



T. C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**ASTENOZOOSPERMİDE MİTOKONDRIYAL OTOFAJİNİN
OKSİDATİF STRESLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

KÜBRA NUR UZUN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ŞULE AYL A

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. İLKNUR KESKİN

İSTANBUL- 2024

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Tez Sahibi : Kübra Nur UZUN
Tez Başlığı : Astenozoospermide Mitokondriyal Otofajinin Oksidatif Stresle
İlişkisinin Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 15.01.2024

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç.Dr. Şule AYLA

Kurumu

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Dr.Öğr.Üye. Bircan KOLBAŞI

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Mehmet CINCIK

Maltepe Üniversitesi

Doç.Dr. Ayşe Arzu ŞAKUL

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç.Dr. Nihal KARAKAŞ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu ve planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallara uygun olarak elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgilere ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bunları kaynaklar listesinde belirttiğimi, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Kübra Nur UZUN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimde tez konumun belirlenmesinde ve deneylerin yapılması sırasında bana ışık tutup destek veren, karşılaştığım olumsuzluklar karşısında önerilerini sunan ve bana moral veren danışman hocam sevgili Doç Dr. Şule Ayla'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim ve tez sürecim boyunca İstanbul Medipol Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ailesinin içerisinde yer almama fırsat veren anabilim dalı başkanımız ve eş danışmanım kıymetli Prof. Dr. İlknur Keskin'e bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemediği için saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca daima destek olan, hiçbir sorumu ve sorunumu geri çevirmeden çözen İstanbul Medipol Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ekibinden Dr. Öğr. Üyesi Bircan Kolbaşı Erkan'a, Dr. Arife Ahsen Kaplan'a, Öğr. Gör. Arzu Güneş'e, Dok. Öğr. Sümeyye Özyaman'a gönülden teşekkür ederim.

Doktora sürecimde bana ömürlük dost olan, tez örneklerimin toplanmasında ve deney basamaklarında yardım eden kıymetli arkadaşım Dr. Ayşe Altun'a sonsuz teşekkür ederim. İstanbul Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalında tez çalışmam için yardım eden ve bu süreçte arkadaşım olan Uzm. Dr. Erva Seviç Yılmaz'a ve Dr. Şahika Yardım'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Çocukları olarak dünyaya geldiğim için şanslı hissettiğim canım annem Hülya Uzun, canım babam Vahap Uzun ve biricik kardeşim Enes Uzun'a sevgi ve desteklerini her zaman hissettirdikleri için, bana ve yaptığım işe her zaman inandıkları için en derin teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. İnfertilite.....	7
4.2. Astenozoospermi	8
4.3. Testis Histolojisi.....	10
4.4. Spermatogenez	12
4.5. Mitokondri ve Hareket	15
4.6. ROT - Mitofaji - Apoptoz İlişkisi.....	18
4.6.1 ROT	18
4.6.2 Mitofaji.....	19
4.6.3 Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP)	23
4.6.4 Apoptoz	23
5. MATERYAL VE METOT	26
5.1. Semen Örneklerinin Toplanması ve İncelenmesi.....	26

5.2. Mitofaji ve Apoptoz İlişkili Proteinlerin Lokalizasyonlarının İmmünfloresans ile Gösterilmesi	27
5.3. Protein Miktarlarının Western Blot (WB) ile Ölçülmesi	28
5.4. Elektron Mikroskobu Analizi.....	30
5.5. MMP'nin Belirlenmesi.....	31
5.6. Semen Örneklerinde Oksidan ve Antioksidan Miktarlarının Belirlenmesi....	31
5.6.1. Malondialdehit (MDA) düzeyleri tayini	32
5.6.2. Antioksidan kapasite (Ferric Reducing Antioxidant Power; FRAP).....	32
5.6.3. Glutasyon (GSH) düzeyleri tayini	33
5.6.4. Cu-Zn-SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesinin ölçümü.....	34
5.6.5. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin ölçülmesi.....	34
5.6.6. Protein ileri oksidayon ürünleri (AOPP) düzeyleri tayini.....	35
5.7. İstatiksel Analiz.....	36
6. BULGULAR	37
6.1. Hasta Semen Değerlerinin Karşılaştırılması	37
6.2. Yüksek MMP'nin Değerlendirilmesi	38
6.3. ATG-5 Ekspresyonları ile Otofajinin Değerlendirilmesi.....	42
6.4. Cyt-c Ekspresyonları ile Apoptozun Değerlendirilmesi	45
6.5. Western Blot Sonuçları.....	48
6.6. Ultrasüruktürel inceleme sonuçları	49
6.7. Antioksidan enzim aktiviteleri	54
6.7.1. GSH.....	54
6.7.2. FRAP.....	55
6.7.3. GSH-Px	55
6.7.4. SOD.....	56
6.8. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Değerlendirmesi	57
6.8.1. MDA	57
6.8.2. AOPP.....	58

6.9. Mitofaji ve Apoptoz Korelasyonu.....	59
6.10. Oksidatif Stres ve ATG-5, cyt-c Korelasyonu.....	59
7. TARTIŞMA.....	61
8. SONUÇ.....	68
9. KAYNAKLAR.....	69
10. ETİK KURUL KARARI	83
11. ÖZGEÇMİŞ.....	85



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ATG-5	Otofaji İlişkili Protein 5
Cyt-c	Sitokrom c
MMP	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
ATP	Adenozin Trifosfat
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
CFTR	Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Düzenleyici
CCI	Charlson Komorbidite İndeksi
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
mtDNA	Mitokondriyal Deoksiribo Nükleik Asit
OA	Oligoastenozoospermi
AT	Astenoteratozoospermi
mtDNAcn	Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı
MMAF	Sperm Kamçısının Çoklu Morfolojik Anormalliği
IVF	<i>in vitro</i> Fertilizasyon
İMM	İç Mitokondriyal Membran
DMM	Dış Mitokondriyal Membran
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
mPTP	Mitokondriyal Permeabilite Geçiş Poru
SOD	Süperoksit Dismutaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
ATG	Otofaji İlişkili Gen
PI3K	Fosfatidil Kolin 3 Kinaz
ANT	Adenin Nükleotid Translokatorü
VDAC	Voltaj Bağlı Anyon Kanalı
MDA	Malondialdehit

FRAP	Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç
GSH	Glutasyon
AOPP	Protein İleri Oksidasyon Ürünleri



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 6.1.	Semen parametrelerinin karşılaştırılması.....	37
Tablo 6.2.	MMP yüzdelerinin istatistiksel farkı.....	41
Tablo 6.3.1.	ATG-5 ve cyt-c proteinleri floresan yoğunlukları.....	45
Tablo 6.5.1.	Protein ekspresyon seviyeleri istatistiksel değerlendirmesi.....	48
Tablo 6.7.1.	Antioksidan enzim değerleri.....	54
Tablo 6.8.1.	Oksidatif stresin değerlendirilmesi.....	57
Tablo 6.9.1.	ATG-5 ve cyt-c korelasyonu.....	59
Tablo 6.10.1.	ATG-5 ve cyt-c seviyelerinin MDA ve AOPP ile korelasyonu.....	60



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.3.1.	Testis yapısı ve ilişkili kanallar.....	11
Şekil 4.4.1.	Seminifer tübüller içerisindeki spermatogenez süreci.....	13
Şekil 4.4.2.	Spermiyogenez süreci.....	15
Şekil 4.5.1.	Spermatogenez sırasındaki mitokondri morfoloji çeşitleri.....	17
Şekil 4.6.1.	Mitokondriyal dinamiğin düzenlenmesi.....	21
Şekil 4.6.2.2.	Mitofaji sürecinde otofagozom oluşumu.....	22
Şekil 4.6.4.1.	Otofaji – apoptoz arasındaki cross-talk.....	24
Şekil 6.2.1.	Grupların yüksek ve düşük MMP yüzdeleri.....	41
Şekil 6.5.1.	Westen blot protein ekspresyon miktarları.....	49
Şekil 6.7.1.1.	Normosperm ve astenozoopermi grupları GSH miktarları.....	54
Şekil 6.7.2.1.	Normosperm ve astenozoopermi grupları FRAP miktarları.....	55
Şekil 6.7.3.1.	Normosperm ve astenozoopermi grupları GSH-Px miktarları.....	56
Şekil 6.7.4.1.	Normosperm ve astenozoopermi grupları SOD miktarları.....	56
Şekil 6.8.1.1.	Normosperm ve astenozoopermi grupları MDA miktarları.....	58
Şekil 6.8.2.1.	Normosperm ve astenozoopermi grupları AOPP miktarları.....	58

RESİMLER LİSTESİ

Resim 6.2.1. Normosperm grubu JC-1 boyaması.....	39
Resim 6.2.2. Astenozoospermi grubu JC-1 boyaması	40
Resim 6.3.1. Normosperm grubunda ATG-5 proteininin IF işaretlenmesi.....	43
Resim 6.3.2. Astenozoospermi grubunda ATG-5 proteininin IF işaretlenmesi.....	44
Resim 6.4.1. Normosperm grubu cyt-c proteininin IF işaretlenmesi.....	46
Resim 6.4.2. Astenozoospermi grubu cyt-c proteininin IF işaretlenmesi.....	47
Resim 6.6.1. Normosperm grubu EM görüntüsü.....	50
Resim 6.6.2. Astenozoospermi grubu sperminin boyun bölgesinin EM görüntüsü...	51
Resim 6.6.3. Astenozoospermi grubu sperminin otofajik membran EM görüntüsü...	52
Resim 6.6.4. Astenozoospermi grubunda otofagozom EM görüntüsü.....	53

1. ÖZET

ASTENOZOOSPERMİDE MİTOKONDRIYAL OTOFAJİNİN OKSİDATİF STRESLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılması mitofaji olarak adlandırılmaktadır. Bu süreçte meydana gelen herhangi bir aksaklık sperm hareketi için gerekli enerjiyi üreten mitokondrilerin fonksiyonundaki bozulmaları artırarak oksidatif stres ve apoptozla ilişkili daha büyük problemlere yol açabilmektedir. Astenozoospermide mitofajinin insan sperminde ilk defa değerlendirildiği bu çalışmada otofaji ilişkili protein ATG-5 ve erken apoptoz belirteci sitokrom c (cyt-c) proteini immünfloresan görüntülendi, protein miktarları western blot ile incelendi. Mitokondrilerin işlevselliğini gösteren mitokondriyal membran potansiyeli JC-1 boyası ile ölçüldü. Ayrıca mitofajinin oksidatif stresle ilişkisini değerlendirmek için oksidatif stres belirteçleri MDA ve AOPP ile antioksidanlardan GSH-Px , SOD, GSH ve FRAP seviyeleri astenozoospermi ve normosperm örneklerinde incelenmiştir. Son olarak mitokondrilere dair görsel değerlendirme için elektron mikroskopik takip yapılmıştır. Sonuçlarımıza göre yüksek MMP'li sperm yüzdesi astenozoospermi grubunda oldukça düşük bulunmuştur. Astenozoospermi grubunda MDA ve AOPP seviyelerinin arttığı ve dolayısıyla oksidatif stresin arttığı görülmüştür. Bununla beraber antioksidan seviyeleri normospermi grubunda daha yüksek bulunmuştur. ATG-5 ve cyt-c ifadeleri spermlerin baş, boyun ve kuyruk bölgelerinde lokalizeydi. Dolayısıyla ATG-5'in boyunda ifadesi ve o bölgede mitokondrilerin yoğun bulunması mitofajide rol oynadığını düşündürmektedir. Protein ekspresyonları incelendiğinde ATG-5 ve cyt-c astenozoospermi grubunda normosperm grubuna göre daha yüksek bulunarak anlamlı fark göstermiştir. Bu nedenle ATG-5 astenozoospermide artmış mitofaji aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur. ATG-5 ve cyt-c ekspresyonları arasında korelasyonun bulunması otofaji ve apoptoz arasındaki çapraz etkileşimi göstermektedir. İnce yapısal düzeyde sperm boyun kısmı ve mitokondriler incelendiğinde krista organizasyonunda bozulmalar, mitokondrilerde şişme ve otofagozom benzeri membran oluşumlarına astenozoospermi grubunda rastlanmıştır. Bulgular doğrultusunda astenozoospermide oksidatif stresin artmasına paralel olarak hem mitofajinin hem de apoptozun arttığı ve

bunun spermelerde hareket problemine neden olduğu sonucuna varılmıştır. Mitofajideki artış hasarlı mitokondrilerin hücreden hızlıca uzaklaştırılmasını sağlama maksatlı olsa da ATG-5'in aşırı üretimi spermelerin apoptoza gitme oranını artırmıştır.

Anahtar kelimeler: Apoptoz; Astenozoospermi; ATG-5; Cyt-c ; Mitofaji; Mitokondri; Oksidatif stres

Bu tez 122S776 numaralı TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi olarak desteklenmiştir.



2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF MITOCHONDRIAL AUTOPHAGY AND OXIDATIVE STRESS IN ASTHENOZOOSPERMIA

The elimination of damaged mitochondria is called mitophagy. Any disruption that occurs during this process can lead to disturbances in the function of mitochondria that produce the necessary energy for sperm motility, increasing oxidative stress and potentially leading to more significant problems associated with apoptosis. In this study, mitophagy was evaluated for the first time in human sperm in asthenozoospermia. Autophagy-related protein ATG-5 and the early apoptosis marker cytochrome c (cyt-c) protein were visualized by immunofluorescence, and protein levels were examined with western blot. Mitochondrial membrane potential (MMP), which indicates the functionality of mitochondria, was measured with JC-1 dye. Additionally, oxidative stress markers MDA and AOPP, as well as antioxidant levels of GSH-Px, SOD, GSH, and FRAP, were examined in asthenozoospermia and normosperm samples to evaluate the relationship between mitophagy and oxidative stress. Finally, electron microscopy was conducted for a visual assessment of mitochondria. According to our results, a high percentage of sperm with high MMP was found to be significantly lower in the asthenozoospermia group. In the asthenozoospermia group, MDA and AOPP levels were increased, indicating an increase in oxidative stress. Furthermore, antioxidant levels were higher in the normosperm group. ATG-5 and cyt-c expressions were localized in the head, neck, and tail regions of the sperm. Therefore, the expression of ATG-5 in the neck region, where mitochondria are densely found, suggests its role in mitophagy. When protein expressions were examined, ATG-5 and cyt-c were found to be significantly higher in the asthenozoospermia group compared to the normosperm group, indicating increased mitophagy activation associated with ATG-5 in asthenozoospermia. The correlation between ATG-5 and cyt-c expressions suggests cross-talk between autophagy and apoptosis. At the ultrastructural level, disruptions in cristae organization, mitochondrial swelling and autophagosome-like membrane formations, were observed in asthenozoospermia. In line with these findings, it was concluded that

an increase in both mitophagy and apoptosis occurred in asthenozoospermia parallel to the increase in oxidative stress, leading to motility problems in sperm. While an increase in mitophagy aims to quickly remove damaged mitochondria, the overproduction of ATG-5 increased the rate of sperm undergoing apoptosis.

Key words: Apoptosis; Asthenozoospermia; ATG-5; Cyt-c; Mitochondria; Mitophagy; Oxidative stress

This thesis is supported by TUBITAK with project number 122S776.



3. GİRİŞ ve AMAÇ

Spermiyogenez sürecinde spermatozoidlerin olgun sperm hücrelerine dönüşümünde otofaji önemli bir basamaktır. Otofaji sayesinde fazla ya da hasarlı organeller, sitoplazmik kalıntılar uzaklaştırılır, akrozom biyosentezi ve kamçı oluşumu gerçekleşir (1). Bu süreçteki herhangi bir aksaklık fonksiyonel aktif sperm hücresi oluşumunu engelleyecek ve infertiliteye yol açacaktır. Yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli faktörlerin sperm hareketi üzerine etkisi gösterilmiş olsa da otofajinin etkisine dair insan spermisiyle yapılmış çalışma sayısı azdır.

