kanalına taşınırlar ve bu kanaldan geçerken hareket kazanır ve oositlere tutunma yeteneği elde ederler (Şekil 1.6). Bu dönüşümler sperm olgunlaşması olarak bilinir ve fertilizasyonun gerçekleşmesi için hayati öneme sahiptir. Sperm, epididimisten ayrıldığında olgun olarak kabul edilir ve son bölgede bulunur. Ejakülasyon sırasında, kas kasılmaları eşliğinde bazı sperm hücreleri epididimisten vas deferensa taşınır. Daha sonra sperm hücreleri ejakülasyon kanalına ilerler ve farklı tüplerden geçerken bir miktar sıvı içinde bulunurlar. Seminal veziküller ve prostat bezinden salgılanan sıvılar da sperm hücreleriyle karışarak semeni oluştururlar (Abdel Raheem ve ark 2013, De Kretser 1997, Ross ve Pawlina 2006).

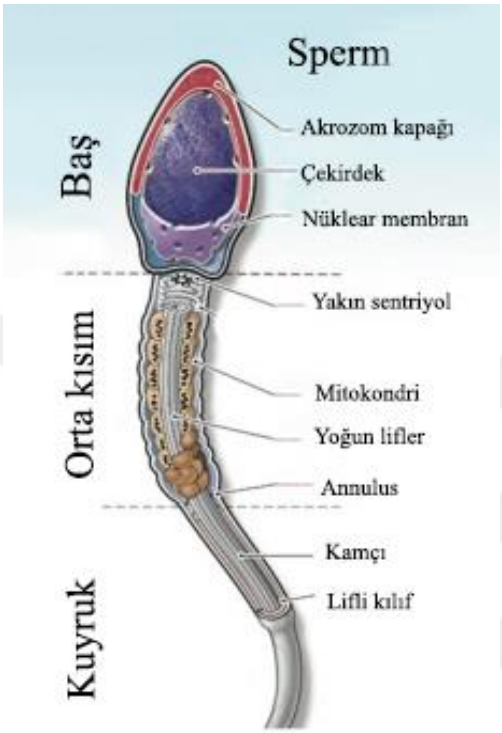


Şekil 1.6. Sperm gelişim olayları; Bir germ hücresinin önce spermatozoya dönüşmesi ve farklılaşması, ardından da dişi üreme sistemine yolculuğunun şematik gösterimi (Sharma ve Agarwal 2011).

Olgun Spermin Morfolojik Yapısı

Olgun insan sperminin boyu yaklaşık 60 µm'dir (Ross 2006). Sperm, iki bölümden oluşan baş ve kuyruğa sahiptir. Baş, bir bağlantı parçası ile kuyruğa

bağlanır (Şekil 1.7). Kuyruk kısmı orta, esas ve son parça olarak üç bölüme ayrılır. Plazma membranı, sperm baş ve kuyruk kısımlarını kaplar. Sperm başı, akrozomla çevrili çekirdekten oluşur. Çekirdek, yoğun ve yassı bir yapıya sahiptir. Akrozom, çekirdeğin anteriyor yarısını kaplar ve proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluronidaz ve nöraminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir (Aşcı ve ark 2013, Fawcett 1965).



Şekil 1.7. Olgun sperm hücresinin baş, orta kısım ve kuyruk kısımlarının şematize edilerek gösterimi (Sharma ve Agarwal 2011) .

Özel bir lizozom türü olan akrozom, korona radiyata ve zona pellusida'yı eriterek döllenme için yol açar. Bağlantı parçası, dar bir bölgedir ve sentriyoller içerir. Sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonem, distal sentriyolden kaynaklanır. Sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruğa doğru ilerleyen dokuz mikrotubül ve mitokondrilerin sarmal tabakası, kuyruğun orta bölümünü oluşturur (Fawcett 1965).

Memelilerde, sperm başının özellikleri genel olarak benzerlik gösterir, ancak bazı özel farklılıklar da mevcut olabilir. İnsanda, sperm başının uzunluğu yaklaşık olarak 4-5 µm, genişliği 3 µm ve kalınlığı ise 1 µm civarındadır. Sperm başı, yassılaşmış bir şekle sahip olan nükleusu içerir (Gartner ve Hiatt 2007b).

Merkezi kısmın alt kısmında, mitokondriyal sarmalın annulus adı verilen bölgede sona erdiği bir alan bulunur. Temel bölüm, en uzun kuyruk kısmıdır ve merkezi aksonem, yedi dış mikrotübül ve fibröz kılıf içerir. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf, spermin hareketi sırasında güçlü bir iskelet görevi görür. Son bölüm ise, dış yoğun liflerin ve fibröz kılıfın sona ermesi nedeniyle sadece aksonemi içerir ve kuyruğun son bölümüdür. Spermatozoa'nın hareketi, flagellum adı verilen yapı ile gerçekleşir (Aşcı ve ark 2013, Curry ve ark 1995).

Olgunlaşma fazında kromatin yeniden programlama süreçi gerçekleşir. Bu sperm kromatinin neredeyse tamamen değişerek yeniden düzenlenmesini içerir. Bu aşama spermin baş kısmının ovalleşmesine paralel olarak çekirdeğin de ovalleşmesini ve daha kompakt hale gelmesini sağlar. Olgunlaşma fazı sonrası gelişimini tamamlamış kuyruk yapısı oluşmuş sperm yapısını alır (Sharma ve Agarwal 2011).

1.1.2. Spermatogenezde Germ ve Sertoli Hücrelerinin Rolü

Embriyogenezin erken dönemlerinde, küçük bir popülasyon olan primordial germ hücreleri, farklı türlerdeki embriyonun farklı bölgelerinde ortaya çıkar. Daha sonra, çoğu türde germ hücreleri embriyonun dokuları boyunca göç ederek, fonksiyonel bir gonad oluşturmak için gonadların aksesuar hücreleriyle birleşirler (Wylie 2000).

Seminifer tübüllerin içinde yer alan germ hücreleri ve Sertoli hücreleri, spermatogenez sürecini yürütür. Ergenlik döneminden ölene kadar devam eden sperm üretimi için gerekli olan mikroçevreyi sağlamakla görevli olan somatik Sertoli hücreleri, testis içinde bu işlevi yerine getirirler. Testiste yer alan intersitisyel doku ise Leydig hücreleri de dahil olmak üzere, kan ve lenf damarları, makrofajlar ve büyüme faktörleri gibi birçok yapıyı barındırır. Peritübüler miyoid hücreler ise seminifer tübülleri saran bir destek sağlarlar. Ayrıca büyüme ve gelişim faktörleri kaynağıdırlar ve sperm hareketi için gerekli olan sıvının taşınmasını kolaylaştırırlar (Russell 1990).

Spermatogenez, testiste seminifer tübüller içinde yer alan germ hücrelerinin SKH havuzundan sperm üretimi için farklılaşarak geçirdiği kompleks bir süreçtir. Germ hücresinin gelişimi, üç aşamalı bir süreçtir:

I) Primordiyal germ hücreleri (PGH) fetal gelişim sırasında oluşur,

II) SKH'ler neonatal süreçte gelişir ve

III) Spermatozoa oluşumu son ürünüdür.

Gonositler ve PGH'ler spermatogonyal kök hücre gelişiminde önemli bir rol oynarlar. Gonositler, PGH'lerden türetilirler ve neonatal dönemde tip A spermatogonyumlara dönüşürler. Spermatogenik döngünün üçüncü aşaması ise SKH havuzundan farklılaşan spermatogonyumlarla başlar ve mitoz, mayoz bölünmeler ve spermiogenez ile spermatozoa oluşumunu içerir. Sertoli hücreleri de yaşam boyu sperm üretme amacıyla gerekli mikroçevreyi oluştururlar ve seminifer tübülleri çevreleyen peritübüler miyoid hücreler yapısal destek sağlarlarve sperm hareketini kolaylaştırırlar (Russell 1990).

Gonositlerin göç etmesiyle birlikte, seminifer kordonlarda lümen oluşarak seminifer tübüller meydana gelir. Spermatogonyal kök hücrelerin yenilenmesi ve farklanması için bazal membranda yer alan tip A spermatogonyumlar anahtar rol oynar. Bu süreçteki moleküler mekanizmaların anlaşılması, erkek infertilitesi ve testiküler kanser gibi faktörlerin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (De Rooij ve Grootegoed 1998, Yoshida 2010) .

Spermatogenez sürecinde, germ hücreleri spermatogoniyi oluşturur ve spermatidlerin olgunlaşması için gerekli olan bölünmeleri gerçekleştirirler. Sertoli hücreleri ise germ hücreleriyle birlikte çalışarak testislerin seminifer tübüllerinde olgunlaşmaya yönelik bir ortam sağlar. Sertoli hücreleri, germ hücrelerini destekleyen, besleyen ve onların gelişimini düzenleyen hücrelerdir. Ayrıca, Sertoli hücreleri spermiogenez aşamasında da önemli bir işlevi yerine getirirler. Bu aşamada, Sertoli hücreleri, spermatidlerin kamçılarının ve akrozomlarının oluşumuna katkıda bulunurlar ve spermatozoa için gerekli olan besinleri ve diğer faktörleri sağlarlar. Sonuç olarak, germ ve Sertoli hücreleri birlikte çalışarak spermatogenez sürecinin her aşamasını yönlendirir ve olgunlaşan spermatozoanın oluşmasını sağlarlar (Wylie 2000).

Sertoli hücreleri, germ hücreleriyle doğrudan temas ederek ve seminifer tübül ortamını kontrol ederek sperm üretim sürecinde ilerlemeyi kolaylaştırırlar. Spermatogenezin düzenlenmesi FSH ve testosteron hormonları tarafından

gerçekleştirilir ve bu hormonların Sertoli hücreleri üzerindeki etkileriyle sağlanır. Testosteronun etkisi sperm üretimi için gereklidir, ancak FSH'nin etkisi Sertoli hücrelerinin sayısını artırarak sperm üretimini artırmaya yardımcı olur (Griswold 1998).

Sertoli hücrelerinin temel işlevlerinden bazıları şunlardır:

- Seminifer epitel bütünlüğünün korunması,
- Seminifer epitelin bölümlenmesi,
- Spermi kanal içinde taşımak için tübüler lümen oluşturmak üzere sıvı salgılanması,
- Spermiasyona katılım,
- Fazla sitoplazmanın ortadan kaldırılması ve fagositoz,
- Besinlerin üreme hücrelerine iletilmesi,
- Steroidogenez ve steroid metabolizması,
- Hücrelerin epitel içindeki hareketi,
- İnhibin ve Androjen bağlayıcı proteinlerin salgılanması,
- Spermatojenik döngünün düzenlenmesi,
- Sertoli hücrelerinde bulunan LH, FSH ve testosteron reseptörleri için bir hedef sağlamak (Sharma ve Agarwal 2011).

Sertoli hücreleri, testis gelişimi ve spermatogenezde kritik öneme sahiptir. Embriyonik testisin oluşumu sırasında, Sertoli hücreleri, yeni oluşan seminifer tübüllerin içindeki germ hücrelerini hapseder ve bu hücrelerin mayoz bölünme eğilimini engeller. Sertoli hücreleri ve germ hücreleri testis oluşumunu takiben hızlı bir şekilde çoğalır. Ergenlik dönemi genellikle Sertoli hücrelerinin mitozunun kesilmesini, sıkı bağlantıların oluşmasını ve germ hücrelerinin mayoz yoluyla ilerlemesini ve spermatozoaya farklılaşmasını içerir. Bu süreç, testis gelişimi için gerekli olan karmaşık bir etkileşim ağı içinde gerçekleşir (Griswold 1998).

Sertoli hücreleri, testislerdeki rolüne ek olarak, spermatogenezin başarılı olması için gerekli olan kritik faktörleri sağlar ve bu faktörler fiziksel destekten biyokimyasal uyarıya kadar çeşitlilik gösterir. Testiste sıkı bağlantı kompleksleri ve bariyerlerin kalıcılığı, spermatogenezin gerçekleşmesi için zorunludur ve Sertoli hücreleri bu komplekslerin oluşumunda kritik bir rol oynar. Sertoli hücreleri, eşey

hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olan spesifik ürünleri üretir ve adluminal bölmede benzersiz ve önemli bir ortam oluşturur (Griswold 1998).

Sertoli hücreleri ayrıca germ hücrelerinin gelişimi sırasında besleyici bir rol oynar ve germ hücre fagositozuna katılır. Spermatogenezin uygun hormonal ortamda gerçekleşmesi için Sertoli hücreleri ile gelişmekte olan germ hücreleri arasında çoklu iletişim bölgeleri bulunmaktadır. FSH, Sertoli hücrelerindeki yüksek afiniteli FSH reseptörlerine bağlandığında, androjen bağlayıcı protein üretimini artırarak testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenlerin spermatogenez sürecini başlatmasına veya devam ettirmesine izin verir. Sertoli hücreleri, anti-Müllerian hormonu salgılayarak erkek embriyonik gelişiminde Müllerian kanalların büyümesini azaltır. Sertoli hücreleri ayrıca, inhibin salgılayarak hipofiz FSH düzenlemesine katkıda bulunurlar (Behringer 1995, Josso ve ark 2001).

Kan Testis Bariyeri (KTB), maddelerin sızmasını kısıtlayan bir engel olarak görev yapar. Bu bariyer, komşu Sertoli hücreleri arasında bulunan anatomik bağlantılarla oluşturulur. Testiküler germ hücrelerinin, metabolik ihtiyaçları ve immunojenik yapılarından dolayı sıkı bir mikro ortamda bulunmaları gerekmektedir. KTB, seminifer tübül epiteli üzerinde iki ayrı bölge oluşturarak, bazal ve adluminal bölgeler arasında ayrım yapar. Bu sayede adluminal bölgedeki hücreler dış ortamdan izole edilir (Neto ve ark 2016).

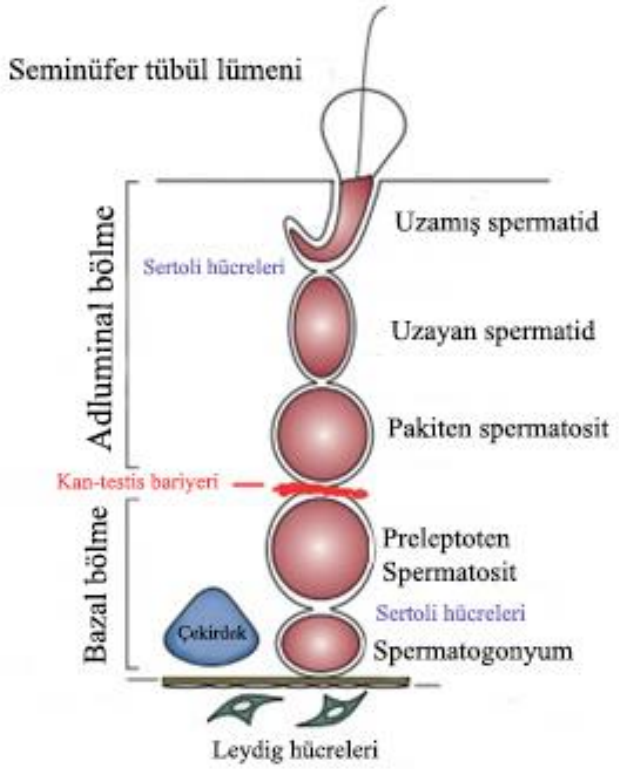
Memelilerde, KTB'nin oluşumu çeşitli anatomik yapılarla sağlanır. Bunlar arasında sıkı bağlantılar, özel bazal ektoplazmik uzantılar ve dezmozomlar bulunur. Ayrıca, peritübüler myoid ve endotel hücreleri gibi diğer hücre grupları da bu bariyere katkıda bulunur. KTB'nin yapısal bütünlüğü ve fonksiyonları, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi lokal üretilen maddeler tarafından etkilenebilir. Bu şekilde, kan testis bariyeri testiküler dokuyu koruyarak, testis içindeki hücreleri dış etkilerden izole eder ve özel bir mikro ortam sağlar (Neto ve ark 2016).

Kan-testis bariyerinin üç farklı seviyesi vardır:

I) Premayotik spermatogonia'yı germ hücrelerinin geri kalanından ayırmaya yardımcı olan Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (Şekil 1.8),

II) Kılcal damarlardaki endotel hücreleri,

III) Peritübüler miyoid hücreler (Sharma ve Agarwal 2011).

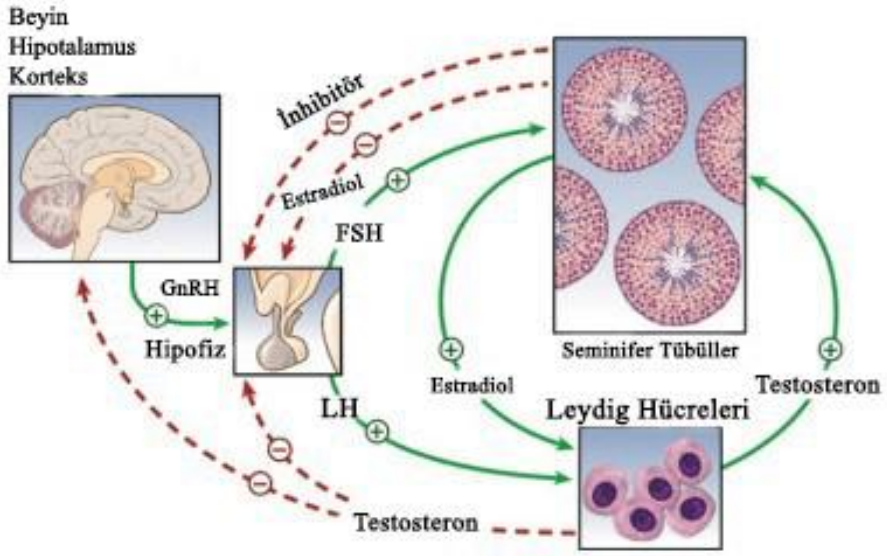


Şekil 1.8. Seminüfer tübül lümenindeki spermatogenezin biyolojisi (Cheng ve Mruk 2010).

1.1.3. Spermatogenez Sürecinde Hormonal Kontrol ve Düzenlenmesi

LH, FSH ve Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron, spermatogenez sürecinde önemli bir rol oynar (Şekil 1.9). Ayrıca Sertoli hücrelerinin salgılamış olduğu östrojen ve anterior hipofizinin salgıladığı büyüme hormonu testislerin metabolik fonksiyonlarını kontrol etmek için gereklidir (Corradi ve ark 2016).

Testosteron, Leydig hücrelerinin bulunduğu testis interstisyumunda üretilen bir hormondur ve spermatogenezin başlangıcındaki germ hücrelerinin büyümesi ve bölünmesi için gereklidir. Sıçanlarda intratestiküler testosteronun spermiogenez üzerindeki etkisi yüksek oranda belirgindir. Ayrıca testosteron, spermatogenezin erken aşaması olan A tipi açık spermatogonyadan B tipi spermatogonyaya geçiş için gerekli olabilir. Testosteronun spermatogonyal proliferasyondaki rolü sınırlı olabilir ancak anti-apoptotik mekanizmalarla spermatositlerin ve spermatidlerin canlı kalmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Matthiesson ve ark 2006, McLachlan ve ark 2002, Wen ve ark 2016).



Şekil 1.9. Hipotalamik hipofiz ekseninin ve hormonal geri bildirim sisteminin şematik gösterimi (Sharma ve Agarwal 2011).

Spermaogenez için FSH'nin LH'den daha önemli olduğu uzun süredir düşünülmekteydi, ancak LuRKO farelerinde yapılan çalışmalar, LH'nin spermatogenez için de önemli olduğunu göstermiştir. Böylece son zamanlarda, spermatogenezde baskın olan gonadotropin dengesi, FSH'de olduğu görüşü LH'ye doğru değişmiştir (Griffin ve ark 2010).

FSH, Sertoli hücrelerinin stimülasyonunu sağlar ve bu stimülasyon olmadan spermatidlerin sperme dönüşümü gerçekleşmez. Sertoli hücreleri, FSH ve testosteronun etkisi altında seminifer tübüllerde yerleşir ve spermatogenez sürecini destekler. FSH, spermatogenezin başlaması ve spermatogenezin sürekli olarak devam etmesi için gereklidir. Ancak, FSH tek başına spermatogenez için yeterli değildir ve FSH'nin ana rolü, testis içerisinde üretilen testosteronla birlikte spermin kalitesini iyileştirmektir (Huhtaniemi 2015).

Sertoli hücrelerinin sayısı ve testislerin boyutu, FSH'nin prenatal ve prepubertal proliferasyonu tarafından belirlenir(de Kretser ve ark 1998).Sertoli hücreleri tarafından FSH iç yanıt olarak sentezlenir ve spermiogenez sürecinde hayati önem taşırlar.Testislerin metabolik fonksiyonlarının düzenlenmesi için, diğer vücut hormonları gibi, büyüme hormonu gereklidir.Bu hormon ayrıca spermatogonyanın erken bölünmesini indükleyerek sperm üretiminde önemli bir rol oynar.Büyüme hormonu da testislerin metabolik fonksiyonlarının kontrolünde yer

alır ve spermatogonyanın bölünmesini indükleyerek sperm üretiminde önemli bir rol oynar (Gandhi ve ark 2017, Schulster ve ark 2016, Wagner ve ark 2008).

Testis, anatomik ve işlevsel olarak iki ayrı bölgeden oluşmaktadır. Seminifer tübül bölgesi, Sertoli hücreleri ve germ hücrelerinden oluşan ve testisin %80-90'ını kaplayan bir kompartmandır. Diğer bir kompartman olan interstisyel bölge ise Leydig hücreleri tarafından üretilen ana cinsiyet steroid hormonu olan testosteronun sentezlendiği bölgedir. Ayrıca bu bölgede, fibroblastlar, kan damarları, peritübüler myoid hücreleri, nörovasküler hücreler, mast hücreleri, lenfatikler ve makrofajlar da yer almaktadır (Aşcı ve ark 2013).

İnsan testisleri, farklı gelişim safhalarında önemli rol oynamaktadır. Fetal testisler, erkeklerde iç ve dış genital organların normal gelişimi için testosteron ve antimüllerian hormon (AMH) salgılar. Puberte döneminde, erkek sekonder cinsiyet karakteristiklerinin gelişmesi, cinsiyet fonksiyonlarının uyarılması ve sperm üretimi için hipotalamus-hipofiz-testis sisteminin aktive edilmesi ve testosteron üretimi gereklidir.Yetişkinlerde, erkek cinsiyet karakterlerinin gelişimi, cinsiyet fonksiyonlarının devamı, sperm üretimi ve fertilite potansiyeli için testisler tarafından testosteron ve sperm üretimi şarttır (Aşcı ve ark 2013).

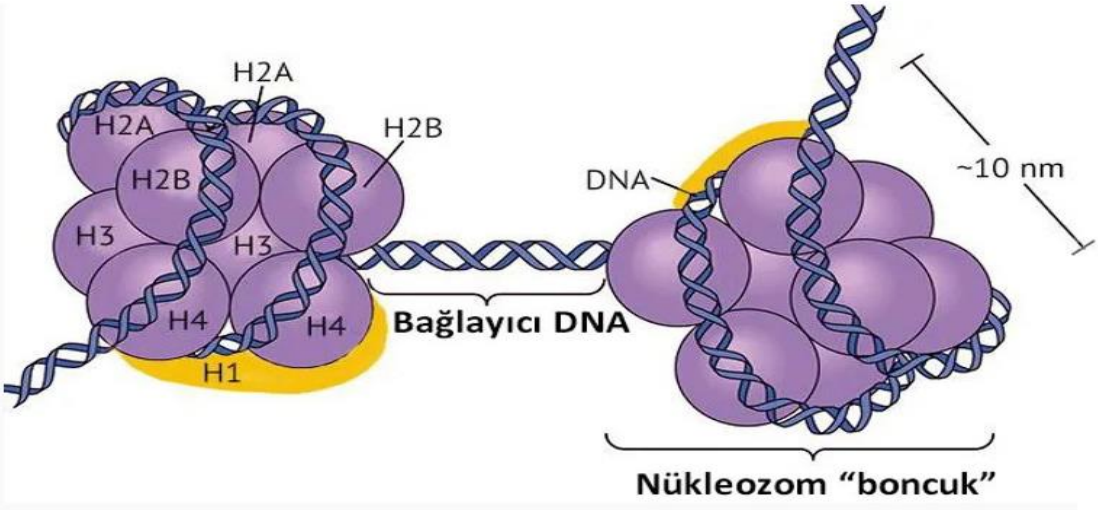
Leydig hücresinin normal işlevlerinden biri olan kolesterol depolama, korunması gereken bir süreçtir. LH uyarısı, kolesterol mobilizasyonunu uyarır. LH uyarısının azalması durumunda, Leydig hücre hacmi ve testosteron üretimi azalabilir. Bunun sonucunda, düz endoplazmik retikulum kaybı meydana gelebilir, ancak Leydig hücre sayısı değişmez. (Huhtaniemi ve Alevizaki 2006).

1.2. Spermiogenez Sürecinde Kromatin Yeniden Düzenlenmesi

İnsan hayatı boyunca, özellikle gametogenez, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişimde, global kromatin yeniden düzenlenme süreçlerinden geçer. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde gelişime ve dokuya bağlı olarak gen ifadesinin regülayonuepigenetik düzenlemelerle sağlanır. Epigenetik değişiklikler, DNA dizisi değiştirilmeden gen ifadesini etkileyen kromatin modifikasyonları olarak tanımlanabilir. Bu değişiklikler, çeşitli epigenetik mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşir. Bunlar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden modellenmesi sayılabilir.

1.2.1. Kromatin Organizsyonu ve Epigenetik Düzenlenmeler

Ökaryotik organizmalarda DNA, histon proteinlerinleriyle birlikte sarılarak kromatin formda bulunur. Kromatin yapının temel birimi, histon proteinlerinin biraraya gelmesiyle oluşan oktomerik çekirdek histon ve etrafında yaklaşık iki tur atacak şekilde saran 147 baz çiftlik DNA'nın oluşturduğu nükleozomdur. Bu histonlar H2A, H2B, H3 ve H4 olarak bilinir. H3-H4 tetrameri ve iki H2A-H2B dimeri bir araya gelerek oktomerik (sekizli) yapıyı oluşturur (Dolinoy ve ark 2007, Nestler 2014). Nükleozomlar, sekizli çekirdek yapı etrafına yaklaşık iki tur olacak şekilde sarılan DNA'nın, çekirdek yapıya giren ve çıkan DNA'yı kapatacak şekilde H1 histonuyla bağlanarak mühürlenmesiyle tamamlanır (Şekil 1.10 ve Şekil 1.11) (Campos ve Reinberg 2009).Histon proteinleri, yüksek düzeyde lizin ve arjinin gibi artı yüklü amino asitleri içerdiklerinden eksi yüklü DNA molekülüyle güçlü bir şekilde etkileşirler (Dolinoy ve ark 2007).

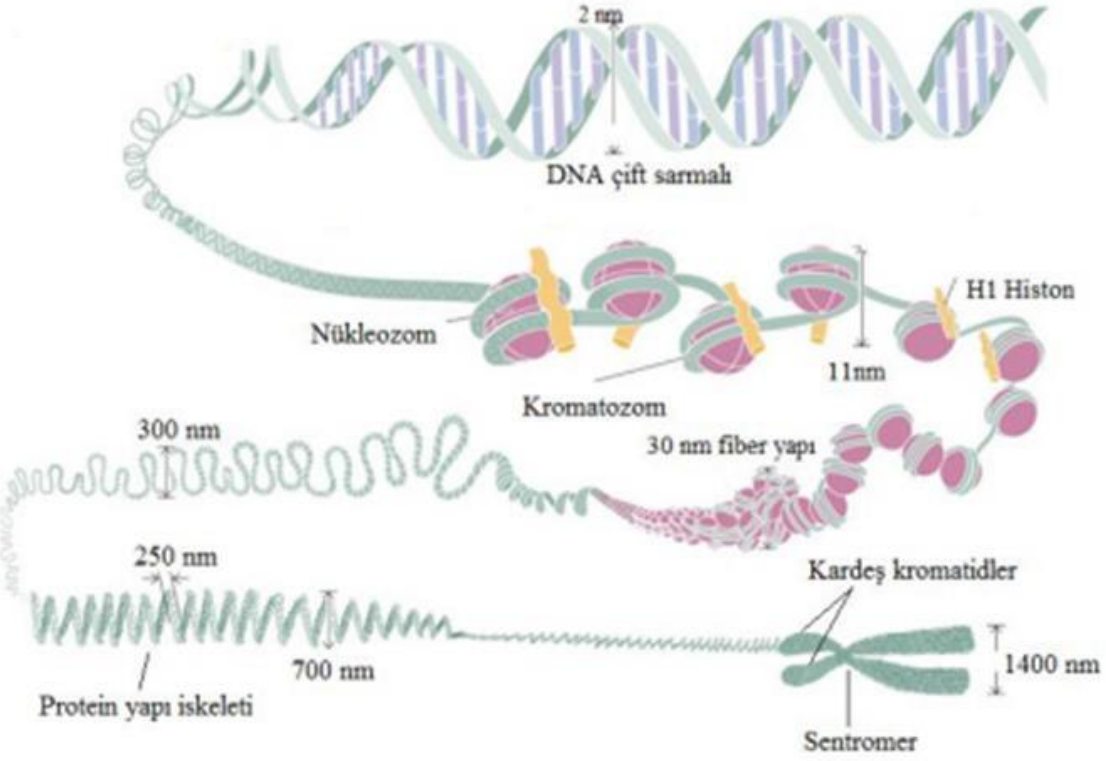


Şekil 1.10. Kromatini oluşturan nükleozom yapısı. Nükleozom yapısı, histon proteinleri tarafından oluşturulan oktomerik histon çekirdeği etrafına yaklaşık 2 tur olacak şekilde çift sarmallı DNA'nın sarılması ve H1 ile bu yapının mühürlenmesiyle oluşur (Kalaivani 2016).

Elektron mikroskobu ile çekilen görüntülerde katlanmamış kromatinin, bir ip üzerindeki boncuklar gibi bir görüntüsü bulunmaktadır (Dolinoy ve ark 2007, Nestler 2014).

Epigenetik değişiklikler, kromatin yapıdaki moleküler modifikasyonları kapsar. Bu modifikasyonlar DNA düzeyinde ve histon düzeyindeki modifikasyonlardır. Bu

kromatin yapısındaki değişiklikler, gen ifadesinin kontrolünde önemli bir rol oynarlar. Kromatin sıkı paketlendiğinde (sessiz), genler aktifliğini kaybederken, kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (aktif) genler aktif duruma geçer (Nestler 2014).

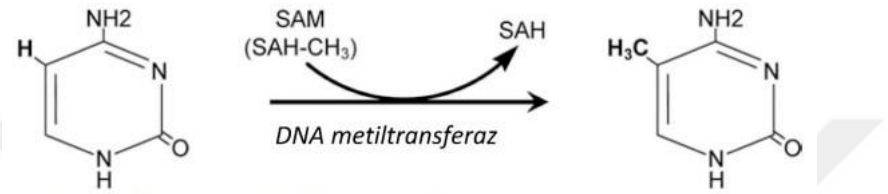


Şekil 1.11. Kromozomun yapısal organizasyonu (Pray 2008).

DNA düzeyindeki değişiklikler arasında en yaygın ve işlevsel olanı DNA metilasyonudur. Bu değişiklik, genellikle omurgalılarda CpG bölgelerine bir metil grubunun DNA metiltransferaz (DNMT) enzimi tarafından bağlanmasıyla gerçekleşir. CpG adaları, gen bölgelerinde GC'ye oranla daha fazla CG dinükleotidi içeren ve genellikle 500 baz çiftinden oluşan DNA bölgeleridir. Metil grubu, DNA'nın sitozin bazının pirimidin halkasındaki 5. karbonuna eklenir ve S-Adenozil Metiyonin (SAM) metil vericisi olarak görev yapar (Şekil 1.12) (Takai ve Jones 2002).

DNA metilasyonu genellikle yetişkin somatik dokularda CpG dinükleotit dizilerinde meydana gelirken, CpG olmayan metilasyon embriyonik kök hücrelerde daha yaygındır. Bu değişiklik, DNA'nın pasif hale gelmesine yol açarak gen ifadesini engelleyen bir mekanizmadır (Nestler 2014).

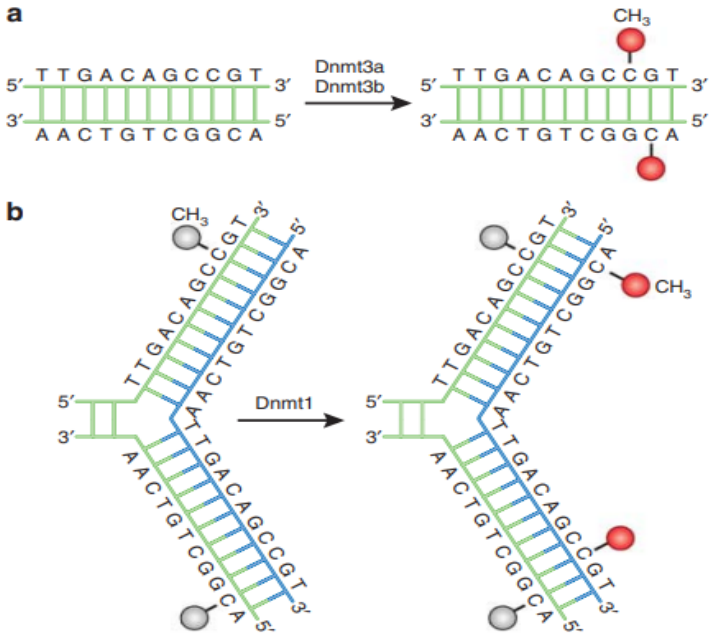
CpG adaları, memeli genlerinin önemli bir kısmının promotor bölgelerinde bulunur (Nimura ve ark 2006).DNA metilasyonu, özellikle CpG adacıklarındaki metilasyon, gen ifadesinin kontrolünde önemli bir faktördür. Bu metilasyonun düzenlenmesi, özellikle genlerin promotor bölgelerindeki metilasyon, transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değişikliklere neden olarak bu faktörlerin bağlanmasını engelleyerek gen ifadesinin baskılanmasında rol oynar. Bu nedenle, hücre farklılaşması ile birlikte farklı dokularda farklı genlerin ifade edilmesinin temelinde bu düzenleme yatar (Russo ve ark 1996).



Şekil 1.12. Sitonin, DNA'daki CpG adacıklarında (Guaninden önceki sitozin bölgeleri) metiltransferaz enzimi ve SAM varlığında, 5. pozisyondaki karbon atomundan metile edilerek 5-metilsitozin'e dönüştürülmesi (Russo ve ark 1996).

DNMT'ler, DNA'nın de novo metilasyonunu ve bu metilasyonun devamlılığını sağlamada görevlidir(Goll ve ark 2006).DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b, DNA metilasyonunda farklı rolleri olan üç ana metiltransferazdır (Şekil 1.13). DNMT1, metilasyonun korunması ve devam ettirilmesinde kilit rol oynarken, DNMT3a ve DNMT3b, genomik DNA'nın de novo metilasyonunu gerçekleştirir (Nimura ve ark 2006).

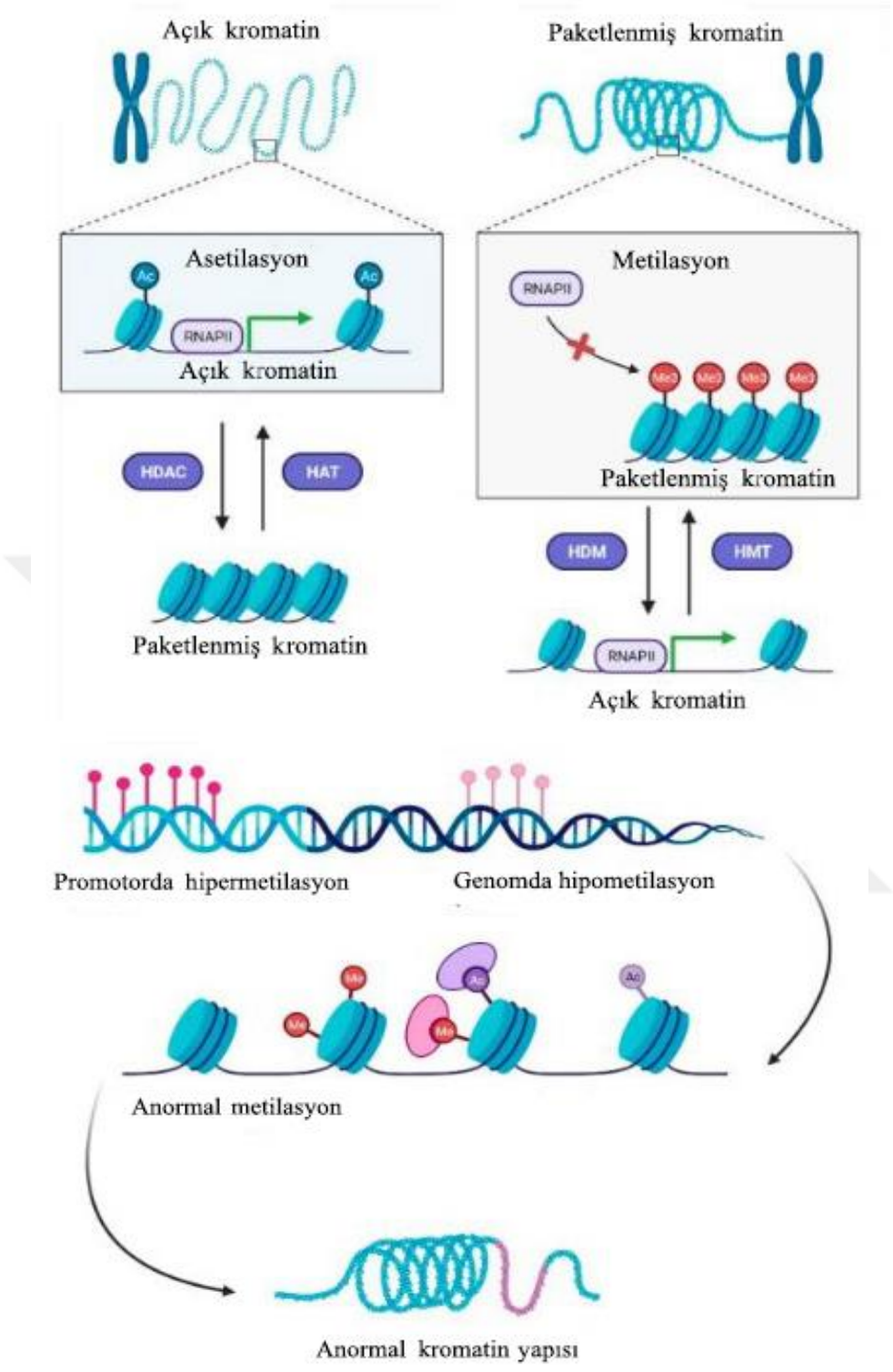
Histon düzeyindeki modifikasyonlar ise, evrimsel süreçte genellikle korunan kovalentli ya da kovalentli olmayan modifikasyonlardır. Bu değişiklikler arasında lizin ve arjinin kalıntılarının metillenmesi, asetillenmesi, serin ve treonin kalıntılarının fosforillenmesi, prolin izomerizasyonu, monoubikuitinasyon ve sumoylasyon gibi kovalent modifikasyonlar örnek olarak verilebilir (Zhang ve ark 2007).



Şekil 1.13. DNA metilasyon yolları (Singal ve Ginder 1999).

Histon kodu, DNA'nın gen bölgelerinin transkripsiyon sürecine uygun hale gelmesi veya uygun olmamasınıssağlayan modifikasyonların oluşturduğu işarettir Bu kodun oluşumunda, DNA'yı sıkı bir şekilde paketleyen histon proteinlerinin amino (N) ucunda bulunan amino asitlere eklenen çeşitli işaretlerle gerçekleştirilir (Russo ve ark 1996).

Histon asetilasyonu, Histon asetil transferaz (HAT) ve Histon deasetilaz (HDAC) enzimleri aracılığıyla düzenlenen bir histon modifikasyonudur ve genellikle transkripsiyonun artmasına yol açar (Şekil 1.14). Histona asetil grubu eklenmesi, negatif yüklü DNA ile histon arasındaki çekim gücünün azalmasına ve DNA'nın daha gevşek bir yapıya dönüşmesine neden olur.



Şekil 1.14. Histon Modifikasyonları. HAT: Histon asetil transferaz, HDAC: Histon deasetilaz, As: asetil, Me: metil, HDM: Histon demetilaz, HMT: Histon metiltransferaz (Kukkonen ve ark 2021).

Histon proteinlerindeki amino asitlere metil gruplarının eklenmesi, histon metiltransferaz enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilen bir epigenetik modifikasyondur. Histon metilasyonu genellikle bir genin susturulmasına yol açar. Özellikle metillenmiş H3K9me (H3 proteininin N-ucundaki 9. pozisyondaki lizin kalıntısının metilasyonu) yapısal (bünyesel) heterokromatinde bulunan, transkripsiyon açısından inaktif olan DNA bölgelerinin histon modifikasyonudur. H3K27me ise seçenekli heterokromatin bölgelerin epigenetik işaretidir. DNA metilasyonunun bu histon metilasyonlarını tetikleyebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bazen arjinin ve lizin metilasyonu gen aktivasyonuna yol açabilir. Epigenetik düzenlemede önemli bir rol oynayan H3K4me3 aktif transkripsiyonu yapılan genelerin promotor bölgelerinde zengindir. Hücre tiplerine göre farklı açık/kapalı gen setleri bulunabilir (Stuppia ve ark 2015).

Histon asetilasyonu ve metilasyonunun yanı sıra farklı histon modifikasyonları da tanımlanmıştır. PADI enzimi tarafından arjininin sitrüline dönüşmesi histon deiminasyonu olarak isimlendirilir ve kromatinin gevşemesine yol açar. β-N-asetilglukozamin (O-GlcNAc)'in serin veya treonin rezidülerine eklenmesi ile histon glikozilasyonu, glutamat ya da arginin rezidülerine riboz gruplarının eklenmesi histon ribozilasyonu, lizin rezidülerine ubiqitinin bağlanması ile histon ubikitinasyonu, serin, treonin ve tirozin rezidülerine fosfat gruplarının bağlanması ile histon fosforilasyonu, sistein rezidüsüne nitrosil grubunun eklenmesi ile histon nitrozilasyonu gerçekleşir. Bu modifikasyonlar ile histon-DNA ve histon-histon ilişkisi etkilenmekte, DNA paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olay kontrol edilebilmektedir (Strahl ve Allis 2000).

Hsiton düzeyindeki bu kovalentli modifikasyonların yanı sıra kovalentli olmayan birçok modifikasyon da bulunmaktadır. Kromatin remodeling kompleksler tarafından gerçekleşen bu modifikasyonlarda histon takasları, nükleozom yeniden yapılanmaları vb gerçekleşmekte ve kromatin durumu, erişilebilirliği ve gen ifadesi gibi süreçler düzenlenmektedir.

1.2.2. Sperm Kromatin Yeniden Modellenmesi

Spermiogenez sürecinde, sperme özgü ve olağan dışı bir kromatin organizasyonu gerçekleşir. Bu düzenleme protamin (P) proteinlerinin histon proteinleri ile yer değiştirip daha sıkı bir paketlenmenin gerçekleşmesi olan kromatin

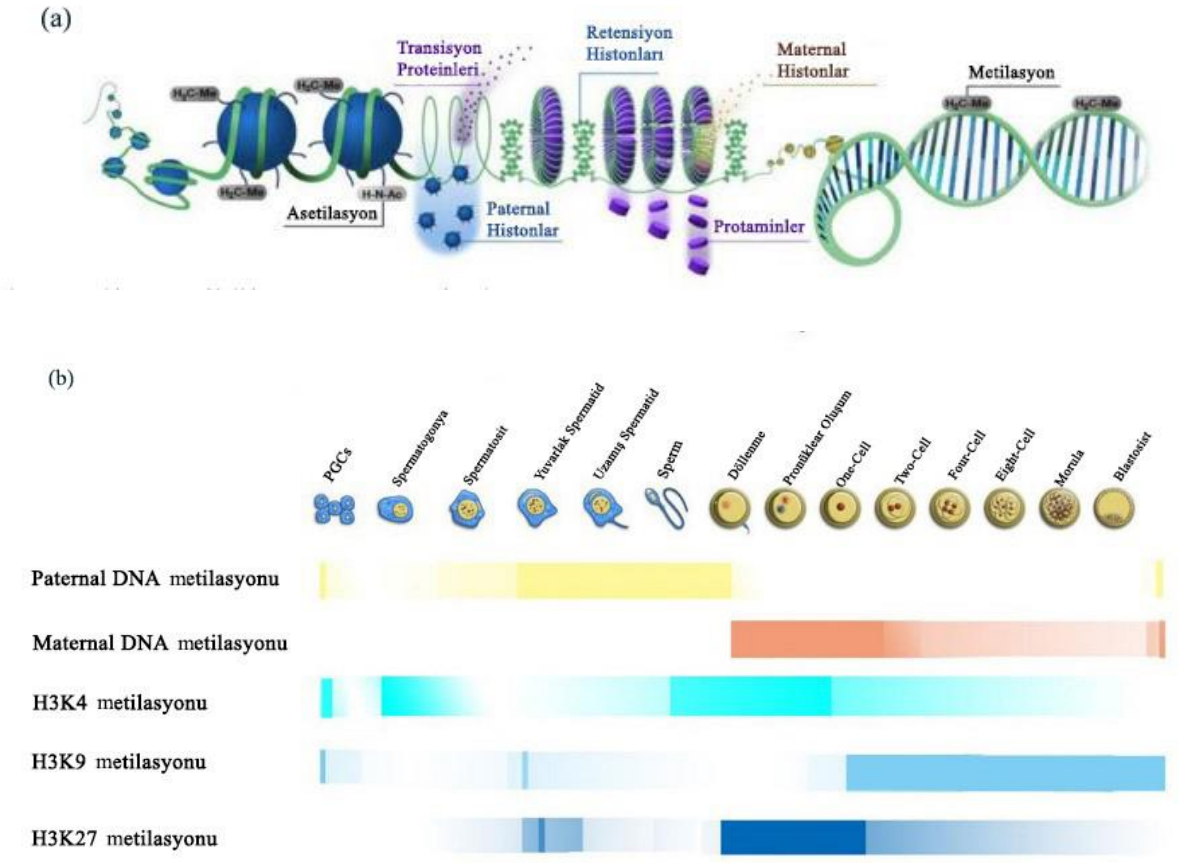
yeniden modellenme sürecidir (Şekil 1.15). Bu süreçte histonlar histon olmayan proteinlerle yer değiştirir. Somatik hücrelerde kromatin 6 µm çapındaki nükleusda organize iken, olgun sperm kromatininin 5.1 µm çapındaki nükleusa sığması için diğer dokularda görülmeyen özel düzenlemeler gerçekleşir. Sperm DNA'sına ait basit proteinler olan bu histon olmayan proteinler, protaminler olup sadece olgun sperm hücrelerinde ifade edilir. Protamin proteini, içeriğindeki yüksek arjinin oranı sayesinde daha pozitif yüklüdür ve bu nedenle negatif yüklü DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanır. Yaklaşık 50 aminoasit kalıntısından oluşan oldukça küçük proteinler olan protaminler tarafından paketlenen DNA, somatik hücre DNA'sına göre son derece stabil ve korunmuş bir şekildedir.