Erkeklerde semen örneği incelenirken Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) referans değerleri baz alınmaktadır. WHO'ya göre normal bir semen örneğinde mililitrede 16 milyon veya üzeri sayıda sperm hücresi bulunmalıdır. Bu spermilerin toplam hareketliliği %42'den progresif hareketliliği ise %30'dan yüksek olmalıdır (2). Hareket oranının belirtilen değerlerden az olması durumu astenozoospermi olarak adlandırılmaktadır. Astenozoospermide, hareket problemi nedeniyle sperm hücreleri dışı genital kanalında ileri hızlı hareket edemedikleri için normal yolla oositi döleyememektedirler. Spermelerde hareket mitokondri tarafından üretilen enerji ile sağlanmaktadır. Mitokondrielerde herhangi bir hasar olduğu zaman işlevsiz mitokondrinin uzaklaştırılması, mitokondrinin otofajik membranla çevrelenerek ortadan kaldırılması ile gerçekleşmektedir ve bu süreç mitofaji olarak adlandırılmaktadır (3).

Mitokondrinin aktifliğini gösteren belirteçlerden birisi mitokondriyal membran potansiyelidir (MMP). Oligozoospermik, astenozoospermik ve oligoastenozoospermik genç yetişkinlerden alınan spermatozoanın, normal spermatozoidlerden önemli ölçüde daha düşük MMP'ye sahip olduğu görülmüştür (4). Sperm MMP'nin azalması sonucunda azalmış adenosin trifosfat (ATP) seviyeleriyle birlikte aşırı reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi olduğu bulunmuştur. Mitokondri, sperm için ROT üreten tek organdır. ROT'ların saldırgan üretiminin, mitofajiyi başlatabildiği ve erkek gametin apoptoz benzeri bir fenotipe sahip olmasına neden olabildiği bildirilmiştir (5). Bu nedenle oksidatif strese bağlı ROT artışı ile mitofaji arasındaki ilişki de çalışmamız dahilinde incelenmiştir.

Spermatogenez sırasında germ hücre ölümünü indüklemek için otofaji ve apoptozun iş birliği yaptığı gösterilmiştir (6). Otofajinin ilerleyen aşamalarda apoptozu indüklediği ya da inhibe ettiği bilindiğinden çalışmamızda, mitofajinin ne derece apoptozu indüklediğini göstermek için erken apoptoz belirteci olan cyt-c ekspresyonu değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, infertilite nedeni astenozoospermi olan hastaların sperm örneklerinin mitofaji yönünden incelenerek normal sperm örnekleri ile karşılaştırılmasıyla, hareket probleminin olası sebeplerine dair yeni bilgilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Astenozoospermi hastalarında mitofaji-apoptoz-oksidatif stres ilişkisinin incelenmesi ile bu süreçler arasındaki bağlantıların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfertilite

Kısırlık, küresel bir sosyal ve tıbbi sorun haline gelerek çiftlerin yaklaşık %15'ini etkilemektedir (7). Dünyadaki çiftlerin yaklaşık %8-12'si infertildir ve bunların %40-50'sine "erkek faktörleri" neden olmaktadır (8). Erkek faktör infertilite nedenlerinin görülme sıklığı çalışma popülasyonuna ve coğrafi bölgeye bağlı olarak farklılık göstermektedir (9). Avrupa Üroloji Birliği Kılavuzlarına göre en sık bildirilen erkek faktör infertilite nedenleri varikosel, kriptorşidizm, hipogonadizm, diğer endokrinopatiler (örn. hipo- veya hiper-tiroidizm, hiperprolaktinemi), immünolojik faktörler (örn. antisperm antikoru), erkek genital sistem bozuklukları (seminal vezikül, epididim veya ejakülatuar kanalda konjenital veya edinilmiş anormallikler), genetik anormallikler (örn. azospermiye neden olan *kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR)* genindeki mutasyonlar, Y kromozomu mikrodelsyonu ve karyotip değişiklikleri), ilaçlar (örn. kemoterapiler; anabolik ilaçlar) veya cerrahi (örn. prostat ameliyatı) ve idiyopatik kısırlıktır (10).

İtalya'da 2.100 kısır erkek üzerinde yapılan bir araştırma, Charlson Komorbidite İndeksi (CCI), semen parametreleri ve hormonal düzeyler arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışma, artan CCI (kötü sağlık göstergesi) ile birlikte semen parametrelerinin kötüleştiğini ve folikül stimüle edici hormon (FSH) seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir. Sonuçlar hipofiz bezinin spermatogenik fonksiyon bozukluğunu telafi etmeye çalıştığını düşündürmektedir (11). Bir erkeğin sağlığının tıbbi olarak optimizasyonu ile hastalık durumunda meydana gelen iyileştirmelerin semen parametrelerini, cinsel işlevi ve doğurganlık potansiyelini iyileştirebileceği bildirilmiştir (12).

Erkek birey fertilité yönünden incelenirken ilk bakılan şey semen parametreleridir. Eğer semen parametrelerinde bir problem yoksa yukarıda sayılan nedenler araştırılır. Semen ilk olarak hacmi, rengi, viskozitesi, likefaksiyon süresi ve pH'ı makroskopik olarak değerlendirilmektedir. Daha sonra mikroskopik olarak total sperm sayısı, hareketlilik, morfoloji, canlılık, yuvarlak hücre sayısı incelenmektedir.

Anormal meni parametreleri olan erkeklerde testis kanseri riskinin 20 kat arttığı bildirilmiştir (13).

Normal bir semenin hacmi ortalama 2-6 ml arasındadır. İncelenen örnekte hacmin 1,4 ml'nin altında olması *hipospermi* olarak adlandırılmaktadır. Semen içerisinde sperm bulunmaması, seminal vezikül sıvısının semene katılamaması ya da retrograd ejakülasyon nedeniyle bu durum ortaya çıkabilmektedir. Toplam sperm sayısı için 16 milyon/ml sınır değer olarak kabul edilmektedir. Bunun altındaki sayılar *oligozoospermi* olarak tanımlanmaktadır. Ejakülatta hiç sperm görülüyorsa eğer *azospermi* teşhisi konulmaktadır. Azospermik hastalarda tıkanıklığa bağlı bir problem varsa cerrahi yöntemlerle tıkanıklığın ortadan kaldırılması sonrası semende sperm görülebilmektedir. Ancak tıkanıklığa bağlı olmayan durumlarda sperm üretiminin olup olmadığı cerrahi olarak testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) yapıldığında belirlenebilmektedir. Spermilerin morfolojisi ise baş, boyun ve kuyruk kısımlarında sitoplazmik kalıntılar, vakuol, şekil bozuklukları vb. açısından değerlendirilir. Normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi 4'ün altındaysa eğer *teratozoospermi* olarak tanımlanır.

Erkek faktör hastalarda hareket problemi dikkat çeken önemli kusurlardan birisidir. Başarılı bir fertilizasyonun gerçekleşmesi spermilerin yumurtaya doğru ileri ve hızlı hareket etmesine bağlıdır. WHO 2021 semen analizi kriterlerine göre bir semen örneğinde toplam hareketliliğin %42'den, progresif hareketliliğin %30'dan az olması astenozoospermi olarak tanımlanmıştır (2).

4.2. Astenozoospermi

Astenozoosperminin etiyolojisi enfeksiyon, anormal bağışıklık, uzun süreli cinsel perhiz, sağlıksız yaşam tarzı ve ayrıca genetik faktörleri içermektedir (14). Semende lökosit sayısının enfeksiyona bağlı artmasının büyük miktarda ROT'u serbest bıraktığı, bunun da sperm hareketliliğinde düşmeye ve DNA (deoksiribo nükleik asit) bütünlüğünde bozulmaya yol açtığı bulunmuştur (15). İnsan papilloma virüsü (HPV) ile enfekte olan hastalarda astenozoospermi insidansı, sperm hücrelerinde HPV bulunmayan hastalara göre önemli ölçüde daha yüksektir (16). Bir hastada COVID-19 enfeksiyonu sonrası total immotil sperm görüldüğü ancak bu tablonun üç ay sonra normal semen parametrelerine döndüğü bildirilmiştir (17). Bu

bilgiden yola çıkıldığında enfeksiyona bağlı hareket probleminin enfeksiyon ortadan kalktığı zamanla düzelebileceği yani geri dönüşümlü bir hasar olduğu düşünülebilmektedir. Normospermi örneklerinde cinsel perhiz süresinin semen parametreleriyle ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada 4-7 gün perhizi olan hastalarda sperm hareketliliği, 2 saat cinsel perhizi olan hastalarinkinden daha düşük oranda bulunmuştur (18). Ejakülatuar kanalda geçirilen süre arttıkça oksidatif stresin artacağı ve bunun da sperm hareketi ve DNA hasarları ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (19,20). Alkol, sigara, toksik maddeler ve fiziksel aktivite astenozoospermiye yol açabilecek eksojen kaynaklardan birkaçıdır (21,22).

Astenozoosperminin genetik nedenleri arasında kromozomal anormallikler ve nükleer ve/veya mitokondriyal genlerin spesifik mutasyonları yer alabilmektedir (23) ancak astenozoosperminin genetik nedenleri hala nispeten bilinmemektedir. Nükleer veya mitokondriyal DNA'daki (mtDNA) hasar, enerji homeostazisinde yer alan temel proteinleri kodlayan genlerin replikasyonunu ve transkripsiyonunu engeller, böylece sperm hareketliliğini azaltır (24). Astenozoospermi, oligoastenozoospermi (OA) ve astenoteratozoospermili (AT) erkeklerden alınan sperm örneklerinde FISH ile X, Y, 18 ve 21 kromozomları üzerinde yapılan bir anöploidi çalışması, ortalama anöploidi seviyesinin %2,9 (astenozoospermi), %2,8 (OA) ve %2,5 (AT) olduğunu göstermiştir. Normozoospermili erkeklerde ortalama anöploidi düzeyi ise %0,11'dir (25). Normal semen parametrelerine sahip erkeklerde mitokondriyal DNA kopya sayısının (mtDNAcn) daha düşük olduğu bildirilmiştir (26). Spermlerde mtDNAcn artması, kusurlu mitokondrilerin aşırı çoğalması, anormal spermatogenez ve olgun spermde bozulmuş mitokondri otofajisi ile ilişkili bulunmuştur (26,27). İnfertil erkeklerde yapılan bir çalışmada düşük sperm konsantrasyonu, sayısı, hareketliliği ve morfolojisi ile mtDNAcn arasında negatif korelasyon bulunmuştur (28).

Astenozoospermi, hareketli silyalar ve sperm flagellasının benzer aksonemal yapısı nedeniyle, Primer Siliyer Diskinezi olarak bilinen, esas olarak bronşitli kronik hava yolu enfeksiyonları ve hareketli silya disfonksiyonuna bağlı rinosinüzit ile karakterize sendromik patolojik durumların bir parçası olarak da karşımıza çıkabilmektedir (29). Sperm flagellası merkezinde aksonem adı verilen ve klasik '9 + 2' dizilimini oluşturmak için merkezi bir mikrotübül çifti çevresel olarak çevreleyen dokuz periferik çift mikrotübülden oluşmaktadır (30). Radyal çubuklar, dinein kolları

ve neksin-dinein düzenleyici kompleks tarafından oluşturulan mekanik bağlantılar, bu mikrotübüllerin bütünlüğünü korur ve dinamiklerini koordine eder. Ek olarak, dokuz dış yoğun fiber, mitokondriyal kılıf ve fibröz kılıftan oluşan çeşitli aksesuar alt birimler, katman katman merkezi aksonemin etrafını çevreler (31).

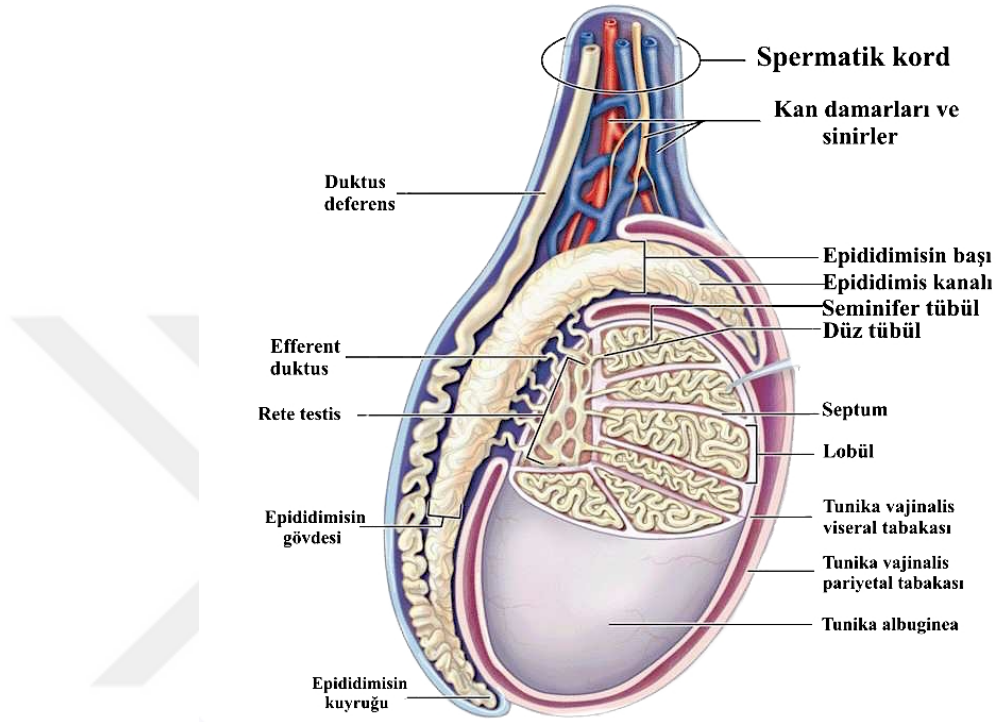
Astenozoospermi, anormal mitokondriyal kılıf, anormal baş-kuyruk veya orta parça-ana parça birleşimi, anormal kuyruk bükülmesi veya kıvrılması, düzensiz kuyruk çapı veya anormal rezidüel sitoplazma gibi çok çeşitli sperm kuyruğu morfolojik kusurlarıyla ilişkilidir (32). Sperm kamçısının çoklu morfolojik anormallikleri (MMAF), çeşitli genlerdeki mutasyonlarla bağlantılı otozomal resesif bir hastalıktır. Kısa, yok, kıvrık, bükülmüş ve/veya düzensiz kamçı dahil olmak üzere sperm kamçısının beş morfolojik kusuruyla karakterize edilen nadir bir astenozoospermi türüdür (33). Önceki çalışmalar, MMAF'ın temel olarak flagellumdaki merkezi mikrotübüllerin, mitokondriyal kılıfın, fibröz kılıfın, dış dynein kollarının veya iç dynein kollarının eksikliği gibi gelişimsel kusurlardan kaynaklandığını göstermiştir.

Tüm bu sebepler dışında astenozoospermi, başka bir belirtisi olmayan (yani izole astenozoospermi) birçok infertil erkekte de kanıtlanmıştır. Prevalans astenozoospermi için %18,71 ve oligozoospermi ve/veya teratozoospermi ile ilişkili astenozoospermi için %63,13 bulunmuştur; dolayısıyla infertil erkeklerde en sık gözlenen sperm defektlerinden birini oluşturmaktadır (34).

4.3. Testis Histolojisi

Astenozoospermi durumu büyük oranda spermlerin üretim sürecinde meydana gelen hasarlardan veya aksaklıklardan kaynaklanmaktadır. Erkek üreme hücresi olan spermlerin üretim süreci spermatogenez olarak adlandırılır ve testisler içerisindeki seminifer tübüllerde gerçekleşmektedir. Yetişkin bir erkekte ortalama 30 ml hacminde iki adet testis bulunmaktadır. En dıştan tunica albuginea adı verilen sıkı bağ dokusu ile çevrilidirler. Bağ dokusunun uzantıları testisi lobül adı verilen kompartımanlara ayırmaktadır ve her bir testiste yaklaşık 200-300 arası lobül bulunmaktadır. Her lobülde ise 1-4 adet seminifer tübül yer alır ve bir testiste toplam 250-1000 adet tübül bulunmaktadır. Testisin fonksiyonel birimi olan seminifer tübüller organ hacminin üçte

ikisini oluşturmaktadır. Tübüller 30-80 cm uzunluğunda, 150-250 µm kalınlığında, kıvrımlı seyreden kanallardır (Şekil 4.3.1.) (35).