Mayoz bölünmeyi tamamlamış olan ikincil spermatitler (yuvarlakspermatit), DNA'ya bağlı olan histonlarının %85-90'ını protaminlerle yer değiştirecekleri bir sürece girerler. Sperm DNA'sında kalan %10-15'lik kısmı oluşturan histonların genellikle kromozomların perisentrik (merkeze yakın) bölgelerinde ve imprint bölgelerinde bulunduğu önerilmiştir. Histon-protamin yer değiştirme süreci henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber protaminasyondan hemen önce, sperme özgü histon varyantlarının kanonik histonlar ile yer değiştirdiği ve bu durumun, hemen sonra gerçekleşen histon asetilasyonunu kolaylaştırdığı belirlenmiştir. Histon 4 (H4) üzerinde hiperasetilasyonun meydana gelmesinin bir kaskadı tetiklediği düşünülmektedir (Govin ve ark 2007, Rousseaux ve ark 2009, Tanphaichitr ve ark 1978).

Histonların hiperasetilasyonu, kromatin yapısının gevşemesine yol açar. Gevşek kromatin yapısı, topoizomeraz kaynaklı zincir kırıklarını uyarmak suretiyle histonların ayrılmasını ve geçiş proteinleri (TP1 ve TP2) ile yer değiştirmesini kolaylaştırır(Kuretake ve ark 1996, Oakes ve ark 2007, Yanagimachi 2005). Geçiş proteinler DNA'ya bağlanarak, DNA'dan histonların ayrılması ve sonrasında yerini alan protaminlerle değiştirerek protamin-DNA paketlenmesinde önemli rol oynar.TP1 ve 2, bazik özelliklere sahip nonhiston proteinlerdir.

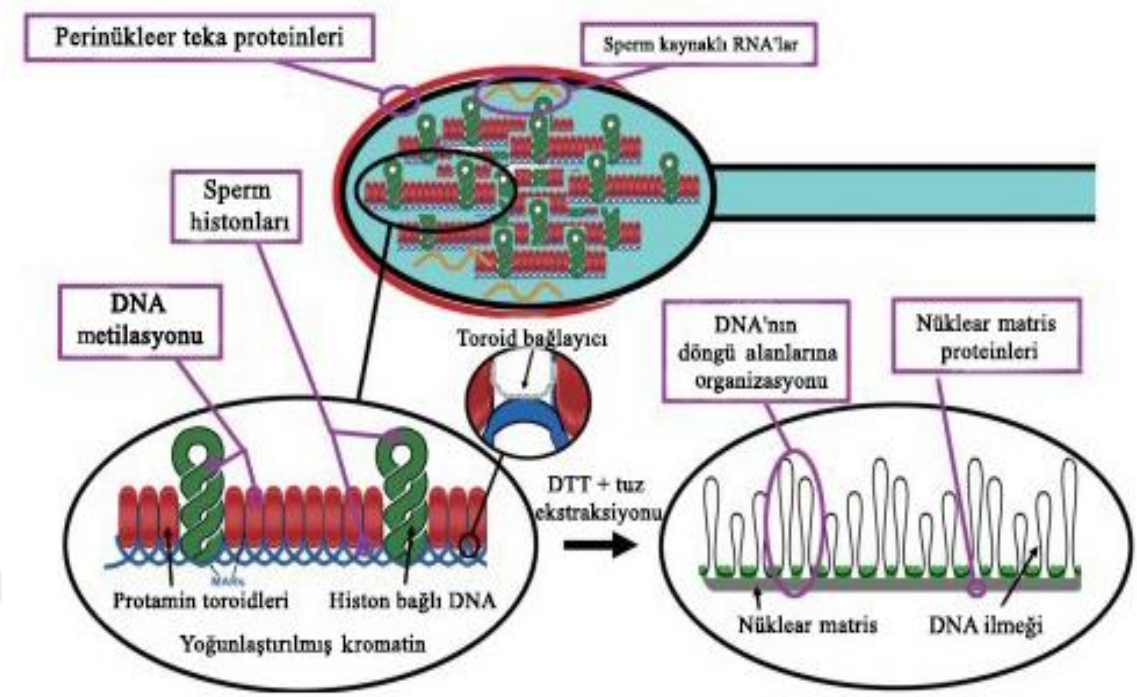
İnsanlarda yaklaşık olarak eşit oranda ifade edilen P1 ve P2 olamak üzere iki protamin proteini bulunmaktadır. Protaminlerin toroid yapı oluşturarak DNA'yı paketlemesi ile çok daha sıkı bir şekilde paketlenmiş kromatin oluşur ve böylece spermatozoanın baş kısmının şekil alması ve yolculuğu sırasında genom için

güvenilir koşullar oluşturulmuş olur (Gardiner-Garden ve ark 1998, Govin ve ark 2007, Laberge ve Boissonneault 2005).



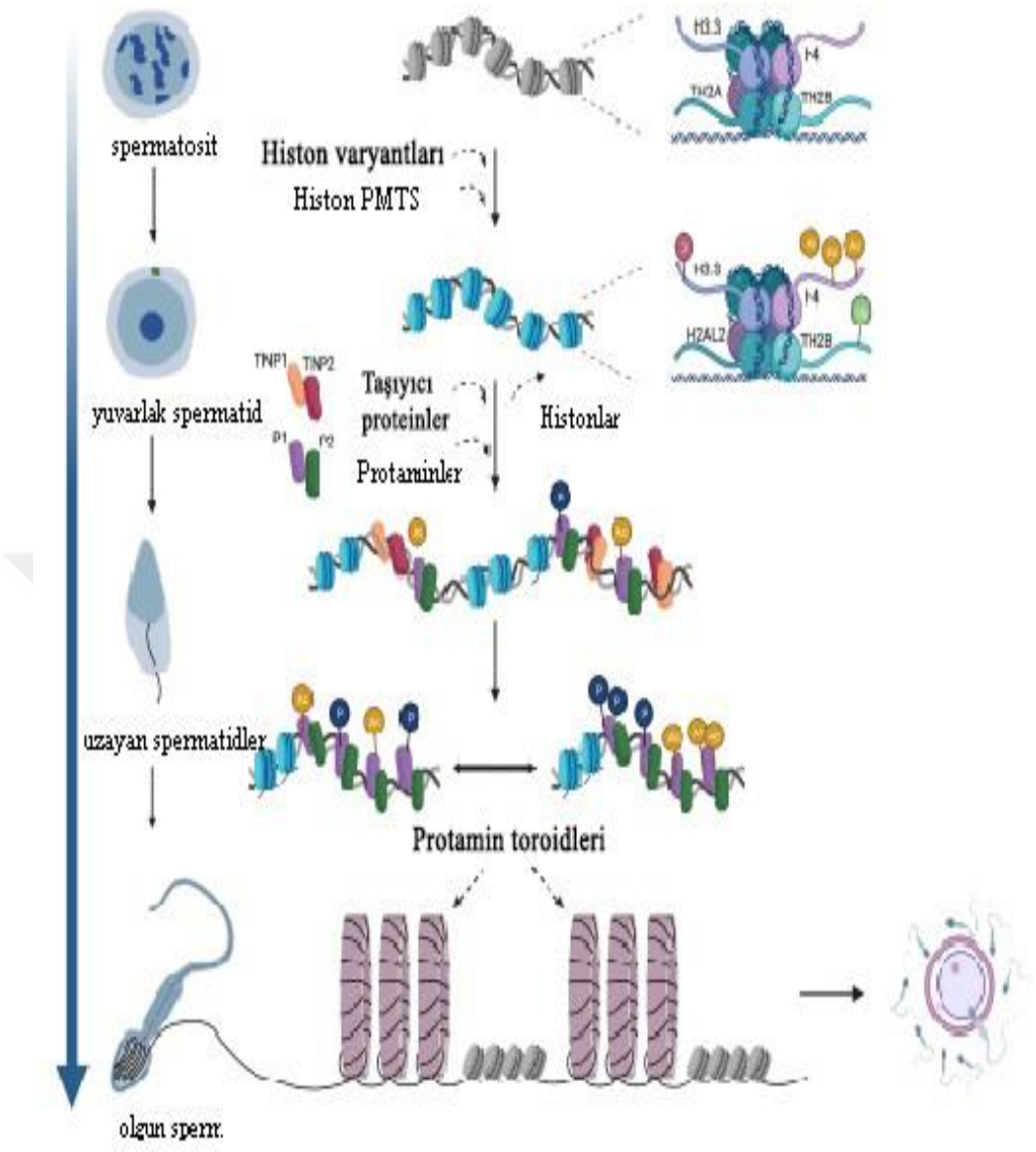
Şekil 1.15. Spermatogenez, fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi sırasında kromatin yeniden şekillenmesi ve epigenetik modifikasyon değişiklikleri (Ge ve ark 2017).

Memeli sperm kromatini üç bölümden oluşur; protaminlere bağlanan DNA bölümü, histonlara bağlanan DNA bölümü ve sperm çekirdek matriksine bağlanan DNA bölümü. Protaminlerin içerdikleri yüksek sistein rezidüleri ile toroidal kromatin yapıları arasında disülfit bağları oluşur. Her toroidal alt ünitede yaklaşık 50 kb DNA paketlenir. Her toroid DNA'nın bir halka bölgesine ve bağlayıcı bölge matriksine bağlı bölgelere sahiptir (Şekil 1.16). Her protamin toroidi, bir DNA ilmek domeyni olarak kabul edilir (Govin ve ark 2004). Bu model, toroidlerin sıkıştırılması ve istiflenmesiyle protaminlere bağlı DNA'nın hasardan korunduğunu, ancak bağlayıcı bölgelerin ve histona bağlı DNA bölgelerinin endonükleazlar tarafından oluşturulan DNA hasarına maruz kaldığını göstermektedir (Vara ve Ruiz-Herrera 2021).



Şekil 1.16. Protaminlerle yeniden modellenmiş sperm kromatini (Yamauchi ve ark 2011).

Protaminler, DNA'yı sıkı bir şekilde paketlenmiş toroidler halinde sararak kristalize bir yoğunlaşma durumuna neden olur (Şekil 1.17). Sperm DNA'sı, sperm nükleer matriksi tarafından organize edilerek ilmekler halinde sarılır. Bu, DNA'nın çoğunun protamin toroidlerine sarılıp, her toroid arasındaki DNA'nın nükleer matrikse bağlanmasıyla gerçekleşir (Vara ve Ruiz-Herrera 2021).



Şekil 1.17. Histon-protamin değişimine ve kromatin dinamiklerine genel bir bakış (Moritz ve Hammoud 2022).

1.2.3. Kromatin Yeniden Modellenmesinin Moleküler Düzenlenmesi

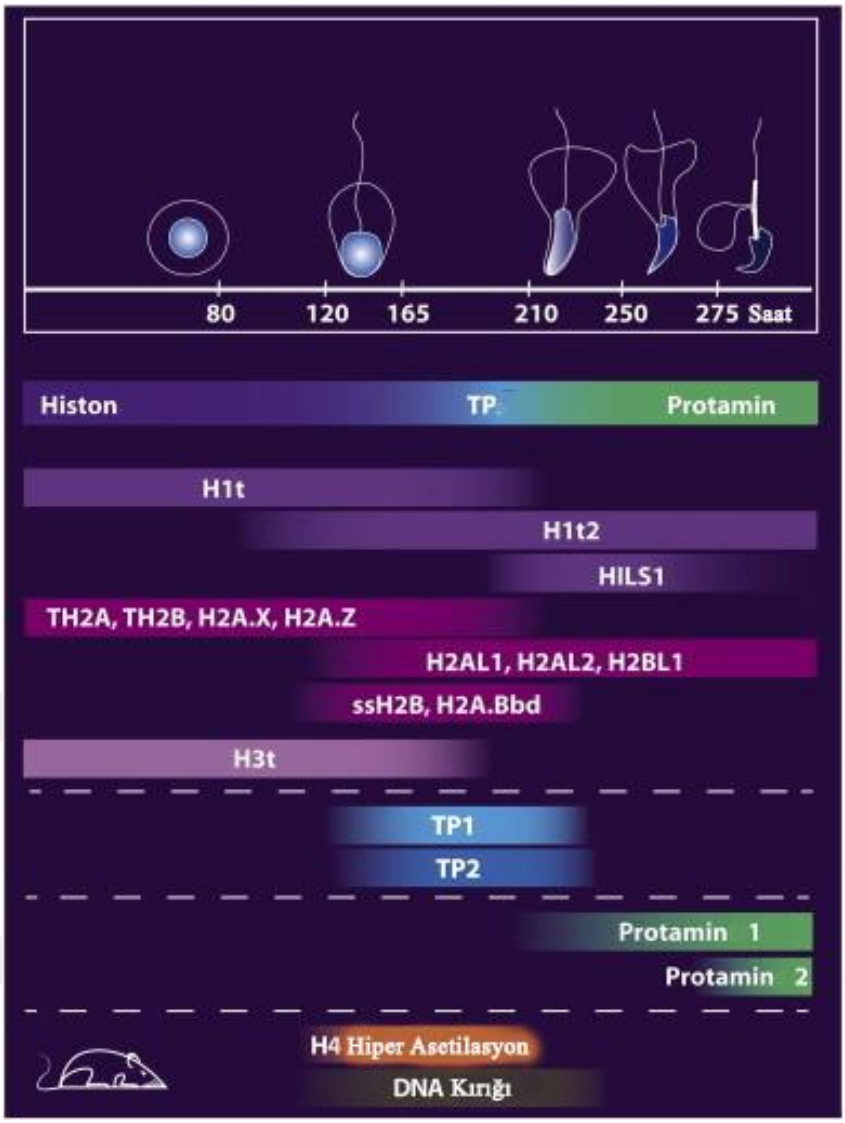
Spermatozoaların benzersiz kromatin yapısı, en yoğunlaştırılmış DNA'ya sahip olan ökaryotik hücreler arasında yer almaktadır. Protaminler, spermiogenez sırasında histonların yerini alarak DNA bağlayıcı protein olarak kullanılır ve sperm DNA'sını sıkıca paketlenmiş toroidler halinde sarar. Böylece sperm DNA'sının büyük kısmı, protaminler tarafından kristal kafes içinde yoğunlaştırılır, paternal DNA'sının sadece küçük bir kısmı ise, histonların varlığını sürdürdüğü, nükleazlara

ve diğer DNA bağlayıcı proteinlere duyarlı kalmaya devam eder. Bu, erken embriyoda paternal genom fonksiyonunun başlatılması için önemli olabilen bölgeleri içerir. Protamin bağlanmasının diğer bir yönü, zigota moleküler talimatlar veren aktif sperm kromatin merkezlerinin korunmasıdır. Bu nedenle, protaminler spermatozoada paternal genomun korunması için kritik bir rol oynamaktadır (Álvarez-González ve ark 2022, Govin ve ark 2004).

Spermiogenez sürecinde paternal genom organizasyonunda çarpıcı bir yeniden düzenleme vardır. Bu kromatin yeniden düzenleme sürecinde nihai amaç protamin-histon yer değişikliği olsa da arka planda çok sayıda moleküler oyuncu ve mekanizma yer almaktadır ve süreç aşama aşama ilerler (Şekil 1.18).

Bu süreçte histon varyantlarının dinamik ifadesi dikkat çekmektedir. Nükleozomlar, daha önce de bahsedildiği gibi, klasik (kanonik) H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarını ve H1 histonunu içerir. Ancak gen regülasyonu, DNA tamiri, özel kromozom bölgelerinin organizasyonu gibi farklı işlevlerde rol oynayan kanonik olmayan histon varyantları da keşfedilmiştir. Memelilerde en korunmuş olanı H4 olup çok az türde varyantı bulunmuştur ancak memelilerde herhangi bir varyantı bugüne kadar belirlenmemiştir (Rathke ve ark 2014). Bazı histon varyantları tüm doku ve hücrelerde ifade edilirken bazı varyantların bazı dokulara, örneğin erkek germ hücreleri gibi, özgü olduğu görülmüştür.

Memelilerde 11 farklı histon 1 varyantı tespit edilmiştir. Bunlardan H1t, H1T2 ve HILS1 varyantlarının testise özgü ifade edildiği ortaya konmuştur(Happel ve Doenecke 2009). H1t, haploid germ hücrelerinde histon-protamin yerdeğişimi oluncaya kadar ifade edilir (Martianov ve ark 2005, Tanaka ve ark 2005). Spermatid çekirdeğinde H1T2'nin akrozomun altında apikal kutupdaki kep-benzeri yapıda lokalize olduğu gösterilmiştir. Bu spesifik lokalizasyonun muhtemelen sperm çekirdeğine polarite kazandırdığı ve DNA'nın doğru kondenzasyonu için gerekli olabileceği düşünülmektedir (Catena ve ark 2006). Spermatide özgü HILS1 varyantı ise uzamış spermatidde yoğun bir şekilde ifade edilir(Iguchi ve ark 2003, Yan ve ark 2003). Spermiogenezin bu geç aşamasında, çok az histonun yer aldığı bu aşamada, HILS1'in yoğun ifadesinin olması, histonlarıbağlamaktan ziyade farklı işlevleri olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 1.18) (Yan ve ark 2003).



Şekil 1.18. Sperm kromatininin yeniden modellenmesinde moleküler süreçler (Rathke ve ark 2014).

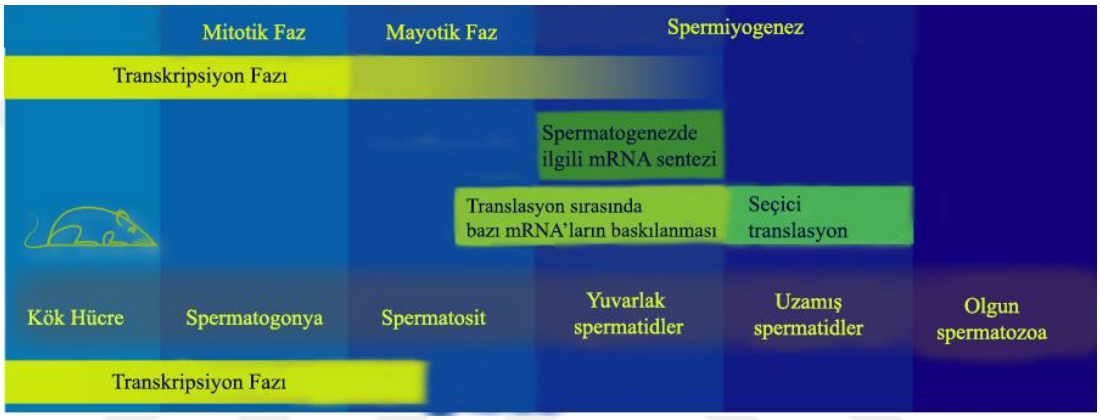
H2 varyantlarından H2A.X ve H2A.Z spermiogeneze kadar erkek germ hücrelerinde ifade edilirken kromatin yeniden organizasyonunda kaybolduğu gözlenmiştir (Greaves ve ark 2006, Jayaramaiah Raja ve Renkawitz-Pohl 2005, Leduc ve ark 2008, Rathke ve ark 2007). Yine spermiogenez sürecinde farklı H2A ve H2B varyantlarının ifade edildiği ortaya konmuştur. Testise özgü H2A ve H2B varyantı olan TH2A ve TH2B testiste ifade edilir ve spermatid çekirdeklerinin yoğunlaşması sırasında her ikisi de yavaş yavaş kaybolur (Kim ve ark 1987, Tanphaichitr ve ark 1978). Ancak insanlarda, TH2B'nin olgun spermlerde saptandığı bildirilmiştir (Van Roijen ve ark 1998). Spermatide özgü H2B varyantı olan ssH2B varyantı ise, yuvarlak spermatidlerde spesifik olarak ifade edilir ve kromatinden

histonların ayrılması ve yeniden kondenzasyonu sırasında kaybolur (Chadwick ve Willard 2001, Moss ve ark 1989). Kanonik olmayan H2A.B.bd ise testislerde özellikle yüksek düzeyde asetilayon sırasında bol miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Chadwick ve Willard 2001). In vitro çalışmalarda H2A.B.bd varyantının, kromatini kararsızlaştırıp açabildiği gösterildiğinden bu varyantın kromatinin yeniden düzenlenmesine ve histonların geçiş proteinleri tarafından yer değiştirmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Bao ve ark 2004, Gautier ve ark 2004, Ishibashi ve ark 2010). H2A ve H2B varyantlarından H2AL1, H2AL2, H2AL3 ve H2BL1 varyantlarının, pakiten spermatositlere kıyasla yuvarlak ve uzayan spermatitlerde güçlü bir şekilde ifade edildiği, H2BL2 varyantının ise, mayoz ve mayoz sonrası aşamalarda çok düşük seviyelerde bulunduğu rapor edilmiştir (Govin ve ark 2007). H2AL1 ve H2AL2'nin spermatidlerin perisentrik bölgelerinde lokalize olduğu o nedenle perisentrik heterokromatin organizasyonunda rol oynayabileceği bildirilmiştir (Şekil 1.18) (Govin ve ark 2007).

İki kanonik H3.1 ve H3.2'ye ek olarak kanonik olmayan H3.3, H3t ve CENP-A ile son zamanlarda H3.5 varyantları tanımlanmıştır (Schenk ve ark 2011, Szenker ve ark 2011). H3.5 varyantının spesifik olarak insan testislerinin seminifer tübüllerinde ifade edildiği bildirilmiştir (Schenk ve ark 2011). H3t varyantının ise erkek germ hücrelerinde oldukça zengin olduğu somatik hücrelerde düşük miktarda ifade edildiği tespit edilmiştir (Tachibana ve ark 2008, Trostle-Weige ve ark 1984). H3t, spermatogonyada, spermatositlerde ve erken spermatidlerde saptanmıştır (Şekil 1.18) (Trostle-Weige ve ark 1984). Ayrıca erkek germ hücrelerinde CENP-A sentromerlerle ilişkilidir ve olgun spermde kalıcı olduğu görülmüştür (Loppin ve ark 2001).

Spermiogenez sürecinde transkripsiyon ve translasyon sıkı bir şekilde kontrol altında tutulmaktadır. Post mayotik aşamada erken yuvarlak spermatid aşamasında gen aktivasyonu hayli yüksekken spermatid maturasyonu ilerledikçe trankripsiyonel aktivasyon tedricen azaldığı ve geç spermatidde tespit edilemez olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.19) (Kierszenbaum ve Tres 1975). O yüzden yuvarlak spermatid aşamasında protamin geçiş proteini genleri transkribe edilir ancak mRNA'ları translasyona uğramaz ve depolanır (Steger 1999). Spermiogenez ile ilgili genlerin, protamin genleri de dahil, transkripsiyonu için testis-spesifik TATA kutusu bağlanma proteini ile ilişkili faktör (tTAF)'lerin gerekli olduğu rapor edilmiştir(Hiller ve ark 2004,

White ve Heasman 2008). Memelilerde TAF7L ve TAF4b gibi TAF proteinleri tanımlanmıştır (Falender ve ark 2005, Pointud ve ark 2003). Geç spermatidde translasyon düzenlenmesinin mRNA'ların fonksiyonel bölgelerinden gerçekleştiği, örneğin protamin mRNA'sının 5'-UTR üzerinden baskılandığı, translasyonel aktivasyonunun ise açık okuma çerçevesi üzerinden gerçekleştiği ortaya konmuştur (Barckmann ve ark 2013).Uzamış spermatid aşamasına geçildiğinde ise depolanmış mRNA'ların seçici translasyonu başlar. Bunlar arasında protamin mRNA'ları da vardır (Barckmann ve ark 2013, Jayaramaiah Raja ve Renkawitz-Pohl 2005, Rathke ve ark 2014).



Şekil 1.19. Spermiogenez sürecinde gen ifadesinin regülasyonu (Rathke ve ark 2014).

Histon-protamin yerdeğişiminde ilk aşama histonların hiperasetilasyonudur. Histon asetiltransferazlarca düzenlenen bu mekanizmada muhtemelen histon deasetiltransferazların baskılanması ya da degredasyonu da eş zamanlı devam eder ve böylece kromatin gevşer. Şaperonlar kromatin yapının gevşemesini kolaylaştırmak üzere histon varyantlarını taşıyarak sürece iştirak ederler (Park ve Luger 2008). Testise özgü histon şaperonu TNASP, H1t'ye bağlanırken (Alekseev ve ark 2005), bir diğer testise özgü şaperon olan HSPA2 geçiş proteinleriyle etkileşim kurar (Govin ve ark 2006). Son zamanlarda kanonik histon şaperonu CAF1'in de protaminlerin birikiminde gerekli olduğu gösterilmiş ve protamin şaperonu olarak iş görebileceği önerilmiştir(Doyen ve ark 2013). Histon varyantlarıyla yer değiştiren kanonik histonların poliubikitinlenerek proteozomlarda yıkıldığı düşünülmektedir (Rathke ve ark 2014). Farelerde proteazomların, spermatid uzaması sırasında akrozomal vezikülün ana hatları boyunca yerleştiği gösterilmiştir (Berruti ve Martegani 2005). Ayrıca her ne kadar çalışmalar az da olsa testise özgü proteozom

alt ünitelerinin gösterilmesi yüksek miktarda histon degredasyonunun proteozom aracılığıyla olacağı düşüncesini desteklemektedir (Berruti ve Martegani 2005, Zhong ve Belote 2007).

Bromodomeyn proteinleri asetil işaretlerine bağlanarak, kromatinin daha da ileri düzeyde gevşemesi için kromatin remodeling komplekslerinin toplanmasını kolaylaştırırlar (Morinière ve ark 2007). Bu sırada topoizomeraz II tarafından DNA kırıklarının oluşturulur. Spermiogenez esnasında geçici DNA kırıklarının görülmesinin sebebinin muhtemelen histonların uzaklaştırılması sırasında oluşan süpersarmalları düzeltmek olduğu düşünülmektedir (Smith ve Haaf 1998). Farede uzamış spermatidde topoizomeraz II ifadesinin tespiti memelilerde spermiogenezde DNA ipliklerinin kontrollü yıkımında bu enzimin iş gördüğüne kanıt olarak gösterilmiştir (Laberge ve Boissonneault 2005). Topoizomeraz II oluşturduğu kırıkları kendi onarabilir. Uzamış spermatidde Topoizomeraz II beta (TOPIIB) enziminin fosforile H2AX ile aynı yerlerde gösterilmesi DNA çift iplik kırığından sorumlu olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca TOPIIB tarafından kırılan DNA bölgelerini tamir ettiği bilinen tirozil-DNA fosfodiesteraz 1 (TDP1) enziminin de uzamış spermatidde tespiti bu görüşü desteklemektedir. Ancak bu süreçte başka DNA tamir mekanizmalarının da genom bütünlüğünü sağlamak üzere iş gördüğüne dair çalışma bulguları da bulunmaktadır (Cabrero ve ark 2007, Meyer-Ficca ve ark 2009, Meyer-Ficca ve ark 2005).

İyice gevşemiş kromatinden histonların geçiş proteinleriyle, muhtemelen şaperonların taşıdığı, yer değişimi artık mümkün olur. Histonların çıkarılıp protaminlerin organize olması arasındaki zaman diliminde kromatin bileşeninin %90'ında geçiş proteinleri bulunur (Meistrich ve ark 2003). Geçiş proteinlerinin işlevleri hala tam olarak açıklık kazanmamış olmakla beraber TP1'in DNA'nın erime sıcaklığını düşürdüğü, nükleozomal DNA'yı gevşettiği ve topoizomeraz II'nin işlevini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Akama ve ark 1999, Meistrich ve ark 2003). Her iki geçiş proteininden yoksun farelerde yapılan çalışmalar histon-protamin yer değişiminin büyük oranda gerçekleşebildiğini ama kromatin yoğunlaşmasında düzensizlikler olduğunu göstermiştir. Üstelik artan DNA kırıkları, epididimal sperm sayısı azlığı ve infertilite saptanmıştır (Zhao ve ark 2004). Kromatin remodeling komplekslerinin geçiş proteinleri tarafından histonların değiştirilmesine rehberlik ettiği düşünülmektedir. Remodeling komplekslerinin erkek

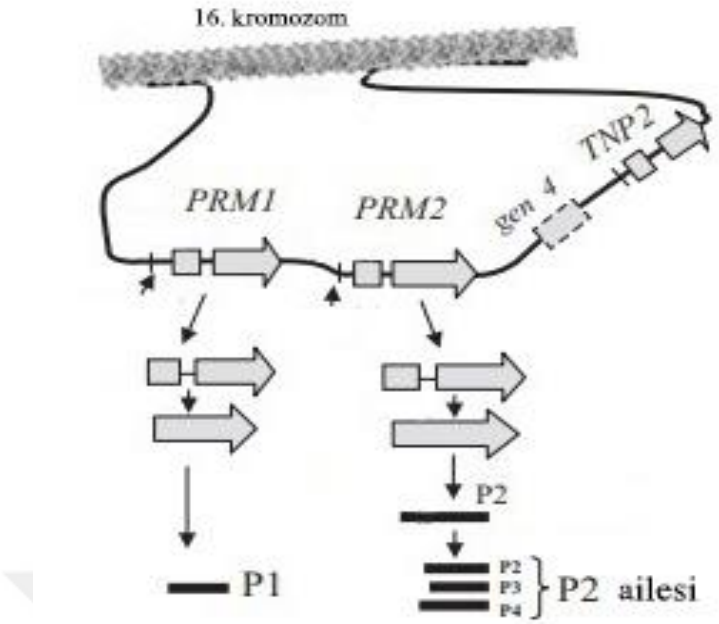
germ hücrelerinde ifadesinin tespit edilmemesine karşılık yuvarlak spermatidlerde tespit edilmesi, SHIP1 ve SWI/SNF gibi, bu düşünceyi desteklemektedir (Choi ve ark 2008, Dhar ve ark 2012).

En sonunda geçiş proteinleri protaminlerle yer değiştirerek üst düzey kromatin yapı kazandırılmış olur. Protaminlerle yer değiştiren geçiş proteinlerinin ubikitinlenerek proteozomlarda yıkıma uğradığı öngörülmektedir (Rathke ve ark 2014). Sperm kromatininin adım adım gerçekleşmesinde temel moleküler mekanizmalar açığa çıkarılmış olmakla beraber hala tam olarak açıklık kazanmayı bekleyen yönleri bulunmaktadır. Ancak sperm genomunun %85-90'ının protaminlerle yer değiştirerek kromatininin yeniden düzenlendiği bu çarpıcı sürecin büyük bir düzen içinde aşama aşama gerçekleştiği ve sıkı kontrol altında yürüdüğü aşikardır.

1.3. Protaminler

Protaminler, geç spermatidler ve olgun sperm hücrelerinde bulunan ana nükleer proteinlerdir. Protaminler, insan sperminde geç spermiogenez sürecinde meydana gelen bir değişiklikle sperm çekirdek histonlarının yaklaşık %85-90'ını oluşturur. Sperm histonlarının protaminlerle değiştirilmesinin, sperm motilitesini artırma, sperm DNA'sının korunması ve erkek genomunun resetlenmesi veya işaretlenmesi gibi faydalar sağladığı düşünülmektedir (Lachaise ve Feyereisen 1976).

İnsan sperminde iki farklı türde protamin proteini bulunur; P1 ve P2. P1 proteini 50 amino asitten oluşur ve arginin ve sistein açısından zengindir. P2 proteininin ise değişen uzunluklara sahip üç izoformu bulunur. P2, tek bir genden ifade edilmekle birlikte amino terminus bölünmesi nedeniyle uzunlukları değişebilir. Bu bölünme sonucunda, öncü proteinden türeyen P2, 103 amino asitten 53 amino aside indirgenir (Şekil 1.20) (Zquez ve ark 2008).



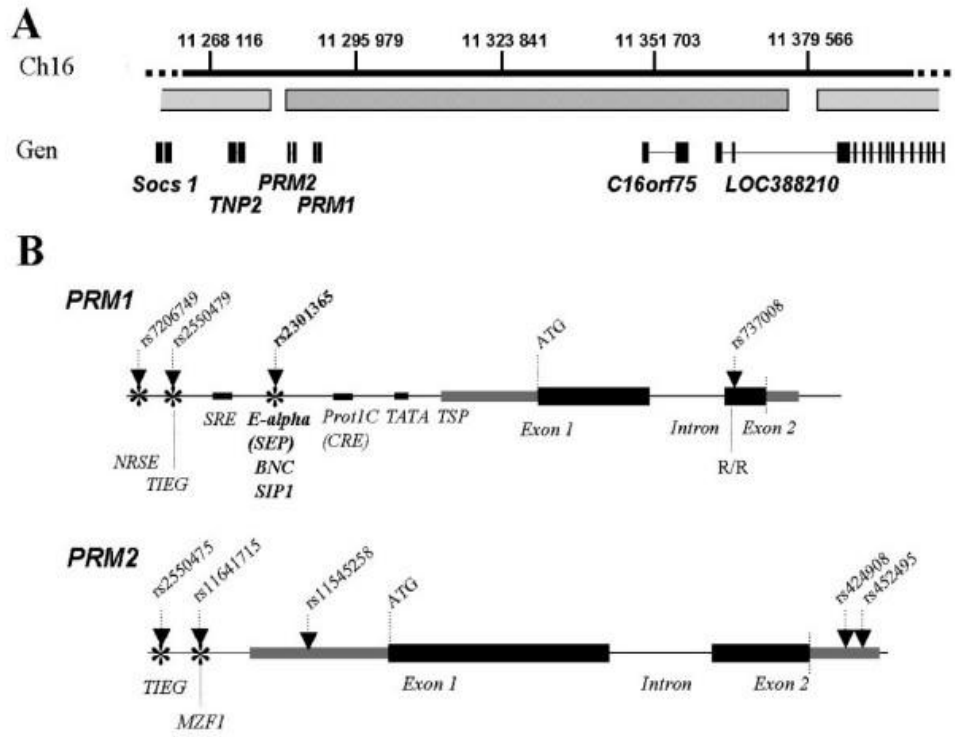
Şekil 1.20. *Protamin* genlerinin (*PRM1* ve *PRM2*) genomik transkripsiyon, translasyon ve işleme süreçlerinin şematik gösterimi (Oliva 2006).

1.3.1. *Protamin 1* ve *2* Genleri

İnsanlarda *Protamin 1* ve *2* (sırasıyla *PRM1* ve *PRM2*) genleri kromozom 16'da lokalize olup her iki gen de 2 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 1.21). Spermatogenez sürecinde, *Protamin 1* ve *2* genleri, ilk olarak spermatositlerde ve daha sonra spermatidlerde ifade edilir. Protamin proteinlerinin histonlara göre daha az sayıda amino asitten oluşması ve yüksek arginin içermesi, sperm hücrelerinin genetik materyalini yoğunlaştırmalarına yardımcı olur (Oliva 2006).

1.3.2. Protamin 1 ve 2 Proteinleri

Protamin 1 ve 2 proteinleri arjinin ve sisteince zengin düşük molekül ağırlığında yüksek derecede bazik proteinlerdir. Protamin 1 ve 2 proteinleri benzer yapısal özelliklere sahip olup aralar bazı farklılıklar da vardır. Protamin 2 ailesi (P2, P3 ve P4), tek bir genden kodlanmakla beraber, proteolize uğrayarak N ucunda 1-4 rezidü uzunluk farkı olacak şekilde üretilir (Oliva 2006).



Şekil 1.21.*PRM1* ve *PRM2* gen yapılarının şematize edilerek gösterimi. Her iki gen de kromozom 16'da lokalizedir (Zquez ve ark 2008).

Protamin 1'in DNA bağlanma özelliğinin, *Protamin 2*'den daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, sperm hücrelerinin nükleer yeniden düzenlenmesinde *Protamin 1*'in daha önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Protaminlerin benzer yapıları, onların aynı işlevi yerine getirmesini sağlar ve her iki protein de spermhücrelerinin genetik materyalini yoğun bir şekilde paketleme sürecinde önemli bir rol oynar (Oliva 2006).

1.4. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, 12 aylık düzenli, korunmasız ilişkiden sonra gebe kalamama durumunu ifade eder ve tüm çiftlerin yaklaşık %15 ila %20'sini etkiler. İnfertilite ilgili yapılan araştırmalar, erkek infertilitesinin önemli bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, çiftlerin birlikte yaşamaları nedeniyle hem erkek hem de kadın eşler için klinik sorun haline gelmektedir. Erkeklerdeki üreme yetmezliği veya disfonksiyonuyla ilgili faktörlerin belirlenmesi, doğru tanı ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Organization 2021, Vander Borght ve Wyns 2018).

1.4.1. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri

İnfertilite vakalarda sıklıkla erkek üreme disfonksiyonu ve yetmezliğinin rol oynadığı bilinmektedir. Erkek infertilitesine yol açan nedenlerin birçoğunun sonradan oluştuğu ve bazılarını genetik kökenli olduğu bilinmektedir.

Erkek infertilitesinin teşhisi için, bir dizi test ve tıbbi muayene gereklidir. Semen analizi, hormon testleri ve genetik testler gibi testler, infertilite sebebini belirlemeye yardımcı olabilir. Infertilite tedavisi, infertilite sebebine ve ciddiyetine bağlı olarak değişebilir. Bazı durumlarda, yaşam tarzı değişiklikleri veya ilaç tedavileri etkili olabilirken, diğer durumlarda tüp bebek gibi yardımcı üreme teknolojilerine başvurmak gerekebilir.

Erkek infertilitesi nedenleri;

- Genetik problemler,
- Hormonal dengesizlikler,
- Fiziksel ve Çevresel faktörler, olmak üzere üç farklı grupta incelenebilir.

Genetik Faktörler

Genetik faktör, erkek üreme sağlığını etkileyen önemli etkenlerdir ve infertilite problemlerinin teşhis ve tedavisinde dikkate alınması gereken noktalardır (Koşar ve Özçelik 2007).

Erkek infertilitesi ile ilişkili olarak bilinen genetik faktörler 3 grupta ele alınabilir;

- Kromozomal Anomaliler
- Mikrodelesyonlar
- Moleküler Bozukluklar

Kromozom anomalileri, infertil erkeklerde normal populasyona kıyasla (%0.5'e karşılık) daha yüksek bir oranda (%5.8) görülmektedir. Bu durum, genetik faktörlerin erkek infertilitesinde önemli bir rol oynadığını ve kromozom anomalilerinin üreme sağlığını etkileyebileceğini göstermektedir (Düzcan ve ark 2003).İnfertil bireylerde, cinsiyet kromozom anomalileri otozomal kromozom anomalilerine göre daha sık görülür. Cinsiyet kromozom anomalileri, infertil vakalarda %4.2 oranında

bulunurken, otozomal kromozom anomalileri ise %1.5 oranında gözlenmektedir (Johnson 1998, Stansfield 1969).

Yapısal kromozom anomalileri, delesyon, inversiyon, dublikasyonu veya translokasyonşeklinde gerçekleşir. Bu anomaliler, kromozomların yapısal bütünlüğünü etkileyerek genetik materyalin düzgün bir şekilde işlev görmesini engelleyebilir. Bu yapısal kromozom anomalileri, erkek infertilite %10'unu oluşturan sebeplerdendir (Van Assche ve ark 1996).

Sayısal kromozomal anomaliler, hücrelerde tüm kromozomların çoklu kopyalarını içeren poliploid hücreler veya bir veya daha fazla kromozomun ilave veya eksik olduğu anoploid hücreler şeklinde sınıflandırılır (Van Assche ve ark 1996). Klinefelter sendromu, miks gonadal disgenezi ve XYY sendromu, bu grup hastalıklara örnek olarak verilebilir. Klinefelter sendromu, en sık görülen cinsiyet kromozom bozukluğudur ve Azospermik vakalarda Klinefelter sendromuna %14 oranında rastlanmaktadır (Koşar ve Özçelik 2007).

Erkek infertilitesine sebep olan bir diğer grup mikrodelesyonlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu delesyonlar farklı uzunlukta olabildiğinden kromozomal ya da moleküler bozukluk sınıfına girmesi konusunda net bir gruplandırma yapılamamaktadır. Azospermik erkeklerin bir kısmında, Y kromozomunun uzun kolunda (Yq11) spermatogenezi düzenleyen bir genomik bölge tanımlanmışve bu bölge azospermi faktör bölgesi (AZF) olarak isimlendirilmiştir. Y kromozomunun bu bölgesindeki delesyonlar, sperm üretimini etkileyerek azospermiye neden olabilmektedir. AZF bölgesi, erkek infertilitesinin genetik kökenli olduğu durumlarda önemli bir rol oynamaktadır (Kent-First ve ark 1999, Tiepolo ve Zuffardi 1976). AZF bölgesinde bulunan genler, sadece spermatogenezle ilişkili olan genlerdir. Bu nedenle, bu bölgedeki delesyonlar, fenotipik bozukluklara neden olmadan izole spermatogenez defektine (şiddetli oligospermi veya azospermiye) yol açabilir. Bugün, Y kromozomunun uzun kolunda, infertil erkeklerde delesyona uğradığı ve her birinin spermatogenezin farklı aşamalarında etkili olduğu gösterilen en az 3 bölge (AZF a, AZF b ve AZF c) bilinmektedir (Kent-First ve ark 1999).

Yine bir diğer mikrodelesyon bölgesi Y kromozomunun p kolunda PAR1 bölgesine yakın lokalize olan SRY gen bölgesidir.SRY özelikle testis gelişiminden

sorumludur. Mayoz bölünme sırasında kusurlu gerçekleşen rekombinasyon sonucu SRY geninin kaybı erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmektedir (Anık ve ark 2013).

Erkek infertilitesine yol açan diğer genetik bozukluklar ise moleküler düzeydeki bozukluklardır. Otozomal resesif geçişli bir konjenital hastalık olan Kistik fibrozis bunlardan birisidir. Hastalık, zarda bulunan bir klor taşıma kanalını kodlayan CFTR genindeki varyasyonlara bağlı olarak gelişir. CFTR genindeki varyasyonlar ejekülatör kanal, seminal vezikül, vas deferens ve epididimisin distal 2/3'ünün oluşumunu etkiler. Bu nedenle, CFTR genindeki varyasyonlar vas deferens agenezisine (vas deferensin gelişmemesi) yol açar. Vas deferens agenezisinde sperm taşıma kanallarının tamamen veya kısmen oluşmamaktadır. Dolayısıyla CFTR genindeki varyasyonlar infertiliteye neden olmaktadır (Hargreave 2000, Quinzii ve Castellani 2000).

Silialı hücrelerin aksonemlerindeki bazı defektleri içeren birçok sendrom tanımlanmıştır. Bu sendromlar arasında Kartagener sendromu ve Usher sendromu, iyi bilinen örneklerdir. Kartagener sendromu, silialı hücrelerin aksonemlerindeki yapısal anormalliklere bağlı olarak solunum yolları ve üreme sistemini etkileyen bir genetik bozukluktur (Rutland ve De Iongh 1990).

Otozomal dominant olarak kalıtılan bazı hastalıklar, infertiliteye neden olabilen belirli etkileri beraberinde getirebilir. Bunlardan biri, kas zayıflığı ve atrofi, katarakt ve endokrinopatiler gibi belirtilerle seyreden Myotonik distrofi olarak bilinen bir hastalıktır. Bu hastalık, 19.kromozomda bulunan bir genin CTG trinükleotid tekrarındaki artış sonucu ortaya çıkar. Myotonik distrofi, sperm kapasitasyonunda defektlere ve akrozom kaybına yol açabilir, dolayısıyla erkek infertilitesine katkıda bulunabilir (Elsawi ve ark 1994).

Erkek infertilitesinde en sık rastlanan bozukluklardan biri Kallman sendromudur. Kallman sendromunda, X kromozomunun uzun kolunda yer alan Ka1 (Xp22.3) genindeki bir varyasyon, hipotalamustan GnRH sekresyonunda bozulmaya neden olmaktadır (Bick ve ark 1992).

Prader-Willi sendromlu hastaların kromozom 15'in kısa kolundaki bir varyasyon veya delesyon (15q11q13) bulunur. Bu varyasyon veya delesyon genellikle hastanın babasından geçer (Shah ve ark 2003).

Hormonal Faktörler

Hormonlar, büyüme faktörleri, reseptörleri ve ilgili sinyal transdüksiyon proteinleri, varyasyonlara uğrayabilir ve hipotalamik pitüiter gonadal aksı etkileyebilir. Bu durum nadir görülen rahatsızlıklar olsa da ciddi erkek infertilite bozukluklarına yol açabilir. Genellikle, bu rahatsızlıklar, endokrin veya humoral regülasyonda rol alan spesifik genlerde meydana gelen varyasyonlar, küçük delesyonlar veya polimorfik genişlemeler nedeniyle ortaya çıkar. Bu genetik değişiklikler, hormonların üretiminde, salınımında veya hedef organlardaki etkilerinde bozulmalara yol açarak üreme fonksiyonlarını etkileyebilir (Koşar ve Özçelik 2007).

GnRH'nın anormal salınımı ve sentezi ayrıca GnRH salınımını takiben FSH ve LH düşük düzeyde salınımının anotomik bir sebep olmaksızın oluşması, idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) olarak adlandırılan bozukluklara yol açar. Bu durumda,spermatogenezis yetersiz hale gelir (Koşar ve Özçelik 2007).

LH ve FSH hormonlar, hipofiz bezinden salgılanır ve doğal olarak inaktif olan LH (luteinizan hormon) üretimine neden olan varyasyonlar genellikle virilizasyon bozukluğuna yol açar. Bu durumda bozulmalara yol açarak üreme fonksiyonlarınn etkileyebilir (Koşar ve Özçelik 2007, Shah ve ark 2003).

Fiziksel ve Çevresel Faktörler

Fiziksel sorunlar, ejakülasyon yollarının tıkanmasına ve sperm üretiminin engellenmesine neden olabilir. Özellikle varikosel olarak bilinen sperm kanallarının genişlemesi, infertilite sorunlarından biri olarak erkeklerin yaklaşık %40'ını etkileyen en yaygın problemlerden biridir. Varikosel, testislerin etrafındaki damarların genişlemesiyle karakterizedir ve bu durum sperm üretimi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir. Sperm kanallarının düzgün bir şekilde çalışmasını engelleyebilir ve sonuç olarak fertilite sorunlarına yol açabilir (Vickers 2017).