Şekil 4.3.1. Testis yapısı ve ilişkili kanallar (36)

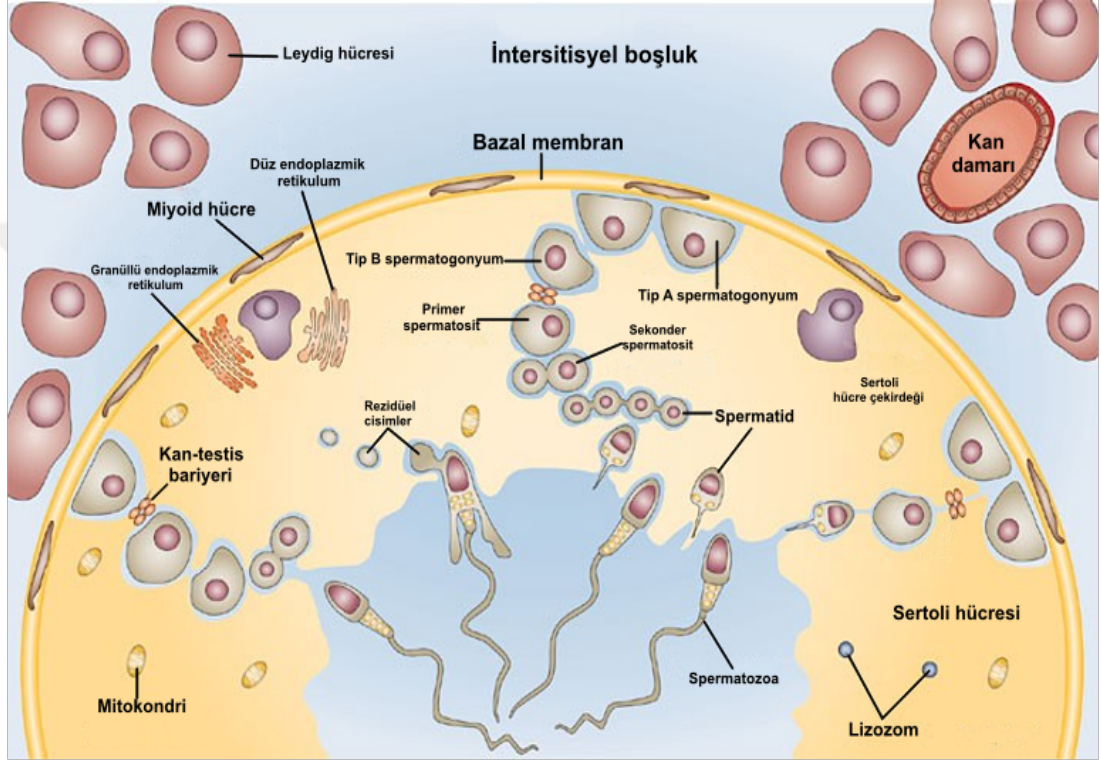
Tübüllerin arası interstisyel doku ile çevrilidir. Bu dokuda kan damarları, sinir lifleri, lenfatik kanallar veya sinüzoidler makrofajlar ve Leydig hücreleri yer almaktadır. Leydig hücreleri testosteron üretiminde görev alan poligonal şekilli hücrelerdir. Steroid üreten hücrelere benzer şekilde, lipid damlacıkları, tübüler kristal mitokondriler ve iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum içermektedir. Embriyoda testosteron ve diğer androjenler erkek fetüsün gonad gelişimi için esastır. Pubertede ise sperm üretiminin ve aksesuar bezlerin sekresyonunun başlaması ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi için gereklidir. Erişkinlerde spermatogenezin, sekretuar aktivitelerin ve sekonder seks karakterlerinin sürdürülmesi için gereklidir (37).

Bir bazal membran üzerinde yer alan seminifer epitel tübülü döşemektedir. Bazal membranın etrafında kollajen lifler, fibroblastlar ve miyoid hücreler yer almaktadır. Miyoid hücreler seminifer tübül bazal membranına bitişik olarak yer alan düz kas tipi hücrelerdir (38). Androjenler, düz kas aktinini üretmek üzere bu hücrelerin farklılaşmasını teşvik etme görevi görürken, FSH'nin, Sertoli hücreleri tarafından salgılanan parakrin faktörler yoluyla ilave bir rolü olduğu düşünülmektedir. Miyoid hücreler ritmik kasılma hareketleriyle tübül lümenindeki olgun sperm hücrelerinin kanallara iletilmesini sağlarlar. Seminifer epitel ise Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerinden oluşmaktadır. Sertoli hücreleri bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir. Apikal ve lateral hücre membranlarının düzensiz sınırları vardır, böylece gelişmekte olan spermatogenik hücelere kriptalar sağlarlar. Sertoli hücrelerinin fonksiyonları: (1) gelişmekte olan spermatogenik seri hücrelerini desteklemek, korumak ve beslemek; (2) spermiyogenez sonunda oluşan rezidüel cisimcikleri fagositozla uzaklaştırmak; (3) matür spermlerin aktin aracılı kasılmalarla tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak; (4) lümene protein ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamak; (5) androjen bağlayıcı protein sentezi ve sekresyonunu düzenlemek; (6) kan testis bariyerini oluşturmak olarak sıralanabilir (39). Sertoli hücrelerinin çoğalması ergenlikten önce meydana gelir ve FSH, aktivin ve tiroksinden etkilenmektedirler. Sertoli işlevlerden herhangi birinin bozulması spermatogenezi etkilemektedir (40).

4.4. Spermatogenez

Seminifer epitelin spermatogenik seri hücreleri, buldukları aşamalara göre tübülün farklı bölgelerinde yer almaktadırlar. Öncü hücreler olan spermatogonyumlar tübülün bazal kompartımanında bazal lamina ile direkt ilişkide bulunurlar. Spermatozoid ve spermatozoidler adluminal kompartımanda yer alırken, olgun spermatozoidler tübülün lümeninde yer almaktadırlar. Spermatogenez süreci genel hatlarıyla spermatogonyumların proliferasyonu; spermatogonyumların spermatozoidlere farklılaşması; spermatozoidlerin mayoz bölünme ile spermatozoidleri oluşturması; yuvarlak spermatozoidlerin olgunlaşması ve şekilsel değişiklik geçiren olgun spermatozoidin seminifere tübül lümenine salınması aşamalarını içermektedir (Şekil 4.4.1.). Tüm bu

aşamaların yaklaşık 74 günde tamamlandığı bilinse de normal sperme sahip erkeklerde bu sürecin 42-76 gün arasında değişkenlik gösterdiği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (41). Bir erkekte günlük sperm üretimi 150 ila 275 milyon spermatozoa arasında değişmektedir (35).



Şekil 4.4.1. Seminifer tübüller içerisindeki spermatogenez süreci (42)

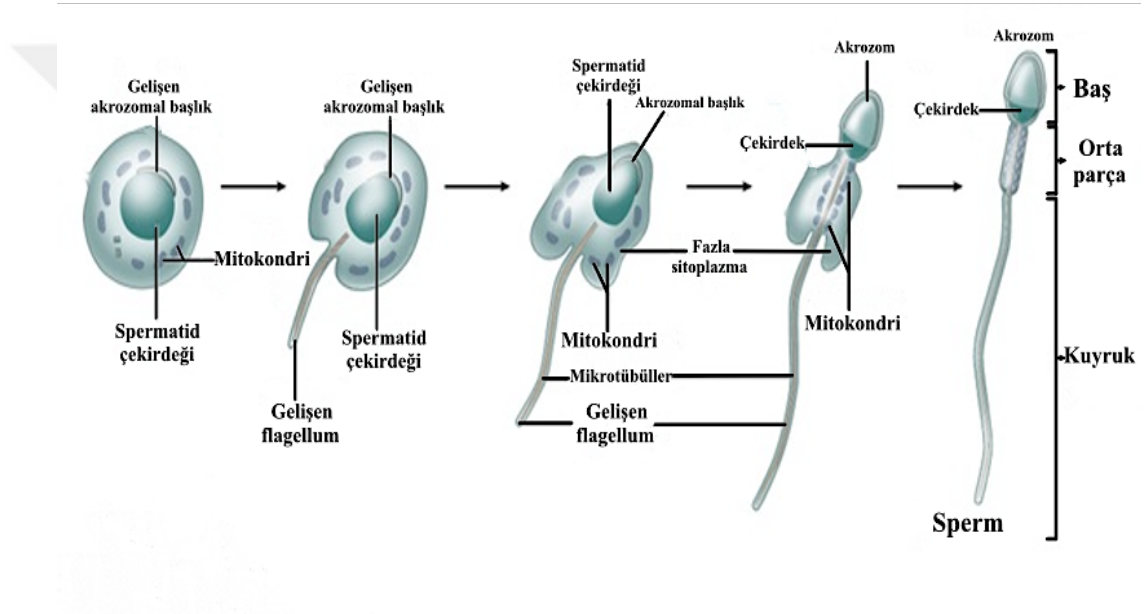
Erkek germ hücreleri, amacı spermatozoaya dönüşmek ve böylece genetik ve epigenetik bilgiyi nesiller boyunca aktarmak olan bir hücre ailesidir. Mayoz bölünme geçirebilen tek insan hücre türüdür. Primordiyal germ hücreleri yolk kesesini çevreleyen ekstraembriyonik mezodermden köken alırlar. Gelişimin 3 ila 5. haftaları arasında gonadal çukıntıya göç ederler ve burada Sertoli hücreleri faktörlerinin yönlendirmesiyle gonositlere farklılaşırlar. Gonositler G0 fazında duraklamaya girer ve doğum sonrasına kadar mitotik olarak aktif değildirler. Doğumdan sonra ilk 6 ay

içinde, gonositler spermatogonyuma farklılaşacak ve spermatogonyum 5-7 yaşına kadar inaktif kalacaktır. Daha sonra mitoz yoluyla sayıları artmaya başlar ve ergenlik çağıyla birlikte çoğalma sürecine paralel olarak spermatozoaya doğru farklılaşma sürecine girerler (43).

Spermatogonyumlar, diğer tüm germ hücrelerinin diploid atalarıdır. Erkek gamet üretmek için mayoz bölünmek ve mitoz bölünmeyle kendini yenileyerek insanın yaşamı boyunca sürekli spermatozoa üretimini sürdürmek önemli iki görevidir. Spermatogonyumlar seminifer tübülün bazal kompartımanında Sertoli hücreleri ile yakın ilişkide bulunurlar. Çekirdekleri ovaldir ve küçük bir Golgi aparatı, birkaç mitokondri ve birçok serbest ribozom içeren yoğun bir sitoplazmaya sahiptirler. Tip A koyu ve tip A açık olmak üzere iki farklı şekilde bulunurlar. Tip A koyular mitoz bölünmeyle kendini yenileyerek kök hücre rezervi olarak görev yaparlar. Buna karşılık tip A açık olanlar mitoz sonrası farklılaşarak tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Primer spermatositler, tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesiyle üretilir ve spermatogenezin proliferatif aşamasının sonunu gösterirler. Kan testis bariyerini aşp adluminal bölmeğe geçen ilk germ hücreleridir. Burada immünolojik olarak izole edilirler ve mayoz bölünmeğe başlarlar (44,45).

Birinci ve ikinci mayoz bölünmelerden sonra toplam 4 adet haploid, yuvarlak spermatid hücresi oluşur. Son olarak bu yuvarlak spermatidler olgun spermiuma dönüşürler ve bu aşama spermogenez olarak adlandırılır (Şekil 4.4.2.). Artık hücre bölünmesi görülmez, sitoplazmik ve nükleer birtakım değişiklikler meydana gelir. Perinükleer teka adı verilen hücre iskeleti yapısının katılımıyla Golgi aygıtından akrozom oluşumu gerçekleşir (46). Akrozom, fertilizasyon sırasında içerisindeki enzimlerin yardımıyla oosite penetrasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Akrozom gelişiminde meydana gelen bir bozukluk sonucu globozoospermi ortaya çıkabilmektedir. Globozoospermi, akrozomu bulunmayan yuvarlak başa sahip ve oositi aktive edemeyen, fertilizasyon başarısızlığına neden olan sperm hücreleri olarak karşımıza çıkmaktadır (47). Çekirdek daha kondense bir hal alır ve post-akrozomal bölgeğe yerleşir. Bu esnada histonların %85'i protaminlerle yer değiştirir ve böylece çekirdeğin daha sıkı paketlenmesiyle DNA korunma altına alınır. DNA paketlenmesindeki hatalar DNA fragmentasyonuna neden olur ve doğurganlık potansiyelini azaltarak *in vitro* fertilizasyon (IVF) başarısını etkilemektedir.

Sentriolden köken alan sperm kuyruğu gelişmeye ve uzamaya başlar. 9+2 mikrotübül şeklinde organize olur (48). Dış yoğun fiberler ve fibröz kılıf mikrotübüllere destek olarak kamçısal hareketin düzenlenmesine katkı sağlarlar. Başarılı bir fertilizasyon için sperm in ileri hızlı hareket etmesi gerekmektedir. Bu nedenle kuyruk gelişimi oldukça önem taşımaktadır. Eğer mikrotübül gelişiminde bir sıkıntı olursa kamçı şeklinde aktif hareket gerçekleşemeyecektir ve hareketsiz sperm tablosu ortaya çıkacaktır.



Şekil 4.4.2. Spermiyogenez süreci (36)

4.5. Mitokondri ve Hareket

Sperm flagellasının hareketini sağlamak için enerji metabolizması büyük önem taşımaktadır (49). ATP'den gelen enerji spermatozoa tarafından doğrudan kullanılmaktadır. Spermlerde, kamçının ana parçasında glikoliz yoluyla ve mitokondride oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretilmektedir (50).

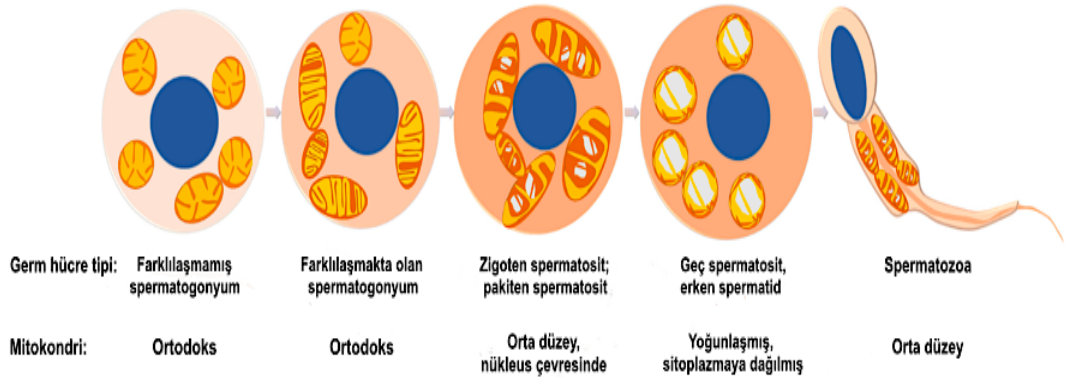
Mitokondri, enerji üretiminde, hücre sinyalizasyonunda ve homeostazda temel role sahip benzersiz hücresel organeldir ve halkasal mtDNA'nın birden fazla kopyasına sahiptir (51). Mitokondri, iç (İMM) ve dış mitokondriyal membrana (DMM) ve zarlar

arası boşluğa sahip, çift zarlı bir organeldir. Sperm mitokondrisinin dış zarlarını çevreleyen mitokondriyal kapsül, mitokondriye mekanik stabilite ve hipo-ozmotik strese karşı direnç sağlar (52). İMM ile çevrili içte kalan kısmı matriks olarak adlandırılmaktadır. İMM'deki krista adı verilen katlanmalar ve kıvrımlar yüzey alanını artırır ve oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üreten Elektron Taşıma Sistemi (ETS) komplekslerini ve ATP sentaz dimerlerini içermektedir. DMM, tüm düşük molekül ağırlıklı çözünen maddelere karşı spesifik olmayan bir şekilde geçirgendir, oysa İMM yalnızca oksijen, karbon dioksit ve suya karşı geçirgendir. Ancak diğer biyomoleküllerin İMM'den mitokondriyal matrikse geçmesi için spesifik taşıyıcılara ihtiyaç vardır (53). Mitokondriyal permeabilite geçiş poru (mPTP), İMM'de genellikle kapalı kalan bir zar ötesi proteindir; ancak oksidatif stres, adenin nükleotidi tükenmesi, mitokondriyal matrikste Ca^{2+} aşırı yükü vb. gibi koşullar açılmasını uyarır (54). mPTP'nin açılmasına mitokondriyal ozmotik şişme, MMP'de azalma ve mitokondriden Ca^{2+} ve proapoptotik faktörlerin salınması eşlik eder, bu da hücre apoptozuna ve ölümüne yol açmaktadır (55). Bir hücrenin toplam mitokondriyal içeriği, mitokondriyal biyogenez ile mitofaji ve diğer mitokondriyal geri dönüşüm formları dahil olmak üzere mitokondriyal degradasyon arasındaki dinamik bir dengedir. Mitokondriyal degradasyon, hasarlı moleküllerin proteazlar, lipazlar ve DNA bozunma sistemi tarafından uzaklaştırılması dahil olmak üzere birçok ölçekte meydana gelebilir (56). Küçük mitokondriden türetilen kesecikler ve mitofaji ile daha lokalize veya küçük hasarın ortadan kaldırılması gerçekleşir (57).

Literatür, aktif mitokondrinin sperm fonksiyonlarının ve başarılı döllemenin önemli bir göstergesi olduğu görüşünü desteklemektedir (58,59). Daha aktif mitokondriye sahip sperm alt popülasyonu, yüksek doğurganlık performansı ile ilişkili bulunmuştur (60).

Spermiyogenezdeki önemli değişikliklerden birisi de mitokondrilerin sperm boyun bölgesine organize bir şekilde yerleşmesidir. Bu süreçte mitokondrilerin boyutu, morfolojisi ve konumu değişir. Germ hücrelerinde üç farklı morfolojide mitokondri türü tanımlanmıştır: ortodoks, orta düzey ve yoğunlaşmış (Şekil 4.5.1.). Spermatogonyumlar ve erken spermatozoidler genellikle daha büyük matriks ve ince kristalara sahip küçük ve küresel yapıda olan ortodoks mitokondri tipini taşırlar. Mayozun erken evrelerindeki zigoten ve pakiten spermatozoidlerde, orta düzey

konfigürasyona sahip mitokondriler çekirdeğin çevresinde bulunmaktadır. Geç spermatozidler ve erken spermatidler, sitoplazma boyunca rastgele dağılmış, genişlemiş matriks ve veziküler kristallara sahip yoğunlaşmış mitokondri formları içermektedirler. Uzamış spermatidlerde, orta düzey konfigürasyona sahip mitokondri, kuyruğu oluşturan dıştaki yoğun lifler boyunca hizalanmaktadır. Spermiyogenezin son aşamasında ise mitokondri, spermatozoadaki kuyruğun orta kısmında uçtan uca sarmal olarak düzenlenmektedir (61,62). Spermatozoanın boyun kısmında yaklaşık 80 mitokondri bulunur (63). Eğer spermdeki mitokondrilerde hasar olursa hareket için gerekli enerji sağlanamaz ve düşük hareketli sperm yani astenozoospermi durumu ortaya çıkar. Mitokondri, enerji üretimine doğrudan katılımı nedeniyle astenozoospermiyi araştırma için kritik organeldir (64).



Şekil 4.5.1. Spermatogenez sırasındaki mitokondriyal morfoloji çeşitleri (65)

Mitokondrilerdeki bu çarpıcı değişiklikler spermatogenez için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle germ hücresi gelişimindeki önemli olayların basamaklarını desteklemek için hassas bir şekilde düzenlenmeleri gerekir. Mitokondrinin rolü sperm hücrelerine enerji sağlamakla sınırlı değildir; testislerde steroid hormonlarının üretimi

ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ve ayrıca fertilitiyi korumak için hücre ölümü gibi çeşitli işlevlere sahiptir (66).

4.6. ROT - Mitofaji - Apoptoz İlişkisi

4.6.1 ROT

Normal koşullar altında hücrede oksidan ve antioksidan dengesi mevcuttur. Ancak çeşitli durumlarda bu denge bozulabilir ve oksidanlarda artış görülür. Mitokondriler spermde ROT üreten tek organeldir. ROT, proteinlerin, reseptörlerin, kinazların, fosfatazların, kaspazların, iyon kanallarının ve transkripsiyon faktörlerinin oksidatif aktivasyonu yoluyla hücre içi yolları düzenleyen önemli ikincil haberciler olarak çalışır ve ROT ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur (67). Hafif oksidatif stres normal bir fizyolojik tepki olarak kabul edilir ve dölleme, hareketlilik, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve hiperaktivasyon gibi çeşitli sperm fonksiyonları için gereklidir (68).

ROT üretimi normal sperm fonksiyonu için gerekli olsa da fazlası hücreye zarar vermektedir. ROT varlığı, sperm hareketliliği ve dölleme potansiyeli kaybıyla ve aynı zamanda DNA hasarıyla da ilişkilidir (69). Spesifik ROT kaynaklı hasarlar arasında, sıklıkla boyun çevresinde sitoplazma kalıntısı olmasından kaynaklanan sperm hareketliliği kaybı ve döllemeyle ilişkili membran füzyon olaylarını tehlikeye atan plazma membranındaki değişiklikler yer almaktadır. İnsan spermatozoasının, yaklaşık yüzde 10 ila 20'ye ulaşan histon içeriği nedeniyle ROT'a potansiyel olarak daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (70). Mitokondriyal ROT'lar oldukça reaktif ve toksik moleküllerdir, dolayısıyla memeli hücrelerinin bunları temizlemek için bir takım antioksidan enzim sistemlerine ihtiyacı vardır. Stres koşulları altında, mitokondriyal elektron taşıma zinciri boyunca elektron transferi kusursuz olmayabilir; bunun sonucunda elektron sızıntısı ve oksijenin kısmi indirgenmesiyle süperoksit anyonu (O_2^-) oluşur. Daha sonra, süperoksit dismutaz (SOD enzimi), mitokondriyal zarlar arası boşlukta süperoksit anyonunu hızlı bir şekilde hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürür. Genellikle SOD etkisinden sonra H_2O_2 diğer iki enzim olan katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından hızla suya indirgenir. Tüm bu

mitokondriyal antioksidan enzimler nükleer genom tarafından kodlanır ve sitoplazmada sentezlendikten sonra mitokondriye aktarılmaları gerekir (71). Bununla birlikte, spermatozoa çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olduğundan aşırı ROT üretimi, spermatogenezin bozulmasına ve apoptoza yol açan lipit peroksidasyonunu uyarabilir. Lipit peroksidasyonundaki artış, embriyonik gelişimin bozulmasına, erken gebelik kaybı oranında artışa ve idiyopatik erkek kısırlığına neden olmaktadır (72). Ayrıca, mitokondriyal elektron taşıma proteinleri ile oluşan lipit metabolitlerinin eklentilerinin sperm hareketliliğini azaltabildiği de bildirilmiştir (73).

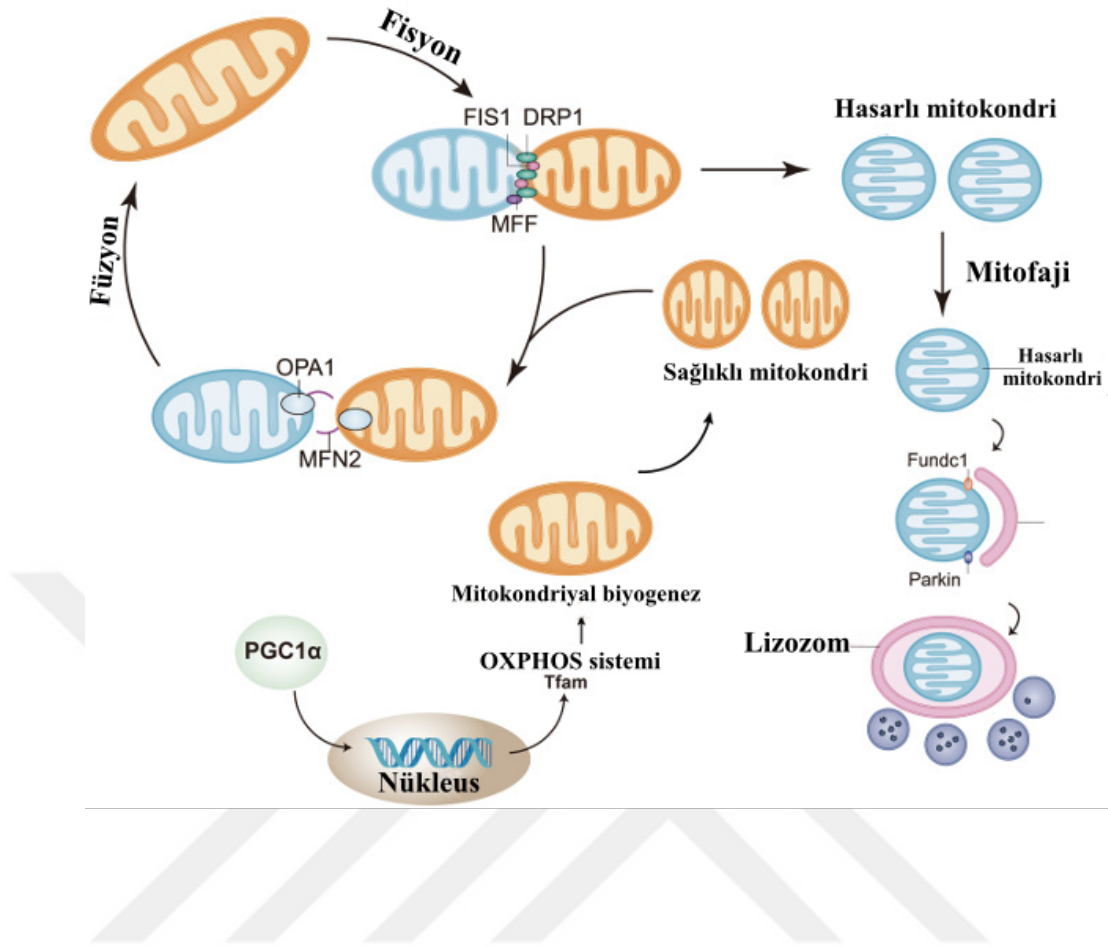
Mitokondri enerji üretimindeki rolü nedeniyle, protein katlanmasını ve yapısını bozabilen ve mtDNA mutasyonlarına neden olabilen ROT'ların yüksek seviyelerine maruz kalmakta ve hasara karşı duyarlı hale gelmektedir. Mitokondrilerde kalite kontrol mekanizmaları mevcuttur. Bu süreç iki karşıt güç tarafından düzenlenir: hasar görmüş organellerin veya bileşenlerinin uzaklaştırılması ve önceden var olan mitokondriye ait retikuluma yeni proteinlerin ve/veya lipitlerin eklenmesinden oluşan mitokondriyal biyogenez. Bu süreçler hep birlikte mitokondri devrini oluşturmaktadır. Mitokondri içinde farklı makromoleküller değişir ve belirli bir yarılanma ömrüne sahiptirler. Bu devir oranları stres ve gelişimsel süreçler tarafından düzenlenmektedir (74).

4.6.2 Mitofaji

Hasarlı olan mitokondrilerin uzaklaştırılması, mitokondriye spesifik otofaji türü olan mitofaji ile gerçekleşmektedir. Otofaji, organellerin ve sitoplazma parçalarının ayrıştırıldığı ve daha sonra hidrolitik sindirim için lizozomlara iletiildiği bir süreçtir. Hücre sel sağ kalım için otofajinin doğru şekilde düzenlenmesi oldukça önemlidir. Normal koşullar altında otofaji erkek üreme sisteminde prostat bezinin normal gelişimini desteklemekte ve spermatogenez sürecinde fazla sitoplazmanın ve organellerin uzaklaştırılması gibi görevler üstlenmektedir. Hasarlı mitokondri, gereksiz ATP hidrolizi, hızlandırılmış ROS üretimi ve proapoptotik proteinlerin salınması potansiyeline sahiptir. Yaşlı ve işlevsiz mitokondrinin zamanında ortadan kaldırılması, hücreleri düzensiz mitokondriyal metabolizmanın ve proapoptotik proteinlerin salınmasının zararlarından korumak için gereklidir. Mitokondriyal devrin

mekanizması ağırlıklı olarak otofajik parçalanma ve hidrolitik bozunma için lizozomlara dağıtımdır (75). Mitofaji, kaspazları ve apoptozu aktive edecek hasarlı mitokondriyi ortadan kaldırarak hücreyi koruyucu bir etki gösterir. Bir diğer deyişle, otofajik işlemenin ve/veya lizozomal fonksiyonun bozulması kaspaz bağımlı hücre ölümünü teşvik edecektir (76). Otofajik aktivasyonun sperm hareketliliğini artırdığı yönünde bulgular mevcuttur (77).

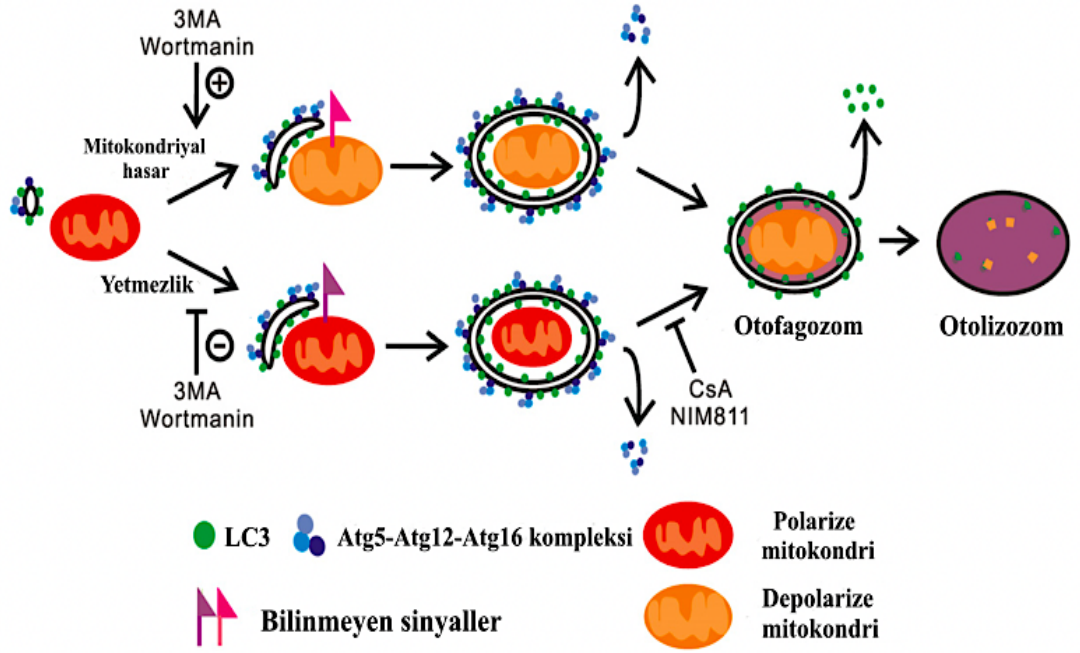
Mitokondriyal ağ sürekli olarak mitokondrinin taşınmasını, boyutunu, morfolojisini ve dönüşümünü kontrol eden füzyon/fisyon döngülerinden geçmektedir (Şekil 4.6.2.1.). Mitokondriyal füzyon ve fisyon, metabolik durum ve enerji durumu, mitokondriyal membran potansiyeli, redoks durumu ve hücrel stres gibi çok sayıda faktör tarafından transkripsiyonel ve transkripsiyonel olmayan bir şekilde (proteolitik bozunma ve proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonu) düzenlenir (78). Mitokondriyal fisyon, bir mitokondrinin iki küçük mitokondriye bölünmesiyle karakterize edilir. Stres koşulları altında mitokondriyal kalite kontrolü ve biyoenerjiti korumak için kritik öneme sahiptir (79). Parçalanmış ve işlevsiz mitokondri, mitokondriyal ağa yeniden dahil edilmez, bu da bu organellerin otofaji aracılı olarak uzaklaştırılmasına neden olur. Mitokondrinin şekli mitofaji ve makrotofajide farklıdır. Makrotofaji sırasında mitokondri uzar ve bozulmadan korunur. Tersine, mitokondrinin mitofaji yoluyla seçici bozulmasından önce mitokondride parçalanma meydana gelmektedir (80). Fisyon, mitokondriyi fiziksel olarak otofagozomal kapsüllemeye uygun bir boyuta indirerek mitofajiyi kolaylaştırmaktadır (81). PINK1-Parkin yolağı mitokondriyal fisyon ve füzyonu farklı düzeylerde etkilemektedir. Mitokondriyal füzyon/fisyon dengesi ve temizlenme, NIX (NIP3 benzeri protein X), BNIP3 (BCL2 etkileşimli protein 3) ve FUNDC1 (FUN14 alanı içeren protein 1) dahil olmak üzere dış mitokondriyal membranda bulunan mitofaji reseptörleri tarafından da düzenlenmektedir (82-84).