Erkekler, çalışma alanlarında infertiliteye öncülük eden çözücüler, insektisitler, yapıştırıcılar, silikonlar ve radyasyon gibi tehlikeli maddelere maruz kalabilmektedir. Birçok endüstriyel iş ve meslek, erkekleri bu potansiyel zararlı maddelere maruz bırakabilir. Örneğin, bazı endüstrilerde kullanılan çözücüler ve insektisitler, spermlerin normal gelişimini etkileyebilir ve üreme sağlığını olumsuz etkileyebilir. Yine yapıştırıcılar ve silikonlar gibi kimyasal maddeler, hormonal

dengenin bozulmasına ve sperm üretiminde azalmaya yol açabilir. Ayrıca, bazı mesleklerde radyasyona maruz kalma riski bulunmaktadır. Radyasyon, sperm hücrelerinin yapısını ve fonksiyonunu etkileyebilir, bu da infertilite riskini artırabilir. Bu nedenle, erkeklerin çalışma ortamlarında bu tür tehlikeli maddelere maruz kalma durumlarına dikkat etmeleri ve gerekli önlemleri almaları önemlidir (Krausz ve Riera-Escamilla 2018, Mustafa ve ark 2019, Rim 2017).

1.4.2. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite, infertil çiftler arasında en sık rastlanan tanılardan biridir. Bu durumda altta yatan pek çok olası neden ileri sürülmüş olmasına rağmen, açıklanamayan infertilite terimi, temel tetkiklerde (sperm analizi, ovulasyon testleri, tubal patolojileri değerlendiren) herhangi bir anormallik tespit edilemeyen olgularda infertilite nedeninin bulunamaması durumunu ifade eder (Medicine 2008).

Açıklanamayan infertilite, yaygınlık açısından %22 ile %28 arasında değişen bir orana sahiptir. Korunmasız geçen 12 aylık süre sonrasında çiftlerin yaklaşık %84'ü, 2 yılın sonunda ise %92'si gebelik elde edebilmektedir. Rutin fertilite araştırmalarında yer alan testler, üreme sisteminin değerlendirilmesinde kapsayıcı olmaktan uzak ve küçük anomalileri değerlendirmede yetersiz kalabilmektedir. Açıklanamayan infertilite etiyolojisinde, başta immünolojik, genetik ve endokrinolojik faktörler olmak üzere pek çok farklı sebep öne sürülmüştür. Açıklanamayan infertilite vakaları incelenirken, bu gerçekler göz önünde bulundurulmalı ve tanı konması aşamasında gerçek açıklanamayan infertilite durumları dikkate alınmalıdır (Brandes ve ark 2010, Collins ve Crosignani 1992).

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.1.Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	**Marka**
Güvenlik Kabini Sınıf II	Metisafe
Thermal Cycler	Bio-Rad
Real-time PCR	Roche
Santrifüj	Nüve
Mikrosantrifüj (Soğutmalı)	Thermo Scientific
Otomatik Pipet	Thermo Scientific
Nanodrop Spektrofotometri	Thermo Scientific
-80 Derin Dondurucu	Haier
-20 Derin Dondurucu	Arçelik
+4 Buzdolabı	Uğur

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Saf Malzemeler

Çizelge 2.2.Çalışmada kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler ile markaları

Kimyasal/Sarf Malzeme	**Marka**
Dulbacco'nın fosfat tamponlu su (DPBS)	Gibco
Kloroform	Merck
Ethanol	Merck
2-propanol	Merck
SYBR Green Qpcr Master Mix	Thermo Scientific
cDNA Sentez Kiti	Bio-Rad
15 ml falkon tüp	Kırgen
Nükleazfree	Multicell
TRidity G	Hibrigen
96- kuyucuk plate	Costar Steril

2.2. Hasta Seçimi ve Örneklerin Alınması

2.2.1. Hasta Seçimi

Çalışmaya Selçuk Üniversitesi Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi, Androloji Labaratuarı'na rutin semen analizi için başvuran ve onam formu alınan 17-45 yaş aralığında toplam 102 erkek birey dahil edildi. Bireylerin anamnezleri alınarak fertilite durumları değerlendirildi. Bireylerin spermiyogramları, Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010) kriterlerine göre değerlendirildi (Çizelge 2.3-2.5). Spermiyogram sonuçlarına göre, 56 (%27.3) birey normozoopermi, 26 (%12.7) birey oligozoospermi, 20 (%19,6) birey ise şiddetli oligozoospermi olarak belirlendi. Tüm bu değerlendirmeler sonucu bireyler fertilite durumuna göre 3 gruba ayrıldı. Fertil grup: erkek infertilitesi olmayan ve semen değişkenleri normal olan 13 bireyden oluştu. İnfertil grup: erkek infertilitesi olan ve semen değişkenleri normal olmayan 28 bireyi içerdi. Açıklanamayan İnfertilite: erkek infertilitesi olan ve semen değişkenleri normal olan 18 bireyden oluştu. Testiküler tümör, klinik varikosel, orşid ve azospermiye sahip bireyler çalışmaya dahil edilmedi.

2.2.2. Örneklerin Alınması ve Semen Analizi

Semen örnekleri 2-7 günlük cinsel perhiz sonrası alındı ve 37 °C'de 30-60 dakika boyunca likefaksiyon için etüvde bırakıldı. Likefaksiyon sonrası semen örnekleri makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi. Makroskopik analizde, görünüm, viskozite, likefaksiyon süresi, renk, hacim ve pH değerlendildi. Mikroskopik analizde sperm konsantrasyonu ve motilite özellikleri makler sayım kamerası ile belirlendi. Sperm motilitesi, total sperm motilitesi (WHO sınıf A+B+C), progresif sperm motilitesi (WHO sınıf A+B) ve hızlı progresif sperm motilitesi (WHO sınıf A) olarak sınıflandırıldı.

WHO 2010 kriterlerine göre değerlendirilen semen parametreleri, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, total sperm motilitesi, progresif sperm motilitesi ve hızlı progresif sperm motilitesini içerdi (Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4). Sperm konsantrasyonuna göre semen değişkenleri üç gruba ayrıldı; Normozoospermi: sperm konsantrasyonu: ≥15 milyon/ml, Oligozoospermi: 5-15 milyon/ml, Şiddetli Oligozoospermi: <5 milyon/ml. Total sperm sayısına göre: ≥39 milyon ve <39 milyon, total sperm motilitesine göre ≥%40 ve <%40, progresif sperm motilitesine göre ≥%32 ve <%32 olmak üzere gruplara ayrıldı.

Çizelge 2.3. WHO Kriterlerine Göre Semen Parametrelerinin Alt Referans Değerleri

Parametreler	**En düşük Referans Değerleri**
Semen volümü (ml)	1.5(1.4-1.7)
Total sperm sayısı (106)	39(33-46)
Sperm konsantrasyonu (106 / ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (106 per ml)	<1.0
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	>20

Çizelge 2.4. Semen Değişkenlerinin Terminolojisi

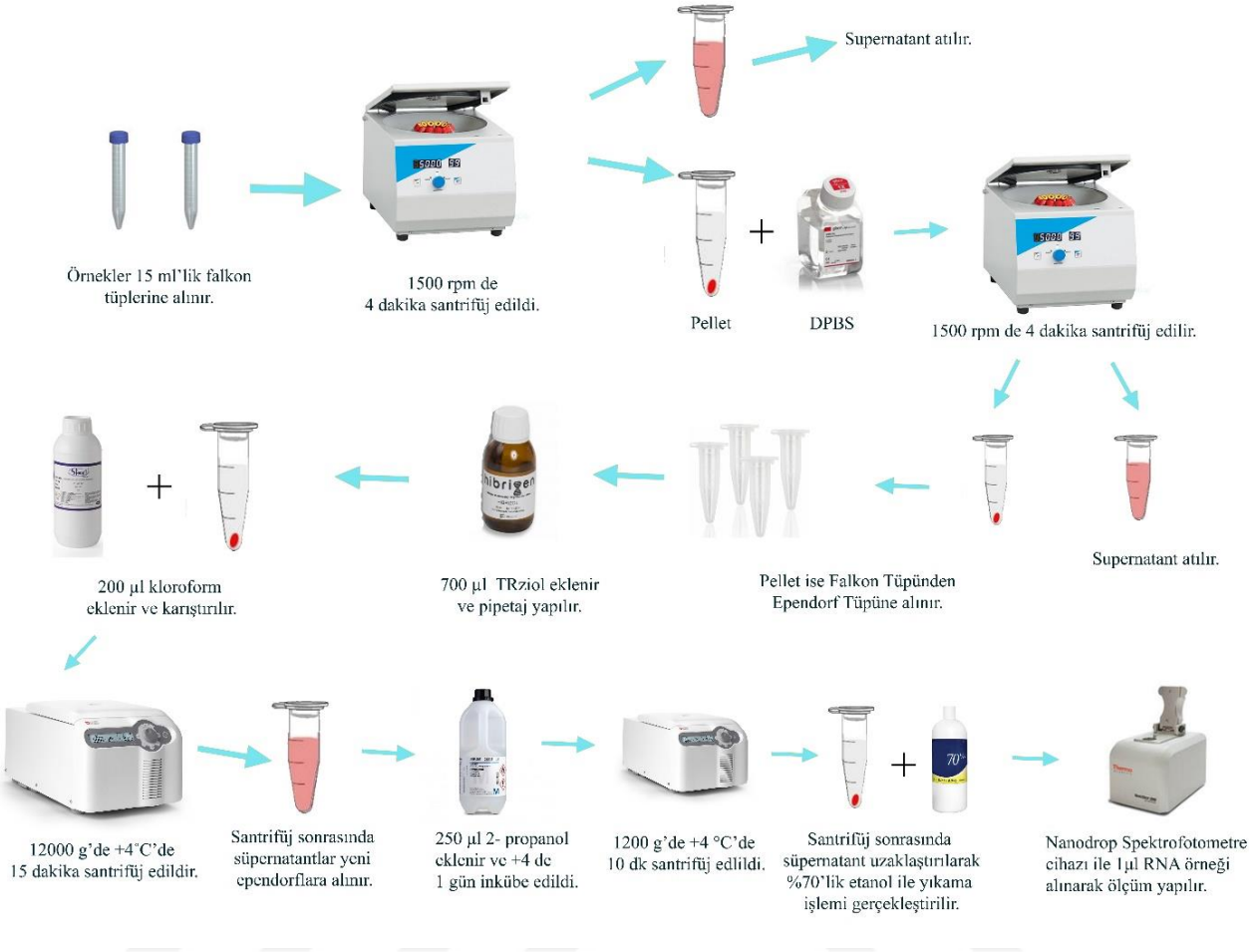
Terim	**Anlamı**
Normozoospermi	Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat
Oligozoospermi	Referans değerden düşük sperm konsantrasyonu
Asthenozoospermi	Motilite için referans değerden daha düşük değer
Teratozoospermi	Morfoloji için referans değerden daha düşük değer
Oligoasthenoteratozoospermi	Her üç değişkenin de bozukluğuna işaret eder
Azoospermi	Ejakülatta hiç spermatozoa bulunmaması
Aspermi	Hiç ejakülat elde edilememesi

2.2.3. Gen İfade Analizi

Çalışmada spermiogenez sürecinde kromatin yeniden modellenmesinde iş gören *PRM1* ve *PRM2* gen ifadesi qPCR yöntemi ile araştırıldı. Bunun için öncelikle sperm örneklerinden RNA eldesi ve cDNA çevirimi gerçekleştirildi. Daha sonra hedef genlerin gen ifade düzeyleri qPCR yöntemi ile belirlendi.

Total RNA İzolasyonu

Toplanan hasta semen örneklerini 1500 rpm de 4 dakika santrifüj edilmek üzere steril 15 ml'lik falkon tüplere alındı. Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırılarak pelletin yıkamasının gerçekleşmesi için PBS eklendi. Daha sonra tekrar 1500 rpm de 4 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellete 1 ml Trizol eklendi, pipetaj yapılarak pellet ependorf tüpe aktarıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen her bir örneğin üzerine 200 µl kloroform eklendi, 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinin sonrasında soğutmalı santrifüjde 12000 g'de +4˚C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatantlar yeni ependorflara alındı, üzerlerine 250 µl 2-propanol eklendi ve +4˚C'de 30 dakika edildi. İnkübasyon sonrası 12000 g'de +4˚C'de 10 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi için santrifüjden alınan her bir tüpteki süpernatanta %70'lik etanol eklenerek tekrar 12000 g'de +4˚C'de 5 dk santrifüj edildi. Her bir tüpteki supernatant atıldı ve RNA pelletleri kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletlerin üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su eklenerek çözdürüldü. İzolasyonu tamamlanan hasta semen örnekleri total RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi için Nanodrop spektrofotometre cihazı ile 1µl RNA örneği alınarak ölçüm yapıldı ve her örnek için bu işlem tekrar edilerek RNA konsantrasyonları ng/µl olarak elde edildi. Deney akışında gerçekleştirilen basamaklar Şekil 2.1'de görsel olarak da özetlenmiştir. cDNA sentezi için kullanılan kitin protokolüne uygun olarak 1 µg RNA örneği kullanıldı ve kalan örnekler -80˚C'de muhafaza edildi.



Şekil 2.1. Total RNA izolasyonu deney aşamaları

cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi, Bio-Rad iScript™ cDNA sentez kiti (Katolog no: 1708891) kullanılarak gerçekleştirildi. Tek adımda gerçekleştirilen sentez sırasında bütün kimyasallar çözdürüldükten sonra her tüp içerisinde 1 µg RNA, 5x iScript Reaksiyon miks 4 µl, iScript Reverz transkriptaz 1 µl ve son hacim 20 µl'ye nükleaz içermeyen su ile tamamlandı. Tüpler nazikçe karıştırıldı. Reaksiyon karışımları cDNA sentezinin gerçekleşmesi için thermal cycler (Mycycler, Bio-rad) cihazı kullanıldı. 25˚C'de 5 dk ön hazırlık, 46˚C'de 20 dk cDNA'ya çevrim, 95˚C'de 1 dk reverz transkriptaz enzim inaktivasyon adımları ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar qPCR analizlerinde kullanıldı ve kullanım sonrası -20'de muhafaza edildi.

qPCR Analizi

qPCR analizi, "Fast SYBR Green Qpcr Master Mix" (Roche) kullanılarak gerçekleştirildi. *Protamin 1* ve *Protamin 2* hedef genleri ile referans olarak kullanılan *β-aktin* genine ait primerler Çizelge 2.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. *Protamin 1*, *Protamin 2*, *β-aktin* genleri için kullanılan spesifik primer dizileri (İ: İleri primer dizisi G: Geri primer dizisi)

Gen	Primer Dizisi	Referans
Protamin 1	İ: 5'-CCGGAGCAGATATTACCGCC -3'	NCBI primer tasarımı
	G: 5-'CTACATCGCGGTCTGTACCT -3'	
Protamin 2	İ: 5'-GCTGGAAGTTAAGAGAAAGTCAC -3'	(Amjad ve ark 2021)
	F: 5'-CAACATTTATTGACAGGCGG -3'	
B-Aktin	İ: 5-ACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3	(Hsu ve ark 2005)
	G: 5-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3	

Çizelge 2.6. qPCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon bileşeni	**Miktar**
SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	5 µl
Forward primer (50 uM)	0,25 µl
Reverse primer (50 uM)	0,25 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz içermeyen su	2,5 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 2.6'ya göre hazırlanan karışım, Roche Light Cycler 1.2 gerçek zamanlı Real-Time PCR cihazına uygun 96'lık plate'lere konularak yerleştirildi ve denatürasyon, amplifikasyon ve soğuma basamaklarından oluşan qPCR protokolü Çizelge 2.7'de belirtildiği şekilde uygulandı.

Çizelge2.7. qPCR protokolü

Denatürasyon	95˚C' de 10 dk
Amplifikasyon	94˚C' de 30 sn
	60˚C' de 30 sn
	72˚C' de 30 sn
Soğuma	40˚C' de 30 sn

2.2.4. İstatistiksel Analiz

PRM1 ve *PRM2*gen ifade düzeyleri, Ct değerleri üzerinden yorumlandı. Normalizasyon için β-aktin geni kullanıldı, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile semen değişkenlerine ve fertilite durumlarına göre belirlenen gruplar arasında gen ifade düzeyleri karşılaştırıldı (Livak ve Schmittgen 2001).$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin hesaplanması sonucu 2 üzeri kat artış ve azalışları anlamlı ifade değişimleri olarak değerlendirildi. Ayrıca ΔCT değerleri üzerinden *PRM1*/*PRM2* oranları belirlendi. Analiz edilen parametrelerin normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Gen ifade düzeyleri ve *PRM1*/*PRM2* oranları gruplar arasında Kruskal Wallis testi ve ikili grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1. Hastaların Demografik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen bireyler 17-45 yaş aralığında olup ortalama yaşları 29,8 idi. 56 normozoospermi, 26 oligozoospermi ve 20 şiddetli oligozoospermi olduğu belirlenen toplam 102 birey dahil edildi. Bu bireylerden 13'ü fertil, 28'i infertil ve 18'i açıklananmayan infertil idi. Çizelge 3.1'de bireylerin yaş ve semen parametrelerine ait özellikleri verilmiştir. Çizelge 3.2'de semen parametrelerine göre değişkenlerin ve fertilite durumunun dağılımı görülmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Bireylerin Yaş ve Semen Parametreleri

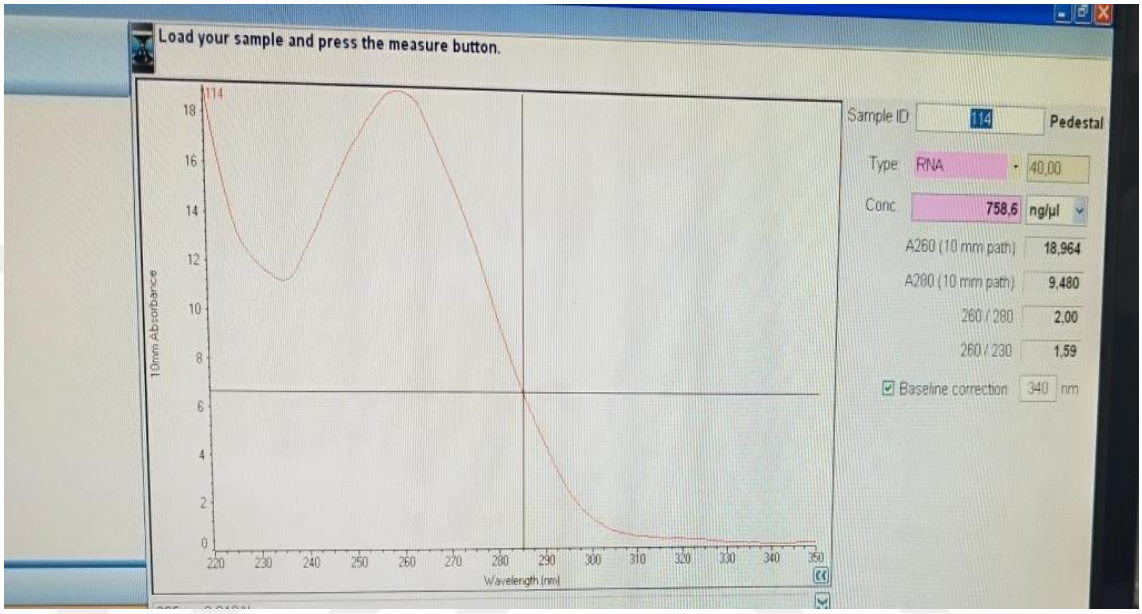
Değişken	**N**	**Mean ± SD**	**Ortalama**
Yaş (yıl)	102	29,8 ± 6,6	29
Semen Volüm (ml)	102	3,8 ± 1,4	3,5
Sperm Konsantrasyonu (ml'de 10^6)	102	23,5 ± 20,8	17,5
Total Sperm Miktarı (ejakulatta 10^6)	102	86,1 ± 86,5	60
Total Sperm Motilitesi (%)	102	58,6 ± 16,5	61,5
Progresif Sperm Motilitesi (%)	102	46,9 ± 16,5	49
Hızlı Progresif Sperm Motilitesi (%)	102	7,3 ± 5,9	6

Çizelge 3.2. Semen Parametrelerine göre Değişkenlerin ve Fertilite Durumunun Dağılımı

Değişken	**N**	**Yüzde %**
Normozoospermi	56	27,3
Oligozoospermi	26	12,7
Siddetli Oligozoospermi	20	19,6
Total Sperm Motilitesi ≥%40	92	44,9
Total Sperm Motilitesi <%40	10	4,9
Progresif Sperm Motilitesi ≥%32	85	41,5
Progresif Sperm Motilitesi <%32	17	8,3
Fertilite	13	6,3
İnfertilite	28	13,7
Açıklamayan İnfertilite	18	8,8

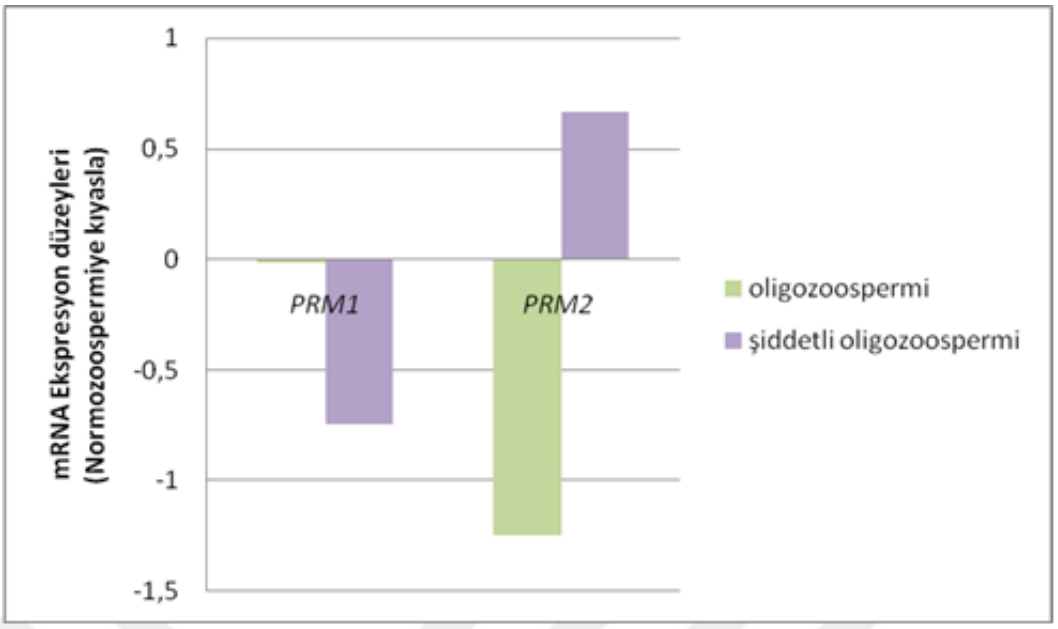
3.2. Gen İfade Analizinin Sonuçları

Hastalardan alınan sperm örneklerinden total RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA'ların kantitatif ve kalitatif analizleri spektrofotometrik olarak Thermoscientific Nano-drop cihazında ölçüldü. Konsantrasyonu ve saflığı uygun olmayan örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Aşağıda çalışmaya alınan bir hastaya ait nanodrop analiz sonucu gösterilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmaya alınan bir hastaya ait nanodrop ölçüm sonucu

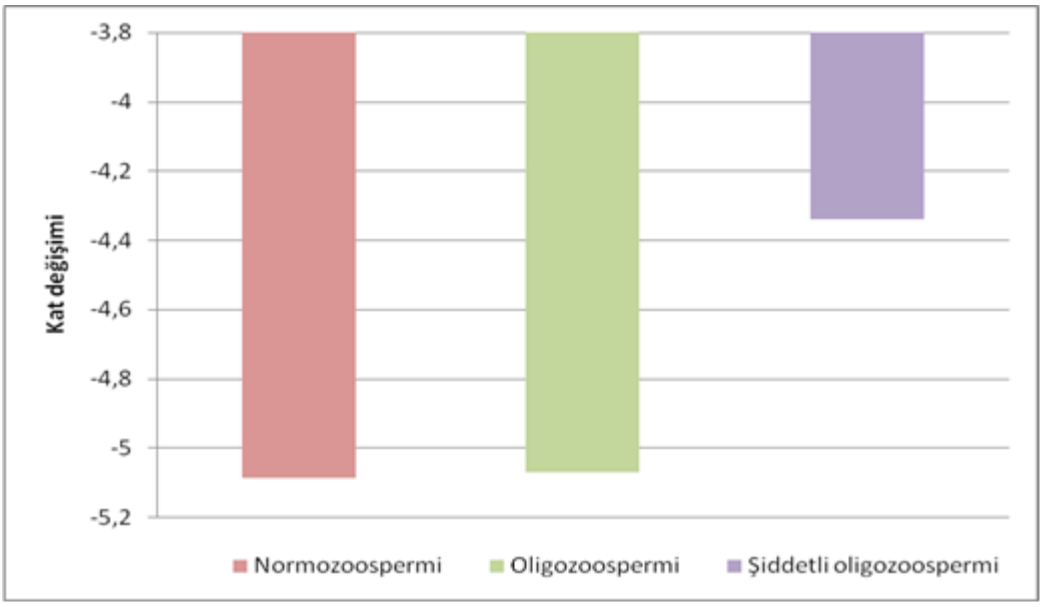
Deney grubumuzdaki oligozoospermi ve şiddetli oligozoospermi hastalarının normospermi grubu hastalara göre *PRM1* ve *PRM2* gen ifade düzeyleri aşağıdaki Çizelge 3.3' de gösterilmiştir. *PRM1* geninin ifade düzeyi normozoospermi grubuna göre oligozoospermi grubunda 0,013 kat azalırken, şiddetli oligozoospermi grubunda ise 1,35 kat azalmıştır. *PRM2* geninin normozoospermi grubuna göre ifade düzeyi oligozoospermi grubunda 0,074 kat azalırken, şiddetli oligozoospermi grubunda ise 0,67 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Normozoospermi grubuna kıyasla oligozoospermi ve şiddetli oligozoospermi gruplarında *PRM1* ve *PRM2* genlerinin ifade düzeyleri. Oligospermi grubunda *PRM1* gen ifade değişikliği sıfıra yakın olduğu için grafikte gösterilememiştir.