Şekil 4.6.2.1. Mitokondriyal dinamiğin düzenlenmesi (85)

Otofaji sırasında izolasyon membranı, fagofor veya pre-otofagozom olarak adlandırılan ve otofajik hedefi saran membranöz bir yapı oluşturur. İzolasyon membranları hedeflerini sarar ve çevreler. Aynı zamanda otofagozom adı verilen çift membranlı kesecikler oluşur. Bu otofagozomlar daha sonra lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturur ve bunların birikmiş içerikleri lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanarak geri dönüştürülmektedir. İlk olarak mayada tanımlanan, genetik olarak korunmuş otofajiyle ilişkili proteinlerden (ATG) oluşan bir sistem, otofajiyi düzenler ve otofajiye katılır. Bu ATG proteinleri fonksiyonlarına göre farklı gruplara ayrılmaktadır. Örneğin bir çift ubiquitin benzeri protein konjuge sistemi olan ATG-12 ve ATG-8 sistemleri, kesecik uzaması ve tamamlanmasını sağlamaktadır. Sınıf III fosfatidil kolin 3 kinaz (PI3K) kompleksi vezikül nükleasyonunda görev almaktadır (86).

Otofagozomların sekestrasyon ve oluşumu sırasında, ATG-12-ATG-5 kompleksi, izolasyon membranına yer değiştiren ve fagoforun oluşumunda ve uzamasında rol oynayan bir bağlayıcı olarak işlev gören ATG-16'ya bağlanmaktadır. ATG-7, ATG-12'yi aktive eder ve otofagozomal öncülüleri oluşturmak üzere ATG-5 ile konjuge olmaktadır (Şekil 4.6.2.2.) (87). Otofajinin uzama mekanizmasının gerekli bileşenlerinden (örneğin, ATG-5 ve ATG-7) yoksun olan dokular veya hücrelerde, sıklıkla büyük ölçüde artan sayıda hasar görmüş mitokondri ve peroksizom varlığına rastlandığı bildirilmiştir (88). Erkek germ hücrelerinde ATG-5 eksikliği, anormal akrozom biyogenezi, genişlemiş rezidüel cisimler ve otofaji aktivitesinin bozulmasının bir sonucu olan mitokondriyal yeniden düzenleme dahil olmak üzere anormal sperm farklılaşması ile erkek subfertilitesine yol açmıştır (89).



Şekil 4.6.2.2. Mitofaji sürecinde otogagozom oluşumu (75)

4.6.3 Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP)

Literatür, aktif mitokondrinin sperm fonksiyonlarının ve başarılı döllemenin önemli bir göstergesi olduğu görüşünü desteklemektedir (59). Mitokondri hacmi ve mitokondriyal kılıf kesitleri, ATP içeriği ve sperm yüzme hızları ile pozitif korelasyon göstermektedir (90). Ökaryotik hücrelerdeki ATP'nin çoğunluğu, elektronların oksijen gibi elektron alıcılarına aktarıldığı oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondride üretilmektedir. Mitokondriyal elektron taşıma sistemi, bir dizi redoks reaksiyonu yoluyla elektrokimyasal bir gradyan yaratır. Bu elektrokimyasal gradyan, ATP'nin sentezini yönlendirir ve mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesinde önemli bir parametre olan MMP'yi üretir (91). MMP, ATP sentaz tarafından ATP üretmek için kullanılan ara enerji depolama biçimi olarak hizmet etmektedir.

MMP çeşitli problemlerle canlı hücrelerde ölçülebilmektedir. Bunlardan birisi de mitokondride potansiyele bağlı birikim sergileyen flüoresan JC-1 boyasıdır, yeşilden kırmızıya flüoresan emisyon kayması gösterir. Yüksek MMP'ye sahip hücreler kırmızı/turuncu ışığa yaparken, düşük MMP sarı/yeşil ışığa ile karakterizedir. Kromatin bütünlüğünü, normal morfolojiyi, yüksek hareketliliği ve akrozom reaksiyonunun indüksiyonunu korumak için yüksek bir MMP'nin gerekli olduğu düşünülmektedir (92). Ancak MMP, DNA fragmantasyonu ve ROT üretimi ile negatif ilişkilidir (93). Dahası, daha aktif mitokondriye sahip sperm alt popülasyonu, yüksek doğurganlık performansı ile ilişkilidir. Oksidatif stres, progresif sperm motilitesini, ATP üretimini, mitokondriyal aktiviteyi azaltır ve mitokondriyal transkripsiyon sistemine zarar vererek MMP'yi düşürür. Nükleer veya mitokondriyal DNA'daki hasar, enerji homeostazisinde yer alan temel proteinleri kodlayan genlerin replikasyonunu ve transkripsiyonunu engeller, böylece sperm hareketliliği azalır. Ayrıca mitokondriyal elektron taşıma proteinlerine oluşan lipid metabolitlerinin eklenmesi de sperm hareketliliğini azaltabilmektedir (94).

4.6.4 Apoptoz

Apoptoz, hücrenin çeşitli katabolik enzimler üreterek kendi ölümünü düzenlediği, programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan bir süreçtir. Bu enzimler

Hücre hasarlı mitokondri varlığında ya mitofaji aktivasyonu ile sadece o hasarlı mitokondriyi ortadan kaldırır ya da cyt-c'yi salarak aşırı ROT üretimi ile daha fazla mitokondriyal hasara neden olur ve sonuçta apoptoz indüklenir. Cyt-c, mitokondri iç zarının dış tarafında yer alan, hücre içi elektron taşıma zinciri reaksiyonunda önemli bir yer tutan, mitokondriye özgü zarlar arası boşluk proteindir. Cyt-c'nin mitokondriden salınmasının gerçek mekanizması hala net değildir. Ancak modellerden birinde, mPTP'nin mitokondride şişmeye neden olup cyt-c salınımını indüklediği öne sürülmüştür. mPTP'nin iki ana bileşeni vardır; biri iç zarda bulunan adenin nükleotid translokatorü (ANT), diğeri ise dış zarda bulunan voltaja bağlı anyon kanalıdır (VDAC) (98). Bax, PTP açıklığında bulunan bir proteindir ve ANT'a bağlanarak iç membranda geçirgenliğe ve depolarizasyona neden olur. Bu geçirgenleştirme nedeniyle, çözünen maddeler ve su mitokondriyal matrikse girerek mitokondride şişmeyi tetikler. VDAC kapanır ve bunun sonucunda ATP/ADP değişiminde dengesizlik meydana gelir, bu da iç zarın hiperpolarizasyonuna ve matrikste şişmeye neden olur (99). Bu hiperpolarizasyon dış membran yırtılmasına ve cyt-c'nin sitozole salınmasına neden olur.

İnfertil erkeklerde yapılan çalışmalar, plazmadaki yüksek cyt-c seviyelerinin ROT artışı tarafından indüklenen mitokondriyal hasara neden olduğunu göstermiştir (100). Cyt-c'nin, iç zardan mitokondri dışına salınması erken apoptoz belirteçidir ve kaspaz aktivasyonunu başlatır. Kaspaz aktivitesi, sperm immatürasyonu, düşük sayı, azalmış hareketlilik, düşük fertilizasyon oranları ve plazma membran bütünlüğünün bozulmasıyla ilişkili bulunmuştur (101,102).

Özetle, astenozoospermi semen örneklerinde ROT artışı olduğu bilinmektedir. Saldırgan ROT üretimi sonucu apoptozun ortaya çıkması muhtemeldir. İnsan semen örneklerinde bu konuda yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Ancak spermiyogenez sürecinde önemli bir yer tutan otofaji konusu henüz insan semeninde detaylı şekilde incelenmemiştir. Astenozoospermi tablosu düşünüldüğünde ilk akla gelen organel mitokondri olduğu için biz de mitokondrinin selektif otofajisi yani mitofaji üzerine bu çalışmayı planladık. Çalışmamızda, normosperm örnekleriyle astenozoospermi örnekleri arasında mitofaji farkı var mıdır; mitofaji artmakta mı azalmakta mıdır; apoptoz ile arasında korelasyon var mıdır; oksidatif stres bu durumun oluşmasında nasıl bir öneme sahiptir soruları cevaplanmaya çalışılmıştır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Semen Örneklerinin Toplanması ve İncelenmesi

Çalışma için etik kurul onayı Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınmıştır (E-10840098-772.02-1904). Örnekler bir tıp fakültesi bünyesindeki Tüp Bebek Bölümü'ne tedavi için başvuran kişilerden alınmıştır. Deney grubu olarak astenozoospermi ve kontrol grubu olarak normospermi semen örnekleri incelenmiştir. Başka herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan, alkol ve sigara kullanımı olmayan, kronik hastalık nedeniyle ilaç kullanmamış (hipertansiyon, diyabet, kan hastalığı, antibiyotik, bakteriyal ya da viral hastalığa bağlı, sperme etki edecek hareket artırıcı vs.), varikosel vb. operasyonlar geçirmemiş, kemoterapi ve/veya radyoterapi almamış, herhangi bir kromozomal anomalisi olmayan, 20-45 yaş arası erkekler çalışmaya dahil edilmiştir. Normospermi grubu, erkek faktör infertilitesi olmayan, normal sperm parametrelerine sahip 30 erkekte oluşmaktadır. Astenozoospermi grubu ise infertilite sebebi erkek faktör olan ve semen analizi sonrası WHO kriterlerine göre toplam hareketliliğin %42'den, progresif hareketliliğin %30'dan az olduğu, total hareketsiz örneklerin dahil edilmediği 30 erkek hastadan oluşmaktadır.

Semen örneği 3-5 günlük cinsel perhizle merkeze gelen hastalardan, hastanın adının, soyadının yazılı olduğu steril kaplara, mastürbasyon yöntemi ile alınmıştır. Oda ısısında en az yarım saat likefiye olması için bekletilmiştir. Spermatozoa konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi için standart manuel teknikler uygulanmıştır. Motilite ve konsantrasyon ışık mikroskopunda X20 büyütmede en az 100 sperm sayılarak yapılmıştır. Bunun için önceden ısıtılmış sayma kamarasına (Makler) 10 µl semen koyulmuş ve 20X büyütme altında 10 kare sayılarak sayım işlemi yapılmıştır. Toplam sperm sayısı, progresif hareketli ve hareketsiz sperm yüzdesi hesaplanmıştır. Hareket değerlendirilirken spermler 4 farklı gruba ayrılmıştır:

- A: ileri hızlı hareketli spermler,
- B: ileri yavaş hareketli spermler,
- C: yerinde hareketli spermler ve
- D: hareketsiz spermler.

A, B ve C oranları (%) toplanarak toplam motilite değeri elde edilirken, progresif motil sperm oranı A+B oranları (%) toplanarak belirtildi. Sperm motilitesi, WHO 2021 değerlerinin altında olanlar astenozoospermi grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Morfoloji değerlendirmesi Kruger kriterlerine göre Diff-Quick boyası ile yapılmıştır. Bunun için semen örneklerinden 10 µl alınıp lam üzerine yayılmış ve kurutulmuştur. Sonrasında fiksasyon için 15 saniye metanol içerisinde bekletilmiştir. Kurutulan yayma preparat ilk olarak 1 numaralı boya solüsyonu (ksantin boyası) içerisinde 10 saniye bekletilmiştir. Lam üzerindeki fazla boya uzaklaştırıldıktan sonra 2 numaralı solüsyon (azine A ve metilen mavisi) içerisinde 5 saniye tutulmuştur. Son olarak lam çeşme suyunda bir dakika yıkanıp kurutulmuştur. Mikroskop altında 100X büyütmede en az 200 sperm hücresi sayılarak morfoloji yüzdesi belirlenmiştir.

5.2. Mitofaji ve Apoptoz İlişkili Proteinlerin Lokalizasyonlarının İmmünfloresans ile Gösterilmesi

ATG-5 ve cyt-c antijenlerinin immünfloresan işaretlenmesi için semen örnekleri sayım işlemi sonrası çift gradient yöntemiyle hazırlanmıştır. Bunun için en alta %90 onun üstünde %45 yoğunluğa sahip gradient medyumu 15 ml'lik konik tüp içerisine eşit hacimde (0.5 ml) koyuldu. En üste semen eşit hacimde eklendi ve 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet kısmını hareket ettirmeden süpernatant alındı. Pellet yıkama medyumuyla karıştırılıp 5 dakika santrifüj edildi. Yıkama medyumu uzaklaştırıldı ve pellet sperm sayısına göre belirli oranlarda yıkama medyumu ile minimal hacimde sulandırıldı. 15 µl sperm süspansiyonu, pozitif şarjlı lamlara yayıldı ve 10 dakika boyunca havada kuruması beklendi.

İmmünfloresan boyama protokolü;

Yayma preparatlar üzerindeki spermeler PBS (Sigma, P4417) içindeki %4 paraformaldehit (PFA) ile 30 dk fikse edildi. Fiksasyon sonrası spermeler 3 x 5 dk PBS ile yıkandı. Daha sonra permeabilizasyon için PBS içinde %0.3 Triton X-100 (Sigma, 9036-19-5) ile 20 dk oda sıcaklığında muamele edildi. PBS ile yıkama yapıldı. Bloklama için %0.3 Triton X-PBS içindeki %5'lik BSA ile oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Primer antikor, blok solüsyonu içerisinde seyreltilerek kullanıldı. Antikorlar

ayrı ayrı incelenmiştir. ATG-5 1:200 (Thermo, PA1-46178), cyt-c 1:200 (Sigma, SAB5700730) dilüsyonda kullanılmıştır. Hazırlanan primer antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı. Sonrasında 3 x 5 dk PBS ile yıkama yapıldı. Sekonder antikor (Abcam, Alexa Fluor 647, ab150079) blok solüsyonu içinde seyreltildi ve örnekler 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Sekonder antikor oranı 1:500'dür. PBS ile yıkama yapıldı. Slaytlar DAPI içeren fluoromount (Ibidi, 50011) ile kapatıldı. Konfokal mikroskopta (Leica TCS SPE) uygun dalga boyunda (ex/em: 650/671) görüntülendi.

Her preparat için 100 spermin olduğu rastgele alanlardan mikrograflar çekildi. Sonrasında mikrograflardaki ışımalar ImageJ programı ile boyanma yoğunluğuna göre değerlendirildi, gruplar arasındaki fark incelendi.

5.3. Protein Miktarlarının Western Blot (WB) ile Ölçülmesi

Semen örnekleri alındığında herhangi bir işleme tabi tutulmadan WB analizleri için ayrılmıştır. Her birinde 200 µl olacak şekilde her hasta için 3 adet kriyoviyale konulmuştur ve -80 °C 'de saklanmıştır. Tüm örnekler toplandığında inceleme için protein ekstraksiyonu ile çalışmaya başlanmıştır. Aynı gruba ait örneklerden eşit hacimde alınıp birleştirilerek havuzlama (pooling) metodu ile analiz yapılmıştır. Gruplara ait semen örnekleri 4 °C' de 15 dakika 10,000 × g' de santifurüj edilerek süpernatant atılıp hücresel kısım elde edilmiş ve RIPA lizis tamponu ile homojenize edilmiştir. Homojenat 4 °C' de 15 dakika 10,000 × g' de santifurüj edilerek süpernatant toplanmıştır. Protein konsantrasyonları Qubit® Protein çalışma kiti (Q33211; Invitrogen) kullanılarak Qubit Fluorometer 3.0 (Q32866; Invitrogen) cihazı ile ölçüldü. Protein konsantrasyonu ölçülecek örnekler ve Qubit cihazının kalibrasyonunun yapılması için kullanılan 3 standart solüsyon için tampon solüsyonu hazırlandı. Qubit protein analiz kitinden bulunan Qubit protein tamponu ve aynı kit içerisinde bulunan Qubit bileşimi karıştırıldı. Kalibrasyon standartları olan standart 1, standart 2, standart 3 tüplerine 190 µl tampon solüsyonu ve 10 µl standart çözeltilerinden eklendi. Ölçümü yapılacak olan örnek tüplerine 198 µl tampon çözeltisi ve 2 µl protein örneği konuldu. Örnekler vorteks edildi ve oda sıcaklığında

15 dakika inkübe edildi. Kalibrasyon tüpleri sırasıyla okutularak Qubit 3.0 cihazı kalibre edildi ve örnekler okutularak protein konsantrasyonları hesaplandı.

Örnekler, konsantrasyon ölçümlerine göre eşitlenip 20 µg/10 µl olacak şekilde hesaplandı, 2X Laemli buffer (161-0737; Biorad) ve otoklavlanmış ddH₂O ile karıştırılarak 95 °C’de 5 dakika bekletildi, daha sonra +4°C’deki kırık buz üzerine alındı. Yükleme yapılmadan önce örnekler mini santrifüj cihazında (MINO-10K, INOVIA Technology) çevrildi.

Mini-Protean TGX Precast protein jel (4569033) 4’lü dikey jel elektroforez tankına (1658004, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) yerleştirildi. Gerekli tampon çözelti /25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), pH 8.3) (1610732, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) eklendi. Örnekler her bir kuyucuğa 20 µg/10 µl olacak şekilde yüklendi. Elektroforezin süresini belirlemek için protein işaretçisi olan mavi renkli standart (Precision Plus Protein-All Blue Standart,163-0393, Biorad Life Sciences, Kaliforniya; ABD) yüklendi. Güç kaynağı (1645070, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) kullanılarak 50 V’da 5 dakika, daha sonra 150 V’da bir saat daha yürütüldü. Ardından Bio-Rad Transblot Turbo sistemi ve RTA Mini PVDF Transfer Kiti (170-4272; Bio-Rad, ABD) kullanılarak jeller poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara transfer edildi. Membranlar, tris tamponlu salin-Triton-X-100 (TBS-T) ile hazırlanan %5’lik yağsız süt tozu çözeltisinde (sc-2325; ChemCruz, ABD) oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklamadan sonra TBS-T ile yıkanan membranlar +4 °C’de gece boyunca bloklama solüsyonunda seyreltilen primer antikolar ATG-5 (1:500) (Thermo, PA1-46178), cyt-c (1:500) (Sigma, SAB5700730) ile çalkalama cihazı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün TBS-T ile 3 x 5 dk yıkandı ve anti rabbit sekonder antikor ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Bantların görüntülenmesi için deteksiyon solüsyonu (Clarity™ Western ECL Substrate, 1705060, Bio-Rad) ile 5 dakika muamele edildi ve membranlar, ChemiDoc MP (1708280, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

Tüm sonuçlar ImageJ programında analiz edildi. Her bir proteinin optik yoğunluk değerinden arka plan (background) çıkarıldıktan sonra, değerler endojen kontrol olarak kullanılan GAPDH (B362298; Bio Legend) proteinine göre optimize edildi ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

5.4. Elektron Mikroskobu Analizi

Hastalardan alınan semen örneklerinin bir kısmı hazırlık öncesi ayrıldı ve konsantre edildi. Dipte kalan peletin üzerine gluteraldehit eklenerek fikse olması sağlandı. Normosperm ve astenospermi grubundan 5'er örnek belli bir süre fiksatifte bekletildikten sonra bir tıp fakültesi bünyesindeki Histoloji ve Embriyoloji ABD'da elektron mikroskobik takipleri yapıldı.

Elektron mikroskobu takip protokolü:

Fiksasyon sonrası örnekler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir, Santrifüj sonrası fiksatif üstünden alınarak yaklaşık 1ml PBS eklenip 5 dakika yıkanmıştır. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırılıp üstüne 1ml'ye kadar %1'lik osmiyum tetroksit eklenip 1 saat beklenmiştir. Daha sonra osmiyum tetroksit uzaklaştırılıp distile su ile 5 dakika yıkama yapılmıştır. Yıkamadan sonra %1'lik uranil asetat ile 20 dakika + 4°C'de bekletilmiştir. Örnekler uranil asetat uzaklaştırıldıktan sonra distile su ile 5 dakika yıkanmıştır. Sonrasında örnekler sırasıyla %30, %50, %70 alkol serilerinde 5'er dakika bekletilmiştir. %70 alkolde ertesi güne kadar yaklaşık 16 saat bekletilmiştir. Ertesi gün %90, %100 ve tekrar %100 alkolde 5'er dakika bekletilmiştir. Alkol serileri sonrası 2 kere %100 propilen oksitte 5'er dakika bekletilmiştir. Son olarak gömme işleminden önce propilen oksit : epon (1/1) ve propilen oksit : epon (1/3) karışımlarında 1'er saat bekletilmiştir. Örnekleri gömmek için saf epon (Sigma, 45345) kapsüllere koyulmuştur ve sperm pelletleri parçalara ayrılarak kapsüllere koyulmuştur. Kapsüller içerisindeki örnekler etüvde 60°C'de 18 saat bekletilerek polimerizasyonu sağlanmıştır. Böylece örnekler kesit alınmaya hazır hale getirilmiştir.

Görüntüleme için epona gömülü sperm örnekleri hücrelerin olduğu bölgeyi açığa çıkarmak için traşlandı. Kesitlerin yönünü anlamak için yamuk oluşturacak şekilde jilette şekillendirildi. Daha sonra trimlenip kesit almaya hazır hale getirildi. Ultramikrotomda (Leica EM UC7) önce 600 nm yarı ince kesitler alındı ve yer tayini yapıldı. Toluidin mavi boyası ile boyandı. Mikroskopta incelendi ve görüntülenmek istenen alan görüldüyse ultra ince kesit almaya geçildi. Etrafı jilette biraz daha küçültülen örneklerden 60-70 nm ultra ince kesitler alınıp bakır gridler üzerine alındı. Uranil asetat ile 30 dk kontrastlama yapıldı. Sorasında Reynould's boya çözeltisi ile 5-

10 dk boyandı. Ardından elektron mikroskobunda (Jeol, JEM 1011) görüntüleme yapıldı.

5.5. MMP'nin Belirlenmesi

Spermiler hazırlık işlemi sonrasında 1×10^6 /ml olacak şekilde sperm yıkama medyumu ile istenilen yoğunluğa getirildi. Sonrasında her örnekten 150 µl alınıp ependorfa konuldu. Üzerine 3µl JC-1 (Abcam, ab141387) boyası eklenip karıştırıldı. Ependorfların etrafı alüminyum folyo ile sarılıp ışıkla teması önlendi. Sperm - JC-1 karışımı 37°C 'de etüvde yarım saat bekletildi. İnkübasyon sonrası her örnekten 15µl alınıp lam üzerine konuldu. Nucleusların da gösterilmesi için DAPI içeren fluoromount eklendi ve lamelle kapatıldı. Vakit kaybetmeden konfokal mikroskopta görüntülemenin yapılacağı mikroskoba sıcaklığı koruyacak koşullarda götürüldü.

JC-1, mitokondride potansiyele bağlı birikim sergileyen katyonik boyadır, yeşilden (~525 nm) kırmızıya (~590 nm) bir flüoresan emisyon kayması ile gösterilir. Sonuç olarak, mitokondriyal depolarizasyon, kırmızı/yeşil flüoresan yoğunluk oranındaki bir azalma ile belirtilir. Boya, düşük konsantrasyonlarda bir monomer olarak bulunur ve yeşil flüoresan verir. Daha yüksek konsantrasyonlarda boya, geniş bir uyarma spektrumu ve ~590 nm'de maksimum emisyon sergileyen J-agregatları oluşturur ve kırmızı görüntülenir.

Boyama sonrası preparatlar konfokal mikroskopta (Leica TCS SPE) uygun dalga boylarında uyarılarak görüntülendi. Her hasta için 100 sperm hücresi içerecek şekilde rastgele alanlardan fotoğraflar çekildi. 100 sperm hücresinin ışımaları kırmızı-turuncu renk yüksek MMP, yeşil renk düşük MMP olacak şekilde değerlendirildi. Sayım sonrası örneklere ait MMP yüzdeleri hesaplandı.

5. 6. Semen Örneklerinde Oksidan ve Antioksidan Miktarlarının Belirlenmesi

Bu inceleme için alınan semen örneklerinin seminal plazması (semenin spermatozoa hariç geri kalan kısmı) kullanılmıştır. Semen örnekleri santrifüj ile çöktürüldükten sonra süpernatant kısmında ölçüm gerçekleştirilmiştir. Her hasta için

3'er adet 250 µl örnek kriyoviyale alınarak -20°C'de analiz yapılana kadar saklanmıştır.

5.6.1. Malondialdehit (MDA) düzeyleri tayini

Tiyobarbitürik (TBA) asit kullanılarak asit ortamda TBA ile MDA'nın oluşturduğu kompleks spektrofotometrik (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) olarak ölçüldü.

Ayırıcılar:

- Buege-Aust ayırıcı: 375 mg TBA bir miktar distile suda eritildi. Üzerine 15 ml %100'lük triklorasetik asit ve 2.1 ml derişik hidroklorik asit (HCl) eklendi, karıştırıldı ve hafifçe ısıtılarak çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı: 22 mg TEP 10 ml distile suda çözünerek 10 mM'lık ana standart hazırlandı. Daha sonra bu ana standart 1000 kez sulandırılarak 10 µM'lık çalışma standardı hazırlandı.

Yöntem: 0.25 ml seminal plazma üzerine 0.5 ml Buege-Aust ayırıcı eklendi. Kaynar su banyosunda 15 dakika tutuldu. Soğuduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatantın absorbansı köre karşı okundu. Ayrıca kör ve standart tüpler hazırlandı. Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ve standardın absorbansı değerlendirilerek hesaplandı. Sonuçlar nmol MDA/ml olarak verildi.

5.6.2. Antioksidan kapasite (Ferric Reducing Antioxidant Power; FRAP)

Bu yöntemin prensibi Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen antioksidan gücün ölçülmesine dayanır. Sonuçlar askorbik asidin indirgeme potansiyeli ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Ayırıcılar:

- Askorbik asit (Sigma, A0278) standartları: 500 ve 1000 µM (sudaki çözelti)
- 300 mM Asetat tamponu (pH 3.6)
- 40 mM HCl
- 10 mM 2,4,6-tripridil-s-triazin (TPTZ)

- 20 mM FeCl³
- FRAP ayıracı: Asetat tamponu, TPTZ ve FeCl³ ayıraçları sırası ile 10:1:1 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

Yöntem: Mikroplaka kuyucuklarına 0.01 ml seminal plazma ve 0.2 ml FRAP çalışma ayıracı konuldu, 37°C’de 4 dakika inkübe edildikten sonra mikroplaka okuyucuda 593 nm’de absorbanslar okundu. Ayrıca 0.01 ml askorbik asit (500 ve 1000 µM) ve 0.2 ml FRAP çalışma ayıracı içeren standartlar hazırlandı. 1 mM askorbik asidin FRAP değeri 2000 olarak kabul edilerek sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

5.6.3. Glutatyon (GSH) düzeyleri tayini

GSH düzeyleri, Elman ayıracı (5,5’- ditiobis-2 nitro benzoik asit) kullanılarak tayin edildi. Bu ayıracın dokulardaki serbest sülfidril (-SH) grupları tarafından indirgenmesi sonucunda, 1 mol SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik asit (DTNB) oluşmaktadır. Sarı renkli bu ürün spektrofotometrik olarak 412 nm’de absorbans vermektedir.

Ayıraçlar:

- GSH standartları: 5 mg ve 10 mg GSH tartılarak 100 ml’de eritildi.
- Ellman Renk Ayıracı: 4 mg 5.5’-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) 10 ml %1’lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
- Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 ml distile suda çözüldü.
- 0.3 M Na₂HPO₄

Yöntem: Ependorf tüplere 0.2 ml seminal plazma, 0.4 ml 0.15 M KCl ve 0.75 ml proteinsizleştirme çözeltisi kondu, karıştırıldı, 10000xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Ayıraç körü ve standart tüplere de aynı işlemler uygulandı. Daha sonra elde edilen bu supernatanlardan mikroplaka kuyucuklarına 0.05 ml pipetlendi ve üzerine 0.2 ml 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.05 ml Ellman ayıracı kondu ve oluşan renkler 412 nm’de ayıraç körüne karşı okundu. GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı $13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ve standart kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol GSH/ml olarak tanımlandı.

5.6.4. Cu-Zn-SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesinin ölçümü

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçüldü. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu $O_2^{\cdot-}$, ortamdaki SOD'un etkisiyle H_2O_2 'e dönüşür. H_2O_2 ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. Oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak saptandı.

Ayırıcılar:

- SOD (100 IU/ml) standardı
- 0.1 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8)
- 0.2 mM riboflavin: 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5)' de çözündü.
- 6 mM o-dianisidin

Yöntem: Plate içerisine 0.25 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8), 0.01 ml o-dianisidin, 0,02 ml seminal plazma eklendi. Daha sonra her bir örneğe 0.02 ml riboflavin kondu, karıştırıldı ve 460 nm'deki absorbans değerleri hızla okundu. Tüpler 20W floresans lamba içeren 37°C'ye ayarlanmış özel bir kutuya yerleştirildi ve tam 8 dakika süre ile floresans ışığa maruz bırakıldı. Sürenin bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm'de okundu ve iki absorbans arasındaki fark alındı. Ayrıca deney körü ve standart için de aynı işlemler yapıldı. Sonuçlar IU/ml olarak verildi.

5.6.5. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin ölçülmesi

GSH-Px aktivite tayini birbirini izleyen iki reaksiyona dayanır. Birinci reaksiyonda H_2O_2 veya organik hidroperoksitler (ROOH), GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH'a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH- redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH'a, NADPH ise $NADP^{+}$ 'ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm'de absorbansda azalma olarak izlenir, NADPH 340 nm'de bir absorbans verdiği halde, $NADP^{+}$ bu dalga boyunda absorbans vermemektedir.

Yöntem: GSH-Px aktivitesi, 1 ml'lik hacimde son konsantrasyonlar 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azid, 0.2 mM NADPH, 1 mM

GSH, 0.5 IU/ml glutatyon redüktaz (GSH-R), 1.2 mM kumen hidroperoksit ve enzim kaynağı içerecek şekilde hazırlanmış ortamda 37°C’de tayin edilmektedir.

20 ml potasyum fosfat tamponu (125 mM, pH 7.0), 2.5 ml sodyum azid (130 mg/dl), 2.5 ml Na₂-EDTA (744 mg/dl), 5 ml NADPH (8.3 mg/5 ml), GSH (15.3 mg/5 ml) içeren bir havuz hazırlandı ve bu havuzdan 0.140 ml alınarak spektrofotometre küvetlerine kondu. Üzerine 0.01 ml GSH-R (0.5 IU) ve 0.04 ml seminal plazma eklendi. Daha sonra 0.01 ml 12 mM kümen hidroperoksit ilavesi ile reaksiyon başlatıldı ve spektrofotometrede absorban azalması 340 nm’de izlendi. Sonuçlar NADPH’in ekstinksiyon katsayısı olan $6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ’den yararlanılarak hesaplandı nmol/dakika/ml olarak verildi.

5.6.6. Protein ileri oksidayon ürünleri (AOPP) düzeyleri tayini

Başlıca ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olan AOPP tayini için serum örneklerinin sitrik asit içeren asit ortamda verdiği absorbanlar 340 nm’de okundu. Sonuçlar kloramin-T ile potasyum iyodürün (KI) oksidasyonu ile oluşan triiyodid ile standardize edilerek karşılaştırıldı.