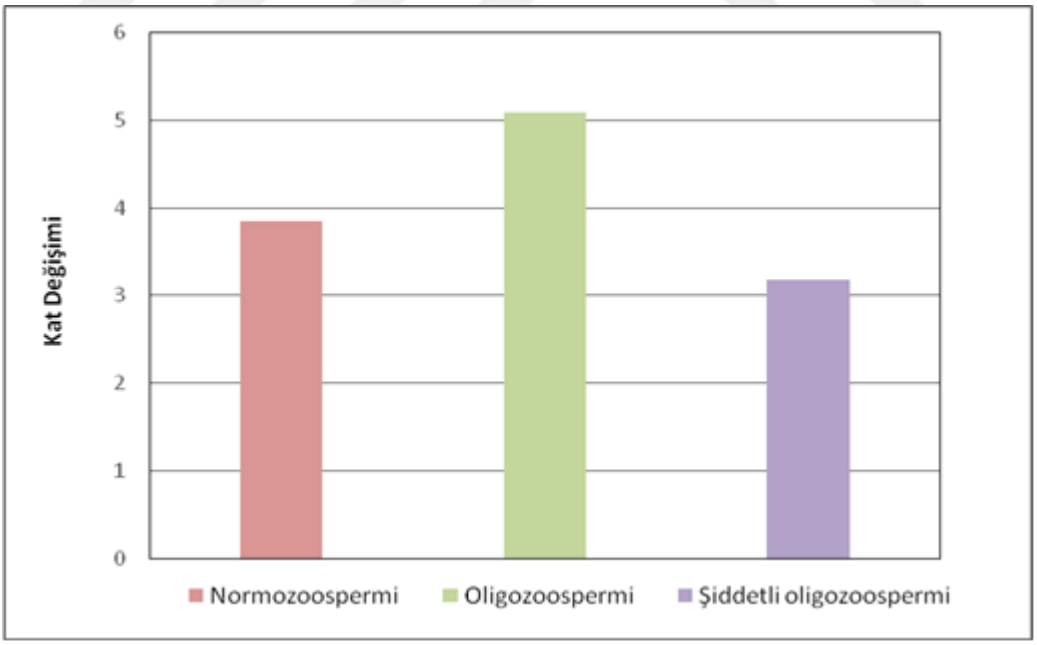
3.3. *PRM1 ve PRM2* Gen İfadelerinin Normalizasyon Sonuçları

Deney grubumuzdaki oligozoospermi, şiddetli oligozoo ve normozoospermi bireylerin *PRM1* ve *PRM2* genlerinin ifade düzeylerine qPCR yöntemi ile analiz edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak, β-aktine göre deney grubundaki oligozoospermi, şiddetli oligozoospermi ve normozoospermi bireylerinin *PRM1* ve *PRM2* gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar hesaplandı. Deney grubundaki oligozoospermi, şiddetli oligozoospermi ve normozoospermi bireylerin *β-aktin* genine göre *PRM1* gen ifade düzeylerinde, sırasıyla 5.08, 5.07 ve 4.33 kat azalış görüldü (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Normozoospermi, oligozoospermi ve şiddetli oligozoospermi gruplarında *PRM1* geninin ΔCT değerleri (*β-aktin'*e göre normalize edilmiştir).

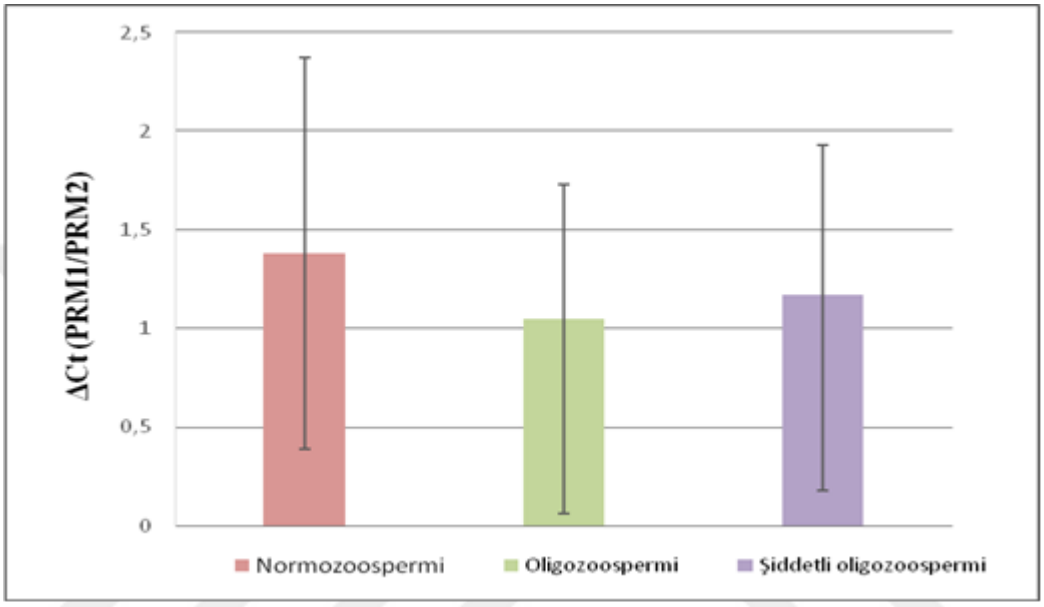
Deney grubundaki oligozoospermi, şiddetli oligozoospermi ve normozoospermi bireylerin *β-aktin*genine göre *PRM2* gen ifade düzeylerinin sırasıyla 3.85, 5.09 ve 3.18 kat artışı kaydedildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Normozoospermi, oligozoospermi ve şiddetli oligozoospermi gruplarında *PRM2* geninin ΔCT değerleri (*β-aktin'*e göre normalize edilmiştir).

3.4. *PRM1/PRM2* Gen İfadelerinin Normalizasyonu Sonuçları

Çalışmamıza dahil edilen oligozoospermi, şiddetli oligozoospermi ve normozoospermi bireylerin *β-aktin*geni ile normalize edilerek elde edilen ΔCt değerlerine göre *PRM1*/*PRM2* oranları belirlendi. Oligozoospermi, şiddetli oligozoospermi ve normozoospermi bireylerde *PRM1*/*PRM2* oranları sırasıyla 1.38;, 1.05 ve 1.17 olarak belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Normozoospermi, oligozoospermi ve şiddetli oligozoospermi gruplarında sperm $\Delta Ct_{PRM1/PRM2}$ oranları ortalama±standart sapma değerleri ile birlikte gösterilmiştir.

3.5. *PRM1* ve *PRM2* Gen İfadesinin ve *PRM1/PRM2* oranlarının Spermiyogram Parametreleriyle İlişkisi

Semen değişkenlerine göre oluşturulan gruplar arasında *PRM1* ve *PRM2* gen ifade düzeyleri CT ve ΔCT değerleri ve $\Delta Ct_{PRM1/PRM2}$ oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3.*PRM1* ve *PRM2*gen ifade düzeyleri ile *PRM1*/*PRM2* oranlarının semen parametreleri üzerine etkileri

	N	PRM1	PRM2	delta_CT_PRM1	delta_CT_PRM2	delta_CT_PRM1/PRM2
	Mean ± SD (Median)					
Sperm Konsantrasyonu						
≥ 15 milyon/ml	56	19,1 ± 4,03 (17,6)	28,1 ± 0,9 (28,5)	-5,0 ± 3,5 (-6,01)	4,05 ± 2,8 (4,2)	1,4 ± 0,9 (1,3)
5-15 milyon/ml	26	18,8 ± 4,5 (17,6)	28,5 ± 1,7 (28,5)	-4,6 ± 3,3 (-5,4)	4,9 ± 3,4 (5,8)	1,0 ± 0,6 (0,9)
< 5 milyon/ml	20	20,2 ± 4,9 (19,6)	28,2 ± 0,9 (28,5)	-4,5 ± 3,6 (-5,8)	3,5 ± 3,0 (4,0)	1,3 ± 0,7 (1,2)
p-Value		0,601	0,654	0,777	0,063	0,120
Total Sperm Sayısı						
≥ 39 milyon	64	18,9 ± 3,9 (17,6)	28,3 ± 1,2 (28,5)	-5,1 ± 3,4 (-5,9)	4,2 ± 2,8 (4,5)	1,4 ± 0,9 (1,3)
< 39 milyon	38	19,9 ± 4,8 (18,7)	28,2 ± 1,07 (28,5)	-4,3 ± 3,6 (-5,8)	4,0 ± 3,3 (4,7)	1,1 ± 0,6 (1,09)
p-Value		0,434	0,547	0,301	0,830	0,205
Total Sperm Motilitesi						
≥ %40	92	19,4 ± 4,3 (18,2)	28,3 ± 1,1 (28,5)	-4,7 ± 3,5 (-5,8)	4,1 ± 3,1 (4,5)	1,3 ± 0,8 (1,2)
< %40	10	17,6 ± 4,1 (16,1)	27,9 ± 0,7 (27,8)	-5,7 ± 2,8 (-6,9)	4,4 ± 2,4 (5,3)	1,3 ± 0,8 (1,2)
p-Value		0,123	0,268	0,311	0,500	0,946
Progresif Sperm Motilitesi						
≥ %32	85	19,4 ± 4,2 (18,2)	28,3 ± 1,2 (28,5)	-4,8 ± 3,5 (-5,9)	4,0 ± 3,2 (4,4)	1,3 ± 0,8 (1,2)
< %32	17	18,6 ± 4,8 (16,3)	28,1 ± 0,8 (27,9)	-4,7 ±3,3 (-6,0)	4,7 ± 2,2 (5,5)	1,1 ± 0,7 (1,1)
p-Value		0,241	0,641	0,975	0,234	0,308

Veriler ortalama ± standart sapma, medyan (minimum–maksimum) olarak sunulmuştur.

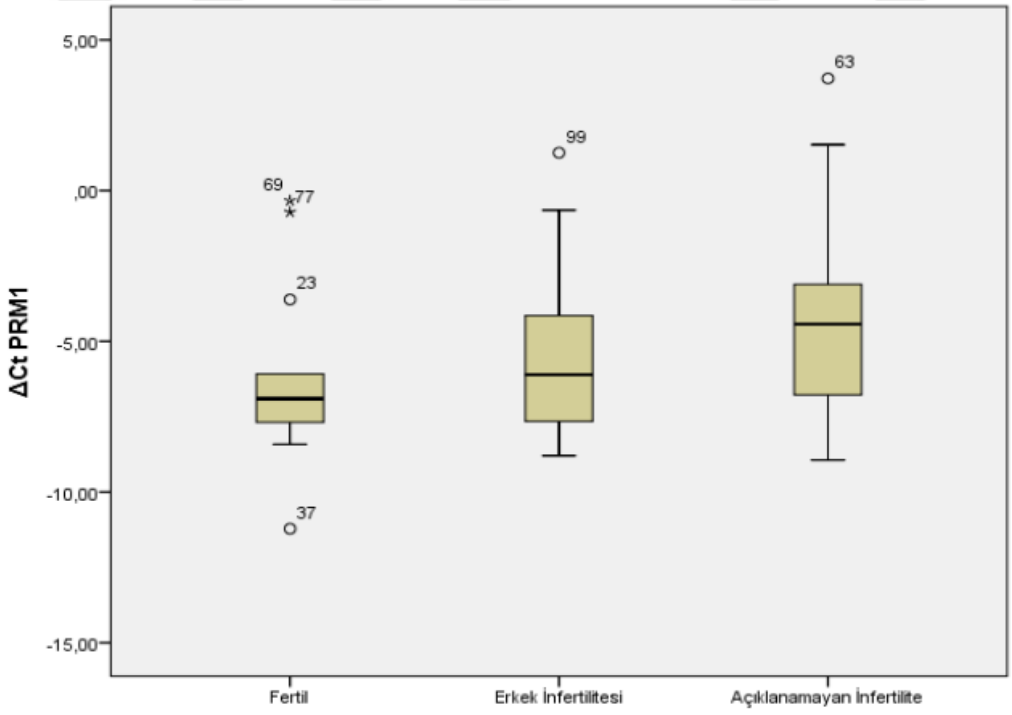
3.6. *PRM1* ve *PRM2* Gen İfadesinin ve *PRM1/PRM2* oranlarının İnfertilite ile İlişkisi

Çalışmamızda bireylerin fertilite durumlarına göre oluşturulan gruplar arasında *PRM1* ve *PRM2* gen ifade düzeylerinin CT ve ΔCT değerlerinin ve $\Delta Ct_{PRM1/PRM2}$ oranlarının farklılıkları karşılaştırıldı. *PRM1* gen ifadesinin fertilite durumları üzerine herhangi bir etkisi tespit edilmedi (Şekil 3.6). *PRM2* gen ifadesinin ve *PRM1*/*PRM2* oranlarının fertil grubu ile hem infertil, hem de açıklanamayan infertil grupları arasında istatistiki olarak anlamlı ilişkisi belirlendi $p<0.05$) (Çizelge 3.4, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). *PRM2* gen ifadesinin infertil ve açıklanamayan infertil gruplarında fertil grubuna göre anlamlı oranda arttığı, *PRM1*/*PRM2* oranlarının ise azaldığı tespit edildi. Erkek infertilitesi ve açıklanamayan infertilite durumları kendi arasında analiz edildiğinde anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Çizelge 3.4).

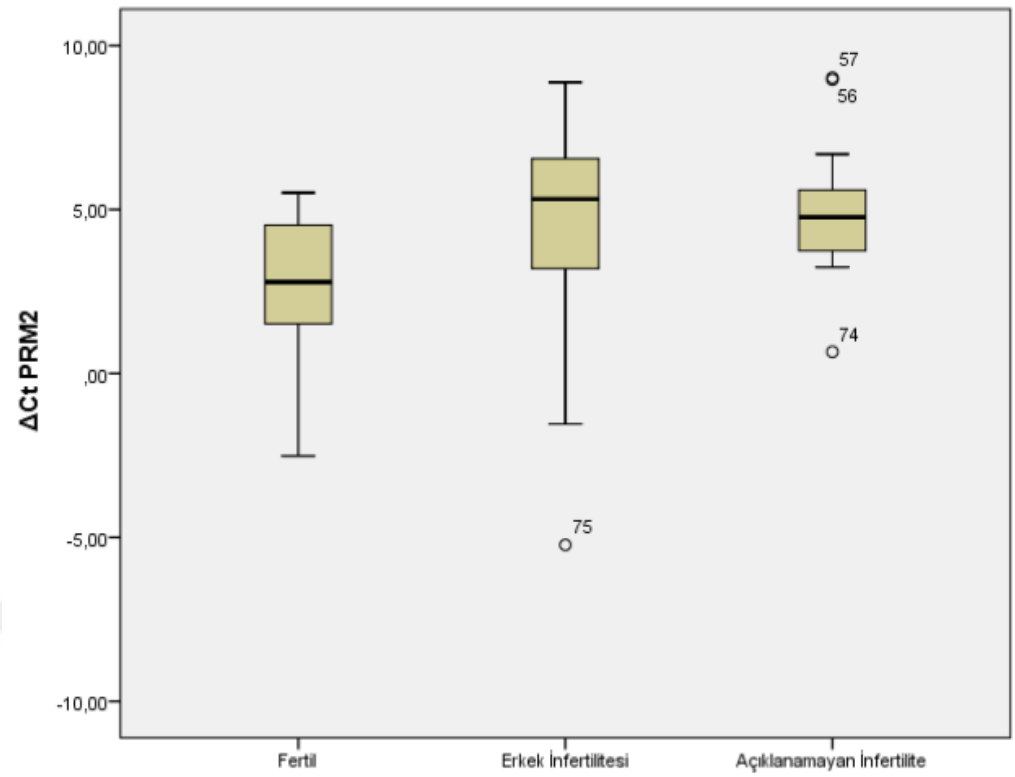
Çizelge 3.4. *PRM1* ve *PRM2* gen ifadesinin ve *PRM1*/*PRM2* oranlarının infertilite durumları ile ilişki analizleri

Fertilite Durumu	N	PRM1	PRM2	ΔCT *PRM1*	ΔCT *PRM2*	ΔCT *PRM1/PRM2*
	Mean ± SD (Median)					
Fertil (1)	13	19,7 ± 4,4 (18,7)	28,2 ± 1,0 (28,6)	-6,2 ± 3,0 (-6,9)	2,2 ± 2,7 (2,7)	2,0 ± 1,2 (1,9)
Erkek İnfertilitesi (2)	28	18,1 ± 4,3 (16,4)	28,2 ± 0,9 (28,3)	-5,4 ± 2,5 (-6,1)	4,5 ± 2,9 (5,3)	1,2 ± 0,6 (1,1)
Açıklanamayan İnfertilite (3)	18	18,9 ± 3,5 (18,2)	28,2 ± 0,9 (28,7)	-4,3 ± 3,2 (-4,4)	4,9 ± 1,9 (4,7)	1,1 ± 0,6 (1,0)
P Değeri	(1-2) (1-3) (2-3)	0,239 0,779 0,150	0,845 0,589 0,901	0,287 0,093 0,280	**0,005*** **0,013*** 0,839	**0,020*** **0,034*** 0,770

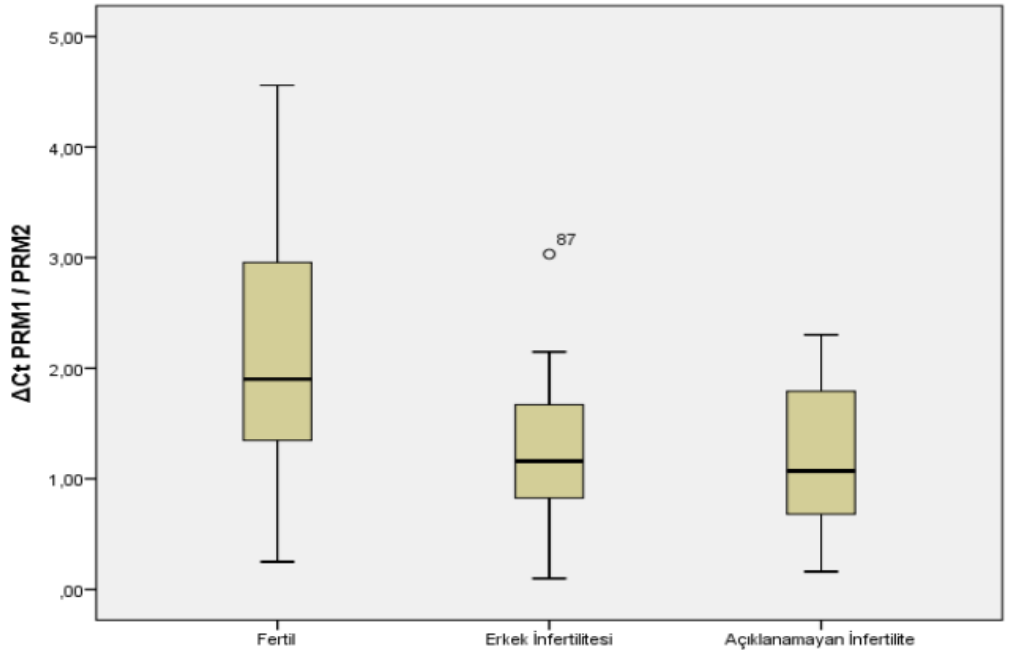
Veriler ortalama ± standart sapma, medyan (minimum – maksimum) olarak sunulmuştur.



Şekil 3.6. Fertilite grupları arasında ΔCt_{PRM1} değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 3.7 Fertilite grupları arasında ΔCt*PRM*2 değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 3.8 Fertilite grupları arasında ΔCt$_{PRM1/PRM2}$ değerlerinin karşılaştırılması

4.TARTIŞMA

Açıklanamayan infertilite günümüzde tüm infertil çiftlerin %25-30'unuı oluşturmaktadır (Gelbaya ve ark 2014, Skakkebæk ve ark 2006). Açıklanamayan infertilitede, altta yatan muhtemel birçok neden olduğu düşünülmektedir. Yardımcı üreme teknolojisi alanında çalışan bilim insanları yoğun bir şekilde biyobelirteçler belirlemeye ve erkek ve dişi bireylerin fertlite potansiyelini belirlemeye yönelik prosedürler tasarlamaya çalışmaktadırlar (Lalancette ve ark 2009, Miller ve ark 2005). Fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi sırasında ovumun rolü ve katkısı iyi anlaşılmış olmakla birlikte, spermin moleküler düzeyde tam işlevi ve rolü belirsizliğini korumaktadır (Bukowska ve ark 2013). Bu nedenle spermatogenez sürecindeki moleküler mekanimaları araştıran çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Spermatogenezin olgunlaşma aşaması olan post mayotik süreci kapsayan spermiogenez süreci birçok morfolojik ve moleküler olayın gerçekleştiği, arka planında çok sayıda faktör ve mekanizmanın iş gördüğü önemli bir aşamadır. Sperme özgü çok çarpıcı bir düzenleme olan kromatin yeniden modellenmesi bu sürecin kritik bir parçasıdır.