Ayrıraçlar:

- 0.2 M sitrik asit
- 1.16 M KI
- Kloramin-T stok standardı (100 mM): 227.6 mg kloramin-T 10 mL’de çözüldü ve sulandırılarak 25, 50 ve 100 µM’lık çalışma standartları hazırlandı.

Yöntem: Mikroplaka kuyucuklarına 0.04 mL seminal plazma ve 0.16 mL 0.2 M sitrik asit konuldu (deney). Ayrıca 0.190 mL 0.2 M sitrik asit ve 0.01 mL 1.16 M potasyum iyodür içeren (kör) ve 0.190 µl kloramin-T (25, 50 ve 100 µM; 0.2 M sitrik asitte hazırlandı) ve 0.01 mL 1.16 M KI içeren (standart) kuyucuklar hazırlandı ve 2 dakika sonra kör tüpe karşı deney ve standardın absorbanları 340 nm’de µQuant mikroplaka okuyucuda belirlendi. Sonuçlar pmol/mL kloramin-T eşdeğeri olarak verildi.

5.7. İstatiksel Analiz

Verilerin analizinde, GraphPad Prism (ver. 9.0.0) programı kullanılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarına ait verilerin normaliteleri Shapiro-Wilk normalite testi ile ölçülmüştür. Normal dağılım göstermeyen bağımsız değişkenlere ait verilerin ikili karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi ve normal dağılım gösteren gruplarda ise Student t testi uygulanmıştır. Sonuçlara ait veriler, ortalama±standart sapma (s.s) olarak sunulmuştur. Gruplara ait değişkenler arasındaki bağımsızlık durumları Pearson veya Spearman korelasyon testi ile ölçülmüştür. $p < 0.05$ değeri istatistiki anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir. p değerlerine tekabül eden ve anlamlılık seviyesini belirten yıldız sayısı sırasıyla şu sınırlara göre ifade edilmiştir: n.s.= $p > 0.05$; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$; **** = $p \leq 0.0001$. Bu derecelendirme, yıldız sayısı arttıkça aradaki anlamlılık seviyesinin de o kadar artmakta olduğunu ifade etmektedir.

6. BULGULAR

6.1. Hasta Semen Değerlerinin Karşılaştırılması

Gruplara ait semen parametrelerinin karşılaştırması Tablo 6.1’de gösterilmiştir. Normosperm ve astenozoospermi grupları incelendiğinde hastaların yaş ortalamaları ($p=0.7096$) ve total sperm sayıları ($p=0.2201$) birbirine yakın bulunmuş ve anlamlı fark göstermemiştir. Semen hacmi normosperm grubunda daha yüksek bulunmuştur ve gruplar arası anlamlı fark görülmüştür ($p=0.0218$). Hareket oranları ise astenozoospermi grubunda normospermi grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur ve istatistiksel olarak aşırı derecede anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0.0001$). Aşırı derecede anlamlı fark iki grubun morfoloji ($p<0.0001$) ve hareketsiz sperm ($p<0.0001$) oranları arasında da bulunmuştur.

Tablo 6.1. Semen parametrelerinin karşılaştırılması

Parametre	Ortalama \pm s.s		p değeri (p seviyesi)
	Normal (n=30)	Asteno (n=29)	
Yaş ^a	34.0 \pm 7.49	33.4 \pm 6.26	0.7096 (n.s)
Hacim ^b	5.70 \pm 9.44	3.32 \pm 1.94	0.0218 (*)
Total Sayı ^b	88.0 \pm 55.5	83.6 \pm 81.7	0.2201 (n.s)
Morfoloji ^b	4.73 \pm 3.36	1.59 \pm 2.11	<0.0001 (****)
Progresif motilite ^a	63.4 \pm 16.0	21.0 \pm 10.8	<0.0001 (****)
Yerinde Hareket ^b	3.73 \pm 3.59	5.48 \pm 4.26	0.0655 (n.s)
Hareketsiz ^a	32.9 \pm 14.7	73.6 \pm 9.13	<0.0001 (****)

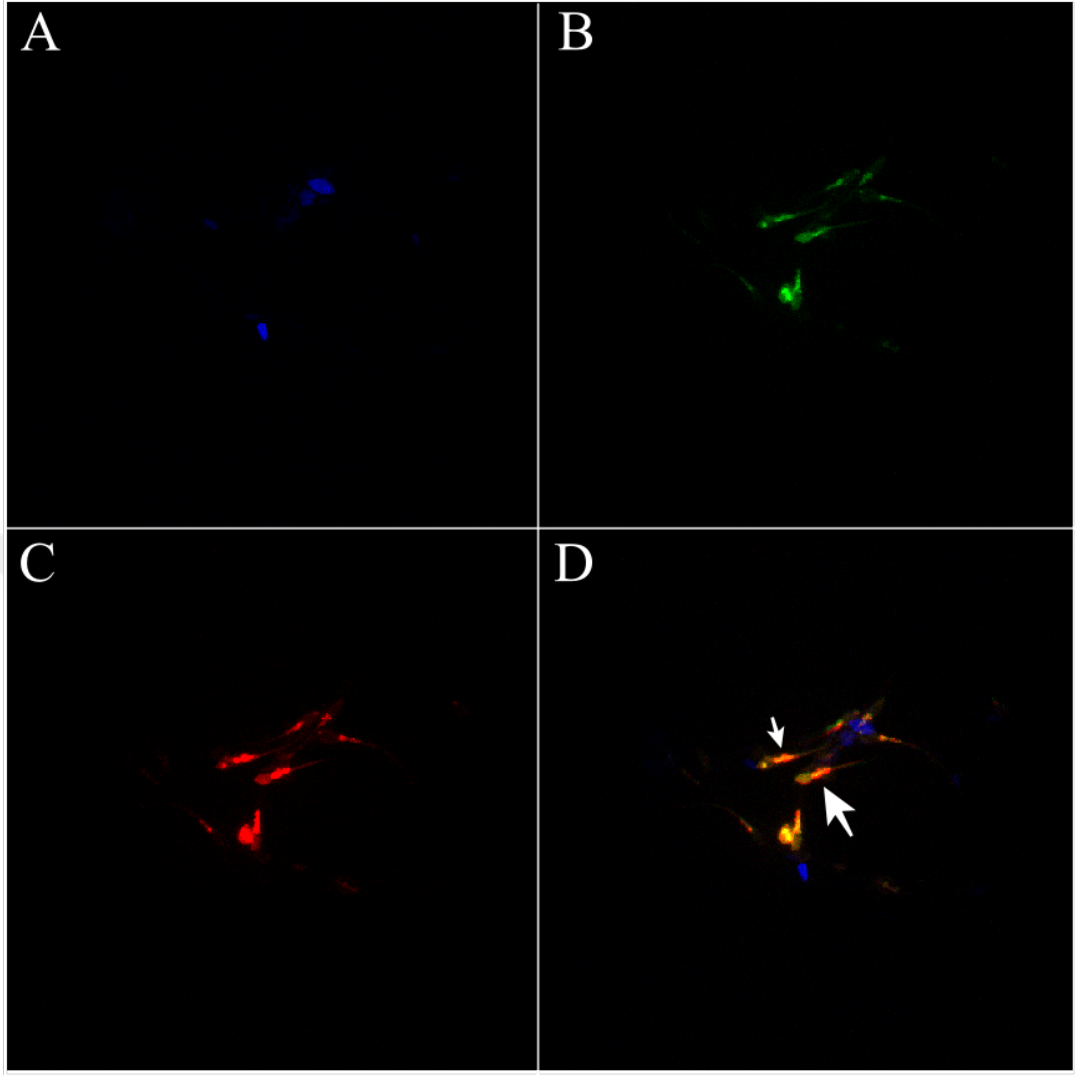
^aStudent t test

^bMann Whitney U test

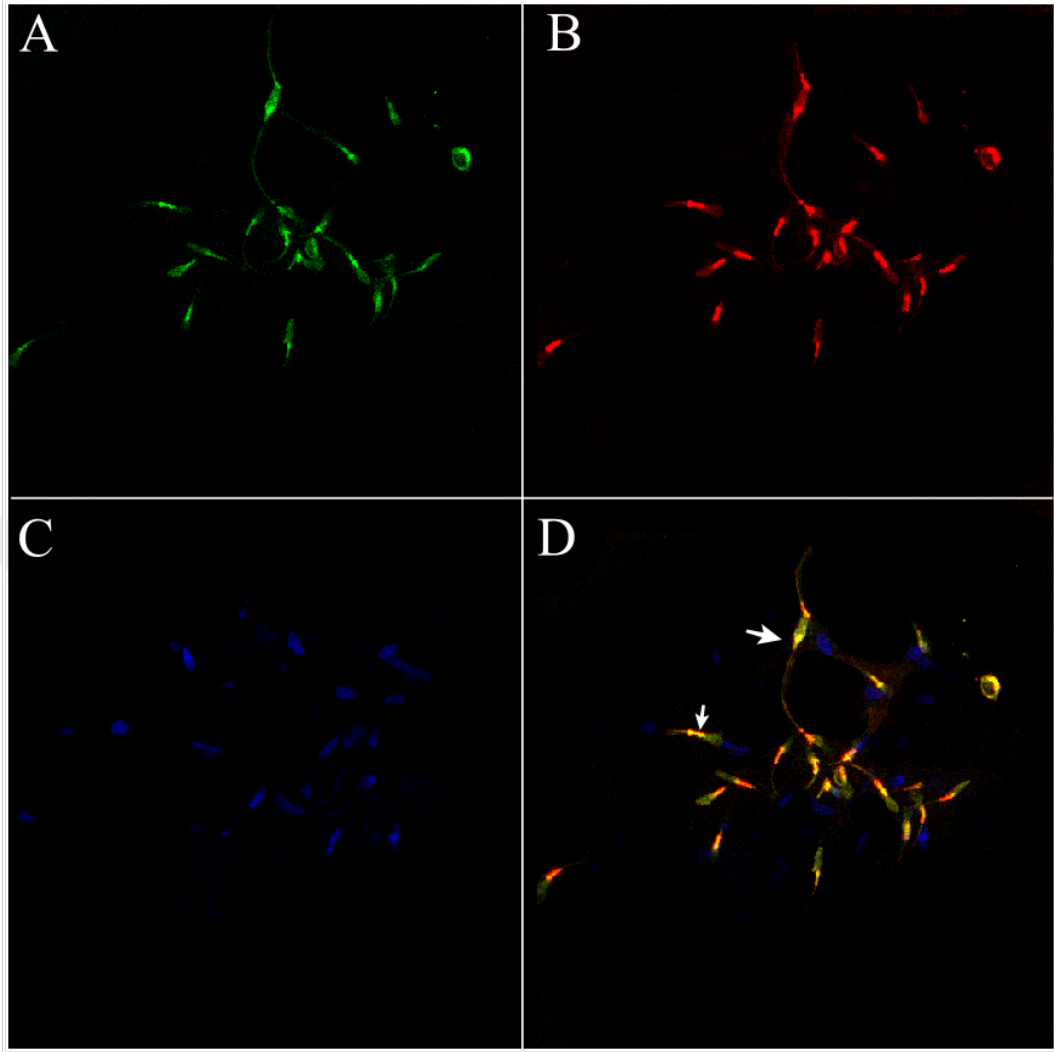
6.2. Yüksek MMP'nin Değerlendirilmesi

MMP değerlendirmesi JC-1 boyası ile yapılmıştır. Sarı/yeşil ışımaya yapan spermeler düşük MMP'li sayılırken, kırmızı/turuncu ışımaya yapanlar yüksek MMP'li sayılmıştır. Normosperm ve astenozoospermi gruplarının boyanmaları Resim 6.2.1. ve Resim 6.2.2.'de gösterilmiştir. Şekil 6.2.1.'de grupların MMP oranları görülmektedir. Yüksek MMP'li sperm oranı normosperm grubunda %63,9 olarak bulunurken astenozoospermi grubunda %30,8 bulunmuştur. Bu oran normosperm grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek anlamlı bir fark bulunmuştur ve astenozoospermide MMP'nin düştüğü gösterilmiştir ($p < 0.0001$) (Tablo 6.2).

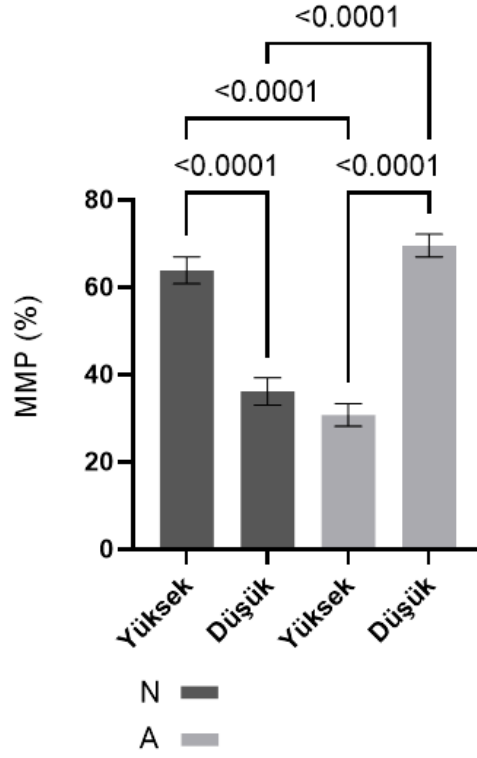




Resim 6.2.1. Normosperm grubu JC-1 boyaması. A: sperm çekirdeklerinin DAPI ile boyanmış görüntüsü; B: düşük MMP'nin yeşil ışımaya ile görülmesi; C: yüksek MMP'nin kırmızı ışımaya; D: üç rengin birleştirilmiş görüntüsü. Beyaz oklar yüksek MMP'li kırmızı turuncu ışımaya yapan spermleri göstermektedir. Konfokal mikroskop, 63X



Resim 6.2.2. Asterozoospermi grubu JC-1 boyaması. A: düşük MMP'nin yeşil ışımaya ile görülmesi; B: yüksek MMP'nin kırmızı ışımaya; C: sperm çekirdeklerinin DAPI ile boyanmış görüntüsü; D: üç rengin birleştirilmiş görüntüsü. Beyaz oklar düşük MMP'li sarı yeşil ışımaya yapan spermleri göstermektedir. Konfokal mikroskop, 63X



Şekil 6.2.1. Grupların yüksek ve düşük MMP yüzdeleri

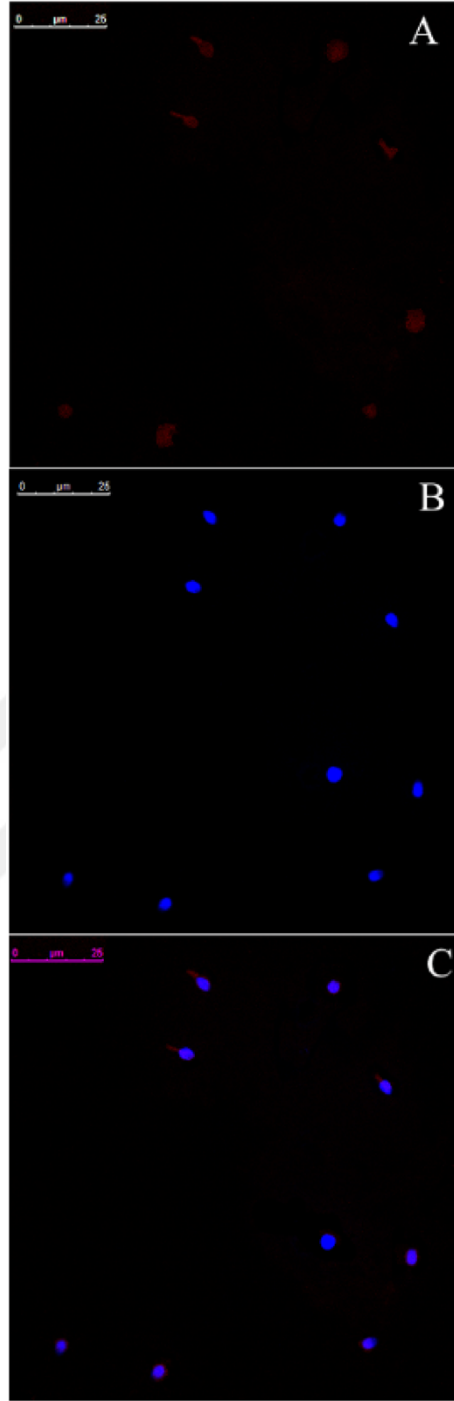
Tablo 6.2. MMP yüzdelerinin istatistiksel farkı