Spermiogenez sürecinde kromatin yeniden modellenmesinde histonlarla protaminlerin yerdeğişimi aşamalı olarak gerçekleşmektedir (Carrell ve ark 2007). Testise özgü histon varyantların bazı klasik (kanonik) histonlarla yerdeğiştirmesiyle başlayan süreçte histonların hiperasetilasyonu ile kromatin yapının gevşemesi, eş zamanlı olarak kontrollü geçici DNA kırıklarının oluşturulması ve nükleozomların kromatin yapıdan uzaklaştırılarak yerine geçiş proteinlerinin geçmesi ve son olarak geçiş proteinlerinin protaminler ile yer değiştirerek toroid yapının kazandırılması gerçekleşir.

Protaminlerin sperm DNA'sının minor oluğu ile etkileşmek yoluyla sperm kromatinini stabilize ettiği düşünülmektedir (Cho ve ark 2003). Yüksek düzeyde arjinin içermesi de DNA'ya daha sıkı bağlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca protaminler içerdiği yüksek orandaki sisteinler sayesinde inter ve intra protamin disülfit bağlarının oluşumunu sağlayarak hayli kompakt toroid yapı kazanmasını sağlamaktadır (Carrell ve ark 2007). Böylece sperm çekirdeğinin, yassılaşmış ve uzamış baş morfolojisiyle uyumlu yapı kazanması özgün kromatin organizasyonu ile sağlanmaktadır. Yapılan yüzdürme deneylerinde uzamış başa sahip spermlerin daha

hızlı yüzdüğünün görülmesi sperm motilitesinde morfolojisinin önemine işaret etmektedir (Malo ve ark 2006).

Protaminlerle kromatin organizasyonu aynı zamanda sperm genomunun bütünlüğünün, erkek ve dişi üreme sistemlerinden geçerken, fiziksel ve kimyasal ajanlardan korunması bakımından da önemlidir. Yapılan çalışmalarda düşük protamin düzeyinin normal protamin içeren spermlere kıyasla kimyasal ajanlara daha hassas olduğu da gösterilmiştir (Cho ve ark 2001).

Sperm DNA'sının protaminlerle doğru bir şekilde paketlenmesinin, spermlerin fertilizasyon kabiliyetinin sürdürülmesi için gerekli olduğu da birçok çalışmada gösterilmişitr (Amjad ve ark 2020, Balhorn 2007). Protamin düzeyindeki azalmaya bağlı olarak anormal kromatin organizasyonu akrozomun şeklinde ve organizasyonunda ve spermin genel mimarisinde belirgin değişikliklere neden olmaktadır (Cho ve ark 2003). Farelerde yapılan çalışmalarda protamin proteinlerini kodlayan *PRM*1 ve *PRM2* genlerinin susturulmasının erkek infertilitesine yol açtığı gösterilmiştir (Cho ve ark 2001). İnsanda da azalmış protamin düzeyinin infertilite ve DNA hasarıyla ilişkili olduğu ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyon sonrasında embriyo gelişimini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Morris ve ark 2002). Ayrıca *PRM2* susturulmuş farelerde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrasında, spermlerin yumurtaların çoğunu aktive edebildiği ancak çok azının blastosist aşamasına geçebildiği gösterilmiştir (Cho ve ark 2003).

İnsanda protamin 1 ve 2 proteinlerinin 1/1 oranında olduğu ve bu oranın sperm fonksiyonu için büyük önem taşıdığı düşünülmektedir (Oliva 2006). Yapılan çalışmalarda bu orandaki değişimlerin, 0.8-1.2 standart sapmadan daha büyük olduğu durumlarda infertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Aoki ve ark 2005, Rousseaux ve ark 2011, Rousseaux ve ark 2005, Song ve ark 2011). *PRM* genlerinin transkripsiyonu post mayotik aşamafa sınırlı bir sürede, sadece yuvarlak spermatid aşamasında, gerçekleşmektedir ve daha sonra uzamış spermatidde translasyon edilmek üzere baskılanmış mRNA'lar depolanmaktadır. Değişmiş *PRM* mRNA seviyelerinin değişmiş protein seviyelerinin bir göstergesi olduğu düşünüldüğünden çalışmalarda *PRM* ifadesi mRNA seviyesinde değerlendirilmektedir (Dadoune 2003, Kossel 1896, Zhao ve ark 2010). Bu nedenle literatürdeki diğer çalışmalar ve çalışmamızda mRNA düzeyleri üzerinden analizleri gerçekleştirilmektedir.

Bugüne kadar çeşitli çalışmalarda infertil erkek bireylerin spermlerinde anormal *PRM* gen ifadeleri ve anormal *PRM1*/*PRM2* oranlarının, düşük sperm miktarı, azalmış motilite, azalmış fertilizasyon kabiliyeti ve DNA hasarında artışla ilişkisi rapor edilmiştir (Aoki ve ark 2005, Carrell ve Liu 2001). Bu çalışmalarda *PRM1*/*PRM2* mRNA oranının erkek infertilitesini belirlemede güvenilir bir markır olabileceği öne sürülmüştür (Amjad ve ark 2020, Luke ve ark 2014, Ni ve ark 2014, Rogenhofer ve ark 2013)

Dorostghoal ve arkadaşlarının, 17 infertil ve 10 fertil bireyle yaptıkları çalışma sonuçlarına göre *PRM1* ve *PRM2* gen ifadelerinin infertil bireylerde azaldığı ve *PRM1*/*PRM2* oranının ise önemli düzeyde arttığı rapor edilmiştir (Dorostghoal ve ark 2021).

Rogenhofer ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında açıklanamayan infertil bireylerin, sağlıklı fertil kontroller ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha düşük *PRM1* ve *PRM2* mRNA seviyeleri sergilediğini göstermişlerdir (Rogenhofer ve ark 2013).

Genç ve yaşlı erkek bireylerin *PRM1* ve *PRM2* gen ifadelerinin araştırıldığı bir çalışmada da yaşla beraber *PRM1* gen ifadesinin 2.2 kat ve *PRM2* gen ifadesinin 4.6 kat azaldığı ve bu durumun yaşlı bireylerde *PRM1*/*PRM2* oranlarına önemli düzeyde azalma şeklinde yansıdığı gösterilmiştir (Paoli ve ark 2019). Bu çalışmada yaşla beraber spermatogenezin bozulduğunu, *PRM* gen ifadelerin azaldığını ayrıca bazı miRNA ifadelerinin de, TNP2 ile ilgili miRNA122 gibi, değiştiğine işaret etmişlerdir (Paoli ve ark 2019).

Ishchuk ve arkadaşlarının 19 normozoospermi ve 14 pathozoospermi bireyde yaptıkları çalışmada *PRM* (ΔCt*PRM*) gen ifadeleri ile semen parametreleri arasında fark tespit etmediklerini ancak *PRM* (ΔCt*PRM*) gen ifadeleri ile normozoospermi ve pathozoospermi grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu ve *PRM2*/*PRM1* oranının da pathozoospermi bireylerinde 3.5 kat arttığını göstermişlerdir. Bu artışın *PRM1* genine kıyasla *PRM2* geninin mRNA seviyesinin azalmasına bağlı olduğunu belirtmişlerdir (Ishchuk ve ark 2021).

Steger ve arkadaşlarının 3 grup (kantitatif olarak normal spermatogenezi olan 4 birey, kalitatif olarak normal spermatogenezi olan 24 birey ve bozulmuş spermatogenezi olan 23 birey) ile yaptıkları çalışmalarında infertil bireylerde *PRM1*

gen ifadesinin önemli düzeyde azaldığını belirlemişler ve *PRM1* gen ifadesinin infertilete için kritik olduğunu belirtmişlerdir (Steger ve ark 2003).

Çalışma sonuçlarımıza göre *PRM2* gen ifadesi ile *PRM1/PRM2* oranının olgozoospermi ve şiddetli oligozoospermili bireylerde normozoospermili bireylere kıyasla anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edildi. ß-aktin geni ile normalize edilen ΔCT değerleri dikkate alındığında *PRM1* gen ifade düzeylerinde, normozoospermi, oligozoospermi ve şiddetli oligozoospermi gruplarında önemli azalış görülürken *PRM2* gen ifade düzeylerinde önemli artış kaydedildi. ΔCT değerleri ve $\Delta Ct_{PRM1/PRM2}$ oranlarının semen parametreleriyle herhangi bir ilişkisi tespit edilmedi.

Çalışmamızda Δ*CTPRM2* ve $\Delta Ct_{PRM1/PRM2}$ oranlarının hem erkek infertilitesi hem de açıklanamayan infertiliteyle anlamlı ilişkisi ortaya konuldu. Çalışma sonuçlarımızda özellikle *PRM2* gen ifadesinin değişken özellik gösterdiği belirlendi. Bu durum *PRM1* gen ifadesinin daha stabil olduğu, *PRM2* gen ifadesinin *PRM1*'e göre düzenleyici kontrol mekanizmalarına daha duyarlı olduğunu ileri süren çalışmaları (Amjad ve ark 2021, Lewis ve ark 2003) destekler yöndeydi.

Protamin 2 proteininin yapısında daha az sistein rezidüsü bulunduğundan daha az disülfit çapraz bağlantısı içerdiği gösterilmiştir (Kierszenbaum 2001). Bu durum, teorik olarak DNA'yı hasarlara karşı daha duyarlı hale getirdiği görüşüne yol açmıştır. İnfertil erkeklerde özellikle *protamin 2* gen ifadesindeki değişikliklerin yaygın olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla, insan sperm kromatinlerinin daha az düzenli sıkıştırıldığı ve sıklıkla DNA kırıkları içerebildiği rapor edilmiştir (Carrell ve Liu 2001).

Çalışmamızda, literatürde (Moghbelinejad ve ark 2014) de belirtildiği gibi, *PRM1/PRM2* oranının değiştiren faktör *PRM2* gen ifadesindeki değişim olarak belirlendi. Ancak çalışmaların çoğu *PRM2* gen ifadesindeki değişimin infertil bireylerde azalma yönünde olduğunu rapor ederken (Lewis ve ark 2003) çalışmamızda beklenilenin tersine infertil bireylerde *PRM2* gen ifadesinde artış yönünde değişiklik tespit edildi. Bu durumun toplumumuza özgü olabileceği düşünüldü.

Ayrıca literatürde *PRM* genlerinde özellikle de *PRM2* genindeki bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) araştırıldığı çalışmalar da rapor edilmiştir. Bu

çalışmalarda SNP'lerin gen ifadesini etkileyebildiği dolayısıyla *PRM1/PRM2* oranının bozulmasına, neden olduğu bildirilmiştir (Moghbelinejad ve ark 2015).Elbette sadece bu varyasyonların değil *PRM* genlerinin transkripsiyonel ve translayonel düzenlenmesinde iş gören proteinlerdeki değişimlerden kaynaklı da *PRM* genlerin ifadelerinin etkilenebilir (Carrell ve ark 2007, Hogeveen ve Sassone-Corsi 2006, Kaltenbach ve ark 2000)

Protaminler spermiyogenezin en önemli moleküler oyuncuları olmakla beraber histon-protamin yerdeğişimi süresince adım adım gerçekleşen olaylar zincirinde birçok molekül ve mekanizma yer almaktadır. Bunların herhangi birinde yaşanabilecek aksaklıklar nihai hedef olan protamin bazlı kromatin yapının oluşumunu bozabilir, kromatin organizasyonunda anormalliklere yol açabilir. Bu durum sperm morfolojisi, motilitesi ve fertilizasyon kabiliyetini etkileyebilir. Bu nedenle ilgili mekanizmaların ve moleküler faktörlerin anlaşılması açıklanmayan infertilite durumlarını anlamaya ve yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yardımcı olabilir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız spermiogenezde, sperme özgü çarpıcı bir süreç olan kromatin yeniden modellenme sürecinde önemli rol oynayan Protaminleri kodlayan genlerden *Protamin2* gen ifadesinin ve *PRM1*/*PRM2* gen ifade oranlarının erkek infertilitesi ve açıklanamayan infertiliteyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bulgularımıza göre özellikle *PRM2* gen ifadesi infertilite durumlarında değişiklik göstermekte ve bu da *PRM1*/*PRM2* oranının değişmesine yol açmaktadır. Bu bulgularımız anormal *PRM1*/*PRM2* oranının erkek infertilitesiyle ilişkisini rapor eden çok sayıda çalışmayı destekler yöndedir. Pek çok çalışmada belirtildiği gibi *PRM1*/*PRM2* oranını infertilite durumlarını gösteren bir biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla Türk toplumunda yapılan ilk çalışmadır. Ayrıca çalışmaya dahil edilen birey sayısının da birçok çalışmaya göre yüksek olması çalışmamızı güçlendirmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda infertilite durumunda *PRM2* gen ifadesinin azalması dolayısıyla *PRM1*/*PRM2* oranınının artması yönünde bulgular mevcuttur. Çalışma sonuçlarımızın beklenilenin aksi yönünde çıkması bu farklı durumun toplumumuza özgün olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca farklı çalışmalarda *PRM1*/*PRM2* oranının normal aralığının da değişken şekilde bildirilmesi popülasyonlara özgü genetik farklılıkların etkisi ve erkek infertilitesinde etken diğer faktörlerin varlığından kaynaklanabileceğinden sonuçlar değerlendirirken bu hususlar dikkate alınmalıdır.

Çalışmamıza dahil edilen ve varikosel operasyonu geçirmiş bireylerin operasyon öncesi parametrelerinin olmaması, bireylerin sigara ve alkol kullanımı ve kullanım sürelerinin çok net bilinmemesi grupların heterojenitesine neden olmaktadır. Devamında yapılacak çalışmalarda bu parametrelerin değerlendirilerek hasta gruplarının oluşturulması dikkate alınmalıdır.

Ayrıca bu süreçte rol oynayan diğer faktörlerin ve mekanizmaların da değerlendirileceği kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu moleküler mekanizmaların ve faktörlerin aydınlatılması infertilite için yeni belirteçlerin ortaya konmasına ve de tedavi yaklaşımlarında yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

6.KAYNAKLAR

Abdel Raheem, A. Garaffa, G. Rushwan, N. De Luca, F. Zacharakis, E. Abdel Raheem, T. Freeman, A. Serhal, P. Harper, J. C., & Ralph, D. (2013). Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU international*, *111*(3), 492-499.

Akama, K. Kondo, M. Sato, H., & Nakano, M. (1999). Transition protein 4 from boar late spermatid nuclei is a topological factor that stimulates DNA-relaxing activity of topoisomerase I. *FEBS letters*, *442*(2-3), 189-192.

Alekseev, O. M. Widgren, E. E. Richardson, R. T., & Michael, G. (2005). Association of NASP with HSP90 in mouse spermatogenic cells: stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(4), 2904-2911.

Álvarez-González, L. Burden, F. Doddamani, D. Malinverni, R. Leach, E. Marín-García, C. Marín-Gual, L. Gubern, A. Vara, C., & Paytuví-Gallart, A. (2022). 3D chromatin remodelling in the germ line modulates genome evolutionary plasticity. *Nature communications*, *13*(1), 2608.

Amjad, M. Hussain, S., & Khan, A. R. (2020). Development and Validation of HPLC assay of Lycopene in Different Matrices. *World Journal of Applied Chemistry*, *5*(2), 26-33.

Amjad, S. Mushtaq, S. Rehman, R. Munir, A. Zahid, N., & Siddique, P. Q. R. (2021). Protamine 1/Protamine 2 mRNA ratio in nonobstructive azoospermic patients. *Andrologia*, *53*(3), e13936.

Anık, A. Çatlı, G. Abacı, A., & Böber, E. (2013). 46, XX male disorder of sexual development: a case report. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, *5*(4), 258.

Aoki, V. W. Liu, L., & Carrell, D. T. (2005). Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Human reproduction*, *20*(5), 1298-1306.

Aşcı, R. Çayan, S. Erdemir, F. Orhan, İ. Yaman, Ö. Usta, M. F. Kendirci, M. Ekmekçioğlu, O., & Kadıoğlu, A. (2013). Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. *İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi*.

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology*, *8*(9), 1-8.

Balhorn, R. Cosman, M. Thornton, K. Krishnan, V. Corzett, M. Bench, G. Kramer, C. Hud, N. Allen, M., & Prieto, M. (1999). Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In. Cache River Press.

Bao, Y. Konesky, K. Park, Y. J. Rosu, S. Dyer, P. N. Rangasamy, D. Tremethick, D. J. Laybourn, P. J., & Luger, K. (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A. Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *The EMBO journal*, *23*(16), 3314-3324.

Barckmann, B. Chen, X. Kaiser, S. Jayaramaiah-Raja, S. Rathke, C. Dottermusch-Heidel, C. Fuller, M. T., & Renkawitz-Pohl, R. (2013). Three levels of regulation lead to protamine and Mst77F expression in Drosophila. *Developmental biology*, *377*(1), 33-45.

Behringer, R. R. (1995). The Müllerian inhibitor and mammalian sexual development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *350*(1333), 285-289.

Berruti, G., & Martegani, E. (2005). The deubiquitinating enzyme mUBPy interacts with the sperm-specific molecular chaperone MSJ-1: the relation with the proteasome, acrosome, and centrosome in mouse male germ cells. *Biology of reproduction*, *72*(1), 14-21.

Bick, D. Franco, B. Sherins, R. J. Heye, B. Pike, L. Crawford, J. Maddalena, A. Incerti, B. Pragliola, A., & Meitinger, T. (1992). Intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *New England Journal of Medicine*, *326*(26), 1752-1755.

Brandes, M. Hamilton, C. De Bruin, J. Nelen, W., & Kremer, J. (2010). The relative contribution of IVF to the total ongoing pregnancy rate in a subfertile cohort. *Human reproduction*, *25*(1), 118-126.

Bukowska, D. Kempisty, B. Piotrowska, H. Sosinska, P. Wozna, M. Ciesiolka, S. Antosik, P. Jaskowski, J. Brüssow, K., & Nowicki, M. (2013). The structure and role of mammalian sperm RNA: a review. *Veterinární medicína*, *58*(2).

Cabrero, J. Teruel, M. Carmona, F. Jiménez, R., & Camacho, J. (2007). Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper. *Cytogenetic and Genome Research*, *119*(1-2), 135-142.

Campos, E. I., & Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. *Annual review of genetics*, *43*, 559-599.

Carrell, D. T. Emery, B. R., & Hammoud, S. (2007). Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human reproduction update*, *13*(3), 313-327.

Carrell, D. T., & Liu, L. (2001). Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of Andrology*, *22*(4), 604-610.

Catena, R. Ronfani, L. Sassone-Corsi, P., & Davidson, I. (2006). Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant H1T2 in male haploid spermatids. *Developmental biology*, *296*(1), 231-238.

Chadwick, B. P., & Willard, H. F. (2001). Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Human molecular genetics*, *10*(10), 1101-1113.

Chen, R. E. Winkler, E. S. Case, J. B. Aziati, I. D. Bricker, T. L. Joshi, A. Darling, T. L. Ying, B. Errico, J. M., & Shrihari, S. (2021). In vivo monoclonal antibody efficacy against SARS-CoV-2 variant strains. *Nature*, *596*(7870), 103-108.

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2010). The biology of spermatogenesis: the past, present and future. In (Vol. 365, pp. 1459-1463): The Royal Society.

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, *64*(1), 16-64.

Cho, C. Jung-Ha, H. Willis, W. D. Goulding, E. H. Stein, P. Xu, Z. Schultz, R. M. Hecht, N. B., & Eddy, E. M. (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biology of reproduction*, *69*(1), 211-217.

Cho, C. Willis, W. D. Goulding, E. H. Jung-Ha, H. Choi, Y.-C. Hecht, N. B., & Eddy, E. M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or-2 causes infertility in mice. *Nature genetics*, *28*(1), 82-86.

Choi, E. Han, C. Park, I. Lee, B. Jin, S. Choi, H. Park, Z. Y. Eddy, E. M., & Cho, C. (2008). A novel germ cell-specific protein, SHIP1, forms a complex with chromatin remodeling activity during spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(50), 35283-35294.

Collins, J., & Crosignani, P. (1992). Unexplained infertility: a review of diagnosis, prognosis, treatment efficacy and management. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, *39*(4), 267-275.

Corradi, P. F. Corradi, R. B., & Greene, L. W. (2016). Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male. *Urologic Clinics*, *43*(2), 151-162.

Curry, M. Redding, B., & Watson, P. (1995). Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, *32*(2), 175-181.

Dadoune, J. P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy research and technique*, *61*(1), 56-75.

De Kretser, D. M. (1997). Male infertility. *The Lancet*, *349*(9054), 787-790.

de Kretser, D. M. Loveland, K. L. Meinhardt, A. Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human reproduction*, *13*(suppl_1), 1-8.

De Rooij, D. G., & Grootegoed, J. A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Current opinion in cell biology*, *10*(6), 694-701.

Dhar, K. Dutta, S., & Anwar, M. (2012). Biodegradation of petroleum hydrocarbon by two Aspergillus spp. and two Penicillium spp. isolated from the contaminated soil and water of ship breaking yard. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, *14*(1), 143-148.

Dolinoy, D. C. Weidman, J. R., & Jirtle, R. L. (2007). Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reproductive toxicology*, *23*(3), 297-307.

Dorostghoal, M. Galehdari, H. Hemadi, M., & Abdi, S. (2021). Sperm DNA Damage and Protamine Transcripts Content in Iranian Men with Unexplained Infertility. *Gene, Cell and Tissue*, *8*(4).

Doyen, C. M. Moshkin, Y. M. Chalkley, G. E. Bezstarosti, K. Demmers, J. A. Rathke, C. Renkawitz-Pohl, R., & Verrijzer, C. P. (2013). Subunits of the histone chaperone CAF1 also mediate assembly of protamine-based chromatin. *Cell reports*, *4*(1), 59-65.

Düzcan, F. Atmaca, M. Cetin, G. O., & Bagˇci, H. (2003). Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, *82*(1), 53-56.

Elsawi, M. M. Pryor, J. P. Klufio, G. Barnes, C., & Patton, M. A. (1994). Genital tract function in men with Noonan syndrome. *Journal of medical genetics*, *31*(6), 468-470.

Erdoğan, M. A., & Kuruş, M. (2022). *Güncel Fizyoloji-Histoloji-Embriyoloji Çalışmaları IV*. Akademisyen Kitabevi.

Falender, A. E. Freiman, R. N. Geles, K. G. Lo, K. C. Hwang, K. Lamb, D. J. Morris, P. L. Tjian, R., & Richards, J. S. (2005). Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes & development*, *19*(7), 794-803.

Fawcett, D. W. (1965). The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea pig. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, *67*(3), 279-296.

Gandhi, J. Hernandez, R. J. Chen, A. Smith, N. L. Sheynkin, Y. R. Joshi, G., & Khan, S. A. (2017). Impaired hypothalamic-pituitary-testicular axis activity, spermatogenesis, and sperm function promote infertility in males with lead poisoning. *Zygote*, *25*(2), 103-110.

Gardiner-Garden, M. Ballesteros, M. Gordon, M., & Tam, P. P. (1998). Histone-and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the β-globin domain in human sperm. *Molecular and cellular biology*, *18*(6), 3350-3356.

Gartner, L., & Hiatt, J. (2007a). Cartilage and bone. *Color textbook of histology*, *17*, 131-156.

Gartner, L., & Hiatt, J. (2007b). Female reproductive system. *Color Textbook of Histology. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders*, 485-488.

Gautier, T. Abbott, D. W. Molla, A. Verdel, A. Ausio, J., & Dimitrov, S. (2004). Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO reports*, *5*(7), 715-720.

Ge, S.-Q. Lin, S.-L. Zhao, Z.-H., & Sun, Q.-Y. (2017). Epigenetic dynamics and interplay during spermatogenesis and embryogenesis: implications for male fertility and offspring health. *Oncotarget*, *8*(32), 53804.

Gelbaya, T. A. Potdar, N. Jeve, Y. B., & Nardo, L. G. (2014). Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstetrical & gynecological survey*, *69*(2), 109-115.

Goll, M. G. Kirpekar, F. Maggert, K. A. Yoder, J. A. Hsieh, C.-L. Zhang, X. Golic, K. G. Jacobsen, S. E., & Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, *311*(5759), 395-398.

Govin, J. Caron, C. Escoffier, E. Ferro, M. Kuhn, L. Rousseaux, S. Eddy, E. M. Garin, J., & Khochbin, S. (2006). Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70. 2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(49), 37888-37892.

Govin, J. Caron, C. Lestrat, C. Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *European Journal of Biochemistry*, *271*(17), 3459-3469.

Govin, J. Escoffier, E. Rousseaux, S. Kuhn, L. Ferro, M. Thévenon, J. Catena, R.

Davidson, I. Garin, J., & Khochbin, S. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *The Journal of cell biology*, *176*(3), 283-294.

Greaves, I. K. Rangasamy, D. Devoy, M. Marshall Graves, J. A., & Tremethick, D. J. (2006). The X and Y chromosomes assemble into H2A. Z, containing facultative heterochromatin, following meiosis. *Molecular and cellular biology*, *26*(14), 5394-5405.

Griffin, D. K. Ellis, P. J. Dunmore, B. Bauer, J. Abel, M. H., & Affara, N. A. (2010). Transcriptional Profiling of Luteinizing Hormone Receptor-Deficient Mice Before and after Testosterone Treatment Provides Insight into the Hormonal Control of Postnatal Testicular Development and Leydig Cell Differentiation1. *Biology of reproduction*, *82*(6), 1139-1150. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082099

Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Seminars in cell & developmental biology,

Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological reviews*, *96*(1), 1-17.

Happel, N., & Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, *431*(1-2), 1-12.

Hargreave, T. (2000). Genetic basis of male fertility. *British Medical Bulletin*, *56*(3), 650-671.

Hiller, M. Chen, X. Pringle, M. J. Suchorolski, M. Sancak, Y. Viswanathan, S. Bolival, B. Lin, T.-Y. Marino, S., & Fuller, M. T. (2004). Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program.

Hogeveen, K. N., & Sassone-Corsi, P. (2006). Regulation of gene expression in post-meiotic male germ cells: CREM-signalling pathways and male fertility. *Human Fertility*, *9*(2), 73-79.

Hsu, C.-C. Lin, T.-W. Chang, W.-W. Wu, C.-Y. Lo, W.-H. Wang, P.-H., & Tsai, Y.-C. (2005). Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids. *Gynecologic oncology*, *96*(2), 415-422.

Huhtaniemi, I. (2015). A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis. *Hormones*, *14*(4), 468-478.

Huhtaniemi, I., & Alevizaki, M. (2006). Gonadotrophin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *20*(4), 561-576.

Iguchi, N. Tanaka, H. Yomogida, K., & Nishimune, Y. (2003). Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *International journal of andrology*, *26*(6), 354-365.

Ishchuk, M. Malysheva, O. Komarova, E. Mekina, I. Lesik, E. Gzgzyan, A. Kogan, I. Y., & Baranov, V. (2021). Protamine 1 and 2 mRNA Abundance in Human Spermatozoa and Its Relation to Semen Quality and Sperm DNA Fragmentation among Fertility Clinic Patients. *Russian Journal of Genetics*, *57*, 213-220.

Ishibashi, T. Li, A. Eirín-López, J. M. Zhao, M. Missiaen, K. Abbott, D. W.

Meistrich, M. Hendzel, M. J., & Ausio, J. (2010). H2A. Bbd: an X-chromosome-encoded histone involved in mammalian spermiogenesis. *Nucleic acids research*, *38*(6), 1780-1789.

Jayaramaiah Raja, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2005). Replacement by Drosophila melanogaster protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Molecular and cellular biology*, *25*(14), 6165-6177.

Johnson, M. D. (1998). Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertility and sterility*, *70*(3), 397-411.

Josso, N. di Clemente, N., & Gouédard, L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and cellular endocrinology*, *179*(1-2), 25-32.

Junqueira, L. (2005). Carneiro j. *Mokraćni sustav. U: Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije*, *10*, 399-401.

Junqueira, L., & Carneiro, J. (2009). Temel Histoloji,(Çeviri: Aytekin, Y., Solakoğlu, S.,) 10. *Baskıdan Çeviri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul*, *135*.

Kalaivani, N. P. (2016). *Understanding the mechanisms of histone modifications in vivo* Université de Strasbourg].

Kaltenbach, L. Horner, M. A. Rothman, J. H., & Mango, S. E. (2000). The TBP-like factor CeTLF is required to activate RNA polymerase II transcription during C. elegans embryogenesis. *Molecular cell*, *6*(3), 705-713.

Kent-First, M. Muallem, A. Shultz, J. Pryor, J. Roberts, K. Nolten, W. Meisner, L. Chandley, A. Gouchy, G., & Jorgensen, L. (1999). Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *53*(1), 27-41.

Kierszenbaum, A., & Tres, L. L. (1975). Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *The Journal of cell biology*, *65*(2), 258-270.

Kim, Y.-J. Hwang, I. Tres, L. L. Kierszenbaum, A. L., & Chae, C.-B. (1987). Molecular cloning and differential expression of somatic and testis-specific H2B histone genes during rat spermatogenesis. *Developmental biology*, *124*(1), 23-34.

Kossel, A. (1896). Uber die basischen Stoffen des Zellkerns (The basic substances of the cell nucleus). *Z. Physiol. Chem*, *22*, 178.

Koşar, P., & Özçelik, N. (2007). Erkek infetilitesinde genetik değerlendirme. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, *14*(4), 48-52.

Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*, *15*(6), 369-384.

Krutzsch, P. H. (2000). Anatomy, physiology and cyclicity of the male reproductive tract. *Reproductive biology of bats*, 91-155.

Kukkonen, K. Taavitsainen, S. Huhtala, L. Uusi-Makela, J. Granberg, K. J. Nykter, M., & Urbanucci, A. (2021). Chromatin and epigenetic dysregulation of

prostate cancer development, progression, and therapeutic response. *Cancers*, *13*(13), 3325.

Kuretake, S. Kimura, Y. Hoshi, K., & Yanagimachi, R. (1996). Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biology of reproduction*, *55*(4), 789-795.

Kuşçu, N., & Çelik-özenci, Ç. (2013). Spermatogonyal kök hücreler. *15*(52), 33-36. https://dx.doi.org/

Küçükdurmaz, F. Taşkıran, M. Akbulut, F., & Gökçe, A. (2015). Erkek infertilitesi ve cinsel fonksiyon ilişkisi. *Erkek Üreme Sağlığı*, *17*(63), 285-288.

Laberge, R.-M., & Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biology of reproduction*, *73*(2), 289-296.

Lachaise, F., & Feyereisen, R. (1976). Metabolism of ecdysone in several organs of Carcinus maenas L. incubated in vitro. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'academie des sciences. Serie D: Sciences Naturelles*, *283*(12), 1445-1448.

Lalancette, C. Platts, A. E. Johnson, G. D. Emery, B. R. Carrell, D. T., & Krawetz, S. A. (2009). Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *Journal of molecular medicine*, *87*, 735-748.

Leduc, F. Maquennehan, V. Nkoma, G. B., & Boissonneault, G. (2008). DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biology of reproduction*, *78*(2), 324-332.

Lewis, J. D. Song, Y. de Jong, M. E. Bagha, S. M., & Ausió, J. (2003). A walk though vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma*, *111*, 473-482.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. *methods*, *25*(4), 402-408.

Loppin, B. Berger, F., & Couble, P. (2001). The Drosophila maternal gene sesame is required for sperm chromatin remodeling at fertilization. *Chromosoma*, *110*(6), 430-440.

Luke, B. Stern, J. Kotelchuck, M. Hornstein, M. Declercq, E. Cohen, B., & Diop, H. (2014). Birth outcomes by infertility treatment: analyses of the Massachusetts Outcomes Study of Assisted Reproductive Technologies (MOSART). *Fertility and sterility*, *102*(3), e17.

Malo, A. F. Gomendio, M. Garde, J. Lang-Lenton, B. Soler, A. J., & Roldan, E. R. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology letters*, *2*(2), 246-249.

Martianov, I. Brancorsini, S. Catena, R. Gansmuller, A. Kotaja, N. Parvinen, M. Sassone-Corsi, P., & Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proceedings of the national academy of sciences*, *102*(8), 2808-2813.

Matthiesson, K. L. McLachlan, R. I. O'Donnell, L. Frydenberg, M. Robertson, D. M. Stanton, P. G., & Meachem, S. J. (2006). The relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. *The Journal of Clinical*

Endocrinology & Metabolism, *91*(10), 3962-3969.

McLachlan, R. I. O'Donnell, L. Meachem, S. J. Stanton, P. De Kretser, D. Pratis, K., & Robertson, D. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent progress in hormone research*, *57*(1), 149-179.

Medicine, P. C. o. t. A. S. f. R. (2008). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility*, *90*(5), S60.

Meistrich, M. L. Mohapatra, B. Shirley, C. R., & Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, *111*, 483-488.

Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's basic histology: text and atlas*. New York: McGraw Hill.

Meyer-Ficca, M. L. Lonchar, J. Credidio, C. Ihara, M. Li, Y. Wang, Z.-Q., & Meyer, R. G. (2009). Disruption of poly (ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biology of reproduction*, *81*(1), 46-55.

Meyer-Ficca, M. L. Scherthan, H. Bürkle, A., & Meyer, R. G. (2005). Poly (ADP-ribosyl) ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma*, *114*, 67-74.

Miller, D. Ostermeier, G. C., & Krawetz, S. A. (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in molecular medicine*, *11*(4), 156-163.

Moghbelinejad, S. Najafipour, R. Aleyasin, A. Rezaeian, Z., & Fallahi, P. (2014). YBX2 involved in down regulation of Protamin2 expression in testicular spermatids of azoospermic men. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, *12*(6), 17.

Moghbelinejad, S. Najafipour, R., & Hashjin, A. S. (2015). Comparison of protamine 1 to protamine 2 mRNA ratio and YBX2 gene mRNA content in testicular tissue of fertile and azoospermic men. *International Journal of Fertility & Sterility*, *9*(3), 338.

Morinière, S. Périé, S., & Lacau St Guily, J. (2007). Primary and non-primary parotid malignancies: comparison of treatment modalities and outcomes. *European archives of oto-rhino-laryngology*, *264*, 1231-1237.

Moritz, L., & Hammoud, S. S. (2022). The Art of Packaging the Sperm Genome: Molecular and Structural Basis of the Histone-To-Protamine Exchange [Mini Review]. *Frontiers in Endocrinology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.895502

Morris, I. Ilott, S. Dixon, L., & Brison, D. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human reproduction*, *17*(4), 990-998.

Moss, S. B. Challoner, P. B., & Groudine, M. (1989). Expression of a novel histone 2B during mouse spermiogenesis. *Developmental biology*, *133*(1), 83-92.

Mustafa, M. Sharifa, A. Hadi, J. IIIzam, E., & Aliya, S. (2019). Male and female infertility: causes, and management. *IOSR Journal of Dental and Medical*

Sciences, *18*, 27-32.

Nestler, E. J. (2014). Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, *76*, 259-268.

Neto, F. T. L. Bach, P. V. Najari, B. B. Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. Seminars in cell & developmental biology,

Ni, K. Steger, K. Yang, H. Wang, H. Hu, K., & Chen, B. (2014). Sperm protamine mRNA ratio and DNA fragmentation index represent reliable clinical biomarkers for men with varicocele after microsurgical varicocele ligation. *The Journal of urology*, *192*(1), 170-176.

Niederberger, C. Agulnik, A. I. Cho, Y. Lamb, D., & Bishop, C. E. (1997). In situ hybridization shows that Dazla expression in mouse testis is restricted to premeiotic stages IV-VI of spermatogenesis. *Mammalian genome*, *8*, 277-278.

Nimura, K. Ishida, C. Koriyama, H. Hata, K. Yamanaka, S. Li, E. Ura, K., & Kaneda, Y. (2006). Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. *Genes to Cells*, *11*(10), 1225-1237.

O'Donnell, L. Nicholls, P. K. O'Bryan, M. K. McLachlan, R. I., & Stanton, P. G. (2011). Spermiation: the process of sperm release. *Spermatogenesis*, *1*(1), 14-35.

Oakes, C. La Salle, S. Smiraglia, D. Robaire, B., & Trasler, J. (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental biology*, *307*(2), 368-379.

Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Human reproduction update*, *12*(4), 417-435.

Organization, W. H. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. World Health Organization.

Paoli, D. Pelloni, M. Lenzi, A., & Lombardo, F. (2019). Cryopreservation of sperm: effects on chromatin and strategies to prevent them. *Genetic Damage in Human Spermatozoa*, 149-167.

Park, Y.-J., & Luger, K. (2008). Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Current opinion in structural biology*, *18*(3), 282-289.

Pawlina, W., & Ross, M. H. (2018). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Pointud, J.-C. Mengus, G. Brancorsini, S. Monaco, L. Parvinen, M. Sassone-Corsi, P., & Davidson, I. (2003). The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *Journal of cell science*, *116*(9), 1847-1858.

Pray, L. (2008). Eukaryotic genome complexity. *Nature Education*, *1*(1), 96.

Quinzii, C., & Castellani, C. (2000). The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *Journal of endocrinological investigation*, *23*, 684-689.

Rathke, C. Baarends, W. M. Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1839*(3), 155-168.

Rathke, C. Baarends, W. M. Jayaramaiah-Raja, S. Bartkuhn, M. Renkawitz, R., & Renkawitz-Pohl, R. (2007). Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in Drosophila. *Journal of cell science*, *120*(9), 1689-1700.

Rim, K.-T. (2017). Reproductive Toxic chemicals at work and efforts to protect workers' health: a literature review. *Safety and health at work*, *8*(2), 143-150.

Rogenhofer, N. Dansranjavin, T. Schorsch, M. Spiess, A. Wang, H. von Schönfeldt, V. Cappallo-Obermann, H. Baukloh, V. Yang, H., & Paradowska, A. (2013). The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Human reproduction*, *28*(4), 969-978.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2014). Histoloji konu anlatımı ve atlas. *Çev. Ed: Baykal B*, *6*, 784-785.

Rousseaux, S. Boussouar, F. Gaucher, J. Reynoird, N. Montellier, E. Curtet, S. Vitte, A.-L., & Khochbin, S. (2011). Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Systems biology in reproductive medicine*, *57*(1-2), 50-53.

Rousseaux, S. Caron, C. Govin, J. Lestrat, C. Faure, A.-K., & Khochbin, S. (2005). Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene*, *345*(2), 139-153.

Rousseaux, S. Gaucher, J. Thevenon, J. Caron, C. Vitte, A. Curtet, S. Derobertis, C. Faure, A. Levy, R., & Aknin-Seifer, I. (2009). Spermiogenesis: histone acetylation triggers male genome reprogramming. *Gynecologie, obstetrique & fertilite*, *37*(6), 519-522.

Russell, L. (1990). Mammalian spermatogenesis. *Histological and histopathological evaluation of the testis*, 1-40.

Russo, V. E. Martienssen, R. A., & Riggs, A. D. (1996). *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rutland, J., & De Iongh, R. U. (1990). Random ciliary orientation: a cause of respiratory tract disease. *New England Journal of Medicine*, *323*(24), 1681-1684.

Schenk, R. Jenke, A. Zilbauer, M. Wirth, S., & Postberg, J. (2011). H3. 5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. *Chromosoma*, *120*, 275-285.

Schulster, M. Bernie, A. M., & Ramasamy, R. (2016). The role of estradiol in male reproductive function. *Asian journal of andrology*, *18*(3), 435.

Shah, K. Sivapalan, G. Gibbons, N. Tempest, H., & Griffin, D. K. (2003). The genetic basis of infertility. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, *126*(1), 13-25.

Sharma, R., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and*

assisted reproduction, 19-44.

Shetty, G. Weng, C. C. Bolden-Tiller, O. U. Huhtaniemi, I. Handelsman, D. J., & Meistrich, M. L. (2004). Effects of medroxyprogesterone and estradiol on the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology*, *145*(10), 4461-4469.

Singal, R., & Ginder, G. D. (1999). DNA methylation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *93*(12), 4059-4070.

Skakkebæk, N. E. Jørgensen, N. Main, K. M. Meyts, E. R. D. Leffers, H. Andersson, A. M. Juul, A. Carlsen, E. Mortensen, G. K., & Jensen, T. K. (2006). Is human fecundity declining? *International journal of andrology*, *29*(1), 2-11.

Smith, A., & Haaf, T. (1998). DNA nicks and increased sensitivity of DNA to fluorescence in situ end labeling during functional spermiogenesis. *Biotechniques*, *25*(3), 496-502.

Song, N. Liu, J. An, S. Nishino, T. Hishikawa, Y., & Koji, T. (2011). Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta histochemica et cytochemica*, *44*(4), 183-190.

Stansfield, W. D. (1969). Theory and problems of genetics. *Theory and problems of genetics.*

Steger, K. (1999). Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anatomy and embryology*, *199*(6), 471-487.

Steger, K. Fink, L. Failing, K. Bohle, R. M. Kliesch, S. Weidner, W., & Bergmann, M. (2003). Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Molecular human reproduction*, *9*(6), 331-336.

Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, *403*(6765), 41-45.

Stuppia, L. Franzago, M. Ballerini, P. Gatta, V., & Antonucci, I. (2015). Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clinical epigenetics*, *7*(1), 1-15.

Szenker, E. Ray-Gallet, D., & Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3. 3. *Cell research*, *21*(3), 421-434.

Tachibana, M. Matsumura, Y. Fukuda, M. Kimura, H., & Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *The EMBO journal*, *27*(20), 2681-2690.

Takai, D., & Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the national academy of sciences*, *99*(6), 3740-3745.

Tanaka, H. Iguchi, N. Isotani, A. Kitamura, K. Toyama, Y. Matsuoka, Y. Onishi, M. Masai, K. Maekawa, M., & Toshimori, K. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular and cellular biology*, *25*(16), 7107-7119.

Tanphaichitr, N. Sobhon, P. Taluppeth, N., & Chalermisarachai, P. (1978). Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man.

Experimental cell research, *117*(2), 347-356.

Tiepolo, L., & Zuffardi, O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human genetics*, *34*, 119-124.

Trostle-Weige, P. Meistrich, M. Brock, W. A., & Nishioka, K. (1984). Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(14), 8769-8776.

Van Assche, E. Bonduelle, M. Tournaye, H. Joris, H. Verheyen, G. Devroey, P. Van Steirteghem, A., & Liebaers, I. (1996). Cytogenetics of infertile men. *Human reproduction*, *11*(suppl_4), 1-26.

Van Roijen, H. Ooms, M. P. Spaargaren, M. C. Baarends, W. M. Weber, R. Grootegoed, J. A., & Vreeburg, J. (1998). Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *13*(6), 1559-1566.

Vander Borght, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, *62*, 2-10.

Vara, C., & Ruiz-Herrera, A. (2021). Unpacking chromatin remodelling in germ cells: implications for development and evolution. *Trends in Genetics*.

Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? *Current biology*, *27*(14), R713-R715.

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.

Wen, Q. Cheng, C. Y., & Liu, Y.-X. (2016). Development, function and fate of fetal Leydig cells. Seminars in cell & developmental biology,

White, J. A., & Heasman, J. (2008). Maternal control of pattern formation in Xenopus laevis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *310*(1), 73-84.

Wylie, C. (2000). Germ cells. *Current opinion in genetics & development*, *10*(4), 410-413.

Yamauchi, Y. Shaman, J. A., & Ward, W. S. (2011). Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian journal of andrology*, *13*(1), 31.

Yan, W. Ma, L. Burns, K. H., & Matzuk, M. M. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proceedings of the national academy of sciences*, *100*(18), 10546-10551.

Yanagimachi, R. (2005). Male gamete contributions to the embryo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1061*(1), 203-207.

Yoshida, S. (2010). Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Development, growth & differentiation*, *52*(3), 311-317.

Zhang, Y. Li, J. Villemoes, K. Pedersen, A. M. Purup, S., & Vajta, G. (2007). An epigenetic modifier results in improved in vitro blastocyst production after

somatic cell nuclear transfer. *Cloning and stem cells*, *9*(3), 357-363.

Zhao, J. Klyne, G. Benson, E. Gudmannsdottir, E. White-Cooper, H., & Shotton, D. (2010). FlyTED: the Drosophila testis gene expression database. *Nucleic acids research*, *38*(suppl_1), D710-D715.

Zhao, J. Liu, X.-J. Ma, J.-W., & Zheng, R.-L. (2004). DNA damage in healthy term neonate. *Early human development*, *77*(1-2), 89-98.

Zhong, L., & Belote, J. M. (2007). The testis-specific proteasome subunit Prosα6T of D. melanogaster is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis.

Zquez, C. G. Oriola, J. De Mateo, S., & Vidal-Taboada, J. M. (2008). A Common Protamine 1 Promoter Polymorphism (2190 CRA) Correlates With Abnormal Sperm Morphology and Increased Protamine P1/P2 Ratio in Infertile Patients. *Journal of Andrology*, *29*(5), 540-548.

7.TURNİTİN RAPORU

SPERMATOGENEZ SÜRECİNDE KROMATİN YENİDEN MODELLENMESİNDEİŞ GÖREN PROTAMİN 1 ve 2 GEN İFADELERİNİN ERKEK İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%11	%3	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%6
2	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	%1
4	9lib.net İnternet Kaynağı	%1
5	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.ubaksymposium.org İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Ondokuz Mayıs Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
8	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1

9	dspace.balikesir.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
10	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
11	doczz.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
13	Hayri BEKTAŞ, Deniz ÖZZEYBEK, Ferim GÜNENÇ, Muhammed AKKUŞ, Alper BAĞRIYANIK, Tuncay KÜME, Hakan AYGÜN, Onur KİZER. "The Effects of Two Different Doses of Dexmedetomidine in a Testicular Ischemia-Reperfusion Model in Rats", Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2012 Yayın	<%1
14	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<%1
15	toad.halileksi.net İnternet Kaynağı	<%1
16	Submitted to Kirsehir Ahi Evran Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
17	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

18	KOŞAR, Pınar, Aslan and ÖZÇELİK, Nurten. "Erkek infetilitesinde genetik değerlendirme", Süleyman Demirel Üniversitesi, 2007. Yayın	<%1
19	ALTAY, Barış, APAYDIN, Erdal, ERDOĞAN, Özgür, GÖKER, Ege, Tavmergen, TAVMERGEN, Erol and SEMERCİ, Bülent. "Sperm parametrelerinin ICSI başarısındaki rolü", TUBITAK, 2004. Yayın	<%1
20	c31dfc29-6133-4d58-8c4a-334b27d0f1d4.filesusr.com İnternet Kaynağı	<%1
21	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
22	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
23	kongre.akademikiletisim.com İnternet Kaynağı	<%1
24	Submitted to Dokuz Eylul Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
25	openaccess.acibadem.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
26	turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<%1

27	İZMİRLİ, Müzeyyen. "Epigenetik mekanizmalar ve kanser tedavisinde epigenetik yaklaşımlar", Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2013. Yayın	<%1
28	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart	Kapat	Eşleşmeleri çıkar	Kapat
Bibliyografyayı Çıkart	Kapat		