Parametre	Ortalama±s.s		p değeri
	Normal (n:30)	Asteno (n:30)	
Yüksek MMP ^a	63.9±16.8	30.8±14.3	<0.0001 (****)

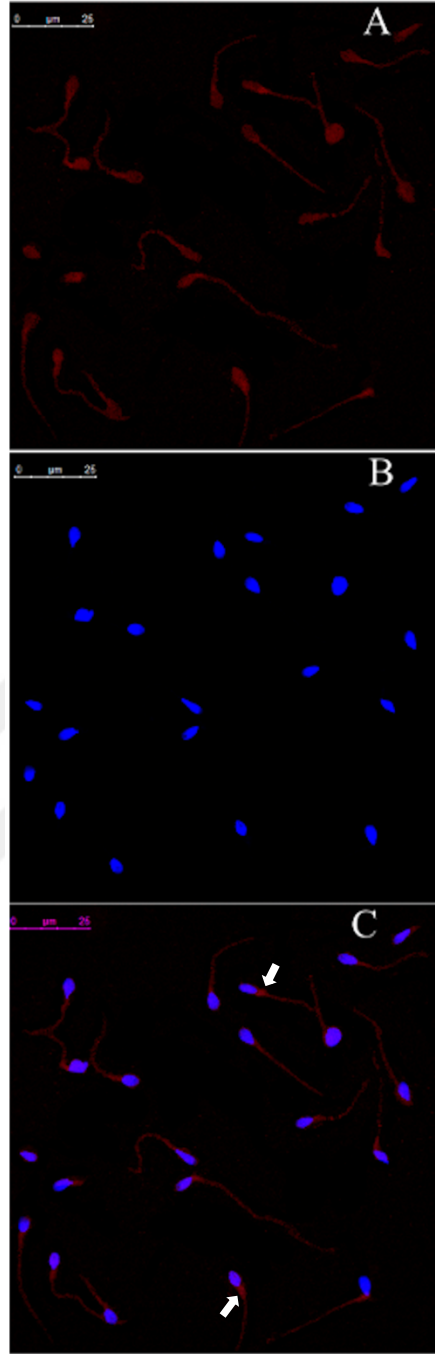
^aStudent t test

6.3. ATG-5 Ekspresyonları ile Otofajinin Değerlendirilmesi

İmmünfloresan işaretleme ile otofaji ilişkili protein ATG-5'in ekspresyonu ve lokalizasyonu incelenmiştir. Her iki grupta da ATG-5'in spermin baş, boyun ve kuyruk kısmında ekspresyonu gözlemlenmiştir (Resim 6.3.1., Resim 6.3.2.). Mitokondriler spermin boyun kısmında dizili bulunduğu için boyun kısmında ışımının gözlenmesi bize ATG-5'in mitofaji sürecinde rol oynadığını kanıtlar niteliktedir. Floresan ışımaların yoğunluğu ölçüldüğünde gruplar arası anlamlı fark bulunmuştur. ATG-5 normosperm grubunda (42.3 ± 13.4) astenozoospermi grubuna (65.0 ± 19.0) göre daha az floresan yoğunluğu göstermiştir ve fark istatistiksel olarak yüksek anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$) (Tablo 6.3.1.)



Resim 6.3.1. Normosperm grubunda ATG-5 proteininin IF işaretlenmesi. A: ATG-5 proteininin varlığının gösterilmesi. Spermilerin baş ve boyun bölgelerinde daha belirgin şekilde lokalize olduğu görülmekte. B: DAPI ile sperm nukleuslarının boyanmış görüntüsü. C: iki boyamanın birleştirilmiş görüntüsü. 63X, konfokal mikroskop



Resim 6.3.2. Asterozoospermi grubunda ATG-5 proteininin IF işaretlenmesi. A: ATG-5 proteininin floresan ışması. B: DAPI ile sperm nukleuslarının boyanmış görüntüsü. C: iki boyamanın birleştirilmiş görüntüsü. Asterozoospermi grubunda daha fazla ışma olduğu ve spermilerin baş, boyun ve kuyruklarında lokalize olduğu görülmektedir. Işımanın en yoğun olduğu bölge olarak boyun kısımları dikkat çekmektedir (beyaz ok). Mitokondrilerin bulunduğu boyun kısmında görülen bu yoğunluk mitofajinin arttığına göstergesidir. 63X, konfokal mikroskop

Tablo 6.3.1. ATG-5 ve cyt-c proteinleri floresan yoğunlukları

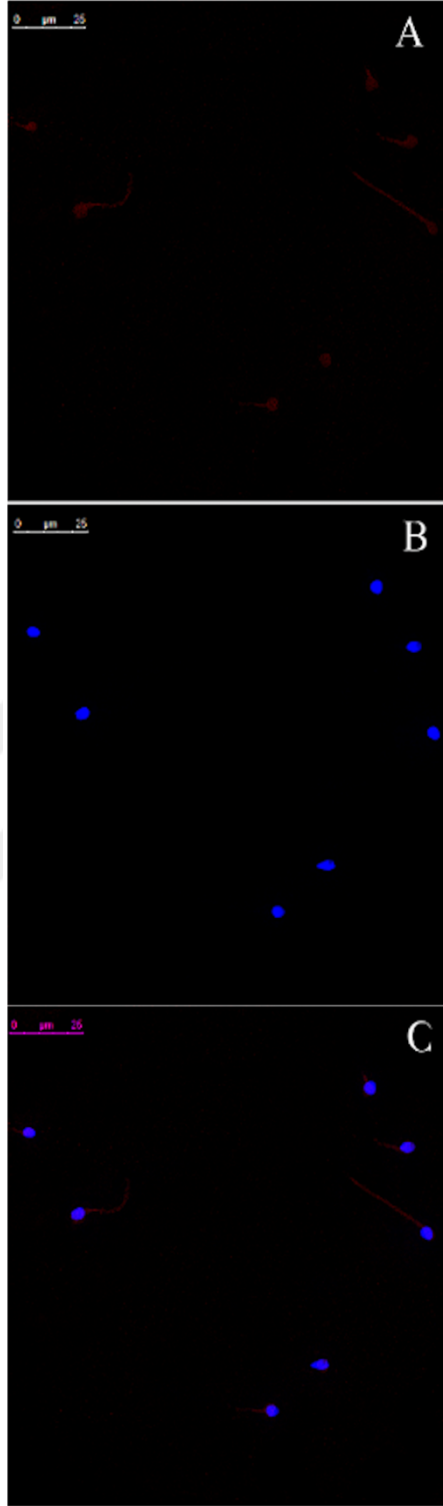
Parametre	Ortalama±s.s		p değeri
	Normal (n=30)	Asteno (n=30)	
ATG-5 ^a	42.3±13.4	65.0±19.0	<0.0001 (****)
Cyt-c ^b	47.1± 16.1	67.2±20.9	<0.0001 (****)

^aStudent t test

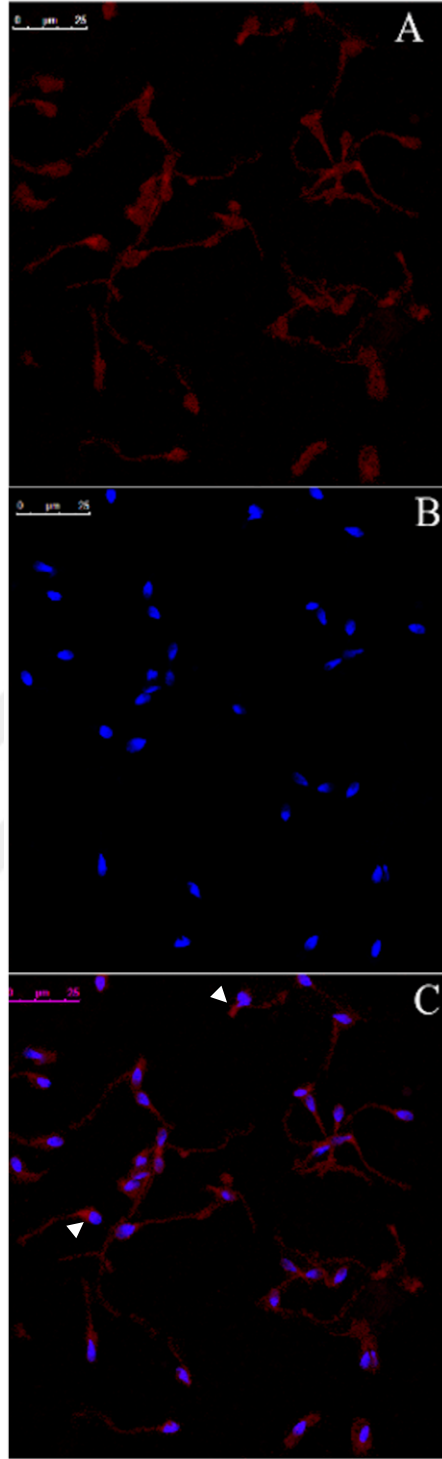
^bMann Whitney U test

6.4. Cyt-c Ekspresyonları ile Apoptozun Değerlendirilmesi

Cyt-c floresan işaretlemesi yapıldığında iki grupta da belirli seviyede apoptoz başlangıcı olduğu tespit edilmiştir (Resim 6.4.1., Resim 6.4.2.). Normospermi örneklerinde cyt-c beklenenin aksine azımsanmayacak oranda ışına yapmıştır. Bu örneklerin erkek faktör olmayan hastalara ait olduğu düşünüldüğünde sonuç şaşırtıcıdır. Astenozoospermi (67.2±20.9) grubu normospermle (47.1± 16.1) karşılaştırıldığında daha yüksek oranda cyt-c ekspresyonu göstermiştir. Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.0001) (Tablo 6.3.1.).



Resim 6.4.1. Normosperm grubu cyt-c proteininin IF işaretlenmesi. A: Cyt-c proteininin floresan ışması. B: DAPI ile sperm nukleuslarının boyanmış görüntüsü. C: : iki boyamannın birleştirilmiş görüntüsü. Spermilerin baş, boyun ve kuyruk bölgelerinde ışmalar görülmüştür. 63X, konfokal mikroskop



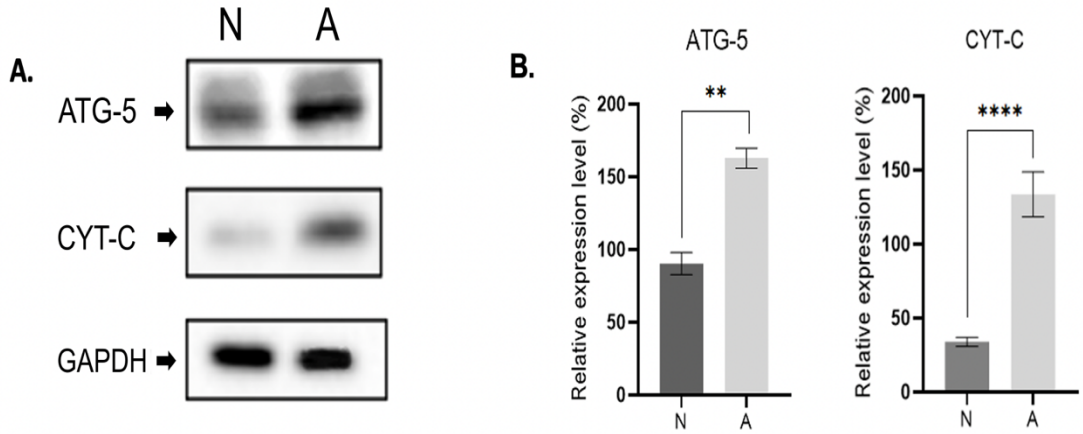
Resim 6.4.2. Astenozoospermi grubu cyt-c proteininin IF işaretlenmesi. A: Cyt-c proteininin floresan ışması. B: DAPI ile sperm nukleuslarının boyanmış görüntüsü. C: iki boyamanın birleştirilmiş görüntüsü. Normosperme göre daha yüksek bir ışıma tespit edilmiştir. Ayrıca bazı spermelerde boyun bölgesinin daha şiddetli ışıma yaptığı göze çarpmaktadır (beyaz ok başı). 63X, konfokal mikroskop

6.5. Western Blot Sonuçları

Proteinlerin ekspresyon miktarları WB yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bant yoğunluğunun (Şekil 6.5.1.) ölçülmesi sonrası ATG-5 ve cyt-c proteinlerinin miktarı astenozoospermi grubunda normospermi grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (Tablo 6.5.1.). ATG-5 ekspresyonu p değeri 0.003 bulunurken, cyt-c ekspresyonu p değeri 0.0003 bulunmuştur. Sonuçlara göre apoptoz ilişkili protein cyt-c astenozoospermi grubunda daha yüksek anlamlı bir fark göstermiştir. Dolayısıyla mitofajideki artışın apoptoza gitme oranını oldukça fazla etkilediği bulunmuştur.

Tablo 6.5.1. Protein ekspresyon seviyeleri istatistiksel değerlendirmesi

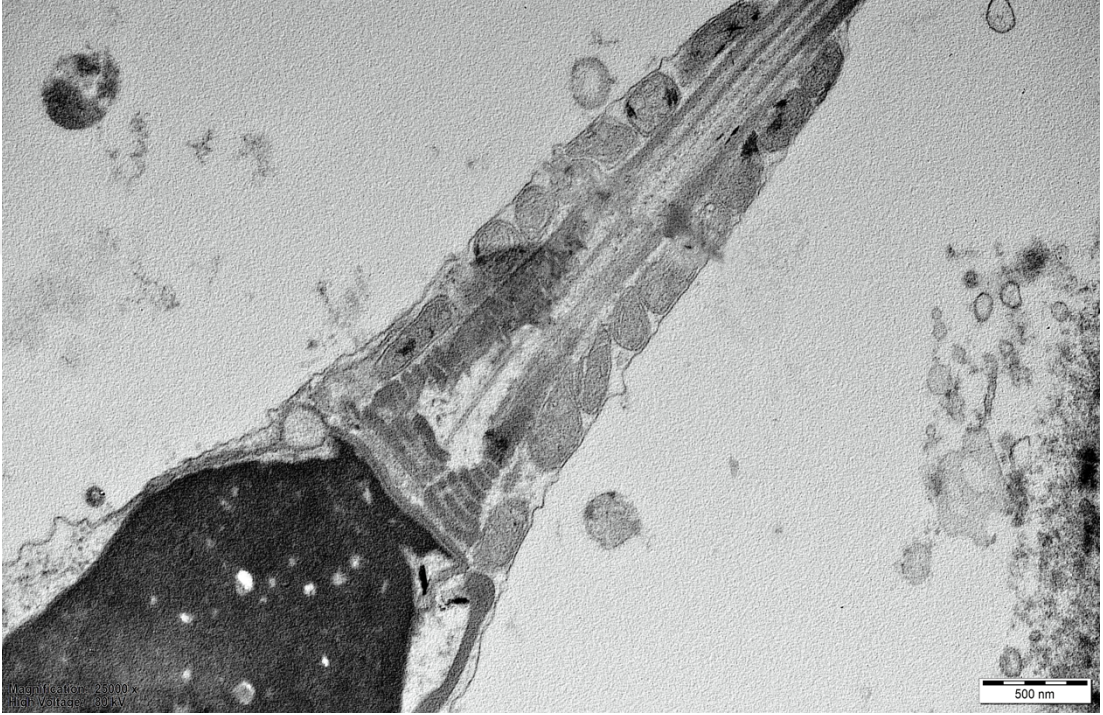
Göreceli ekspresyon seviyesi	Ortalama±s.s		p değeri
	Normal	Asteno	
ATG-5	90.3±7.59	163±6.89	0.003 (**)
Cyt-c	34.0±5.14	134±26.2	0.0003 (***)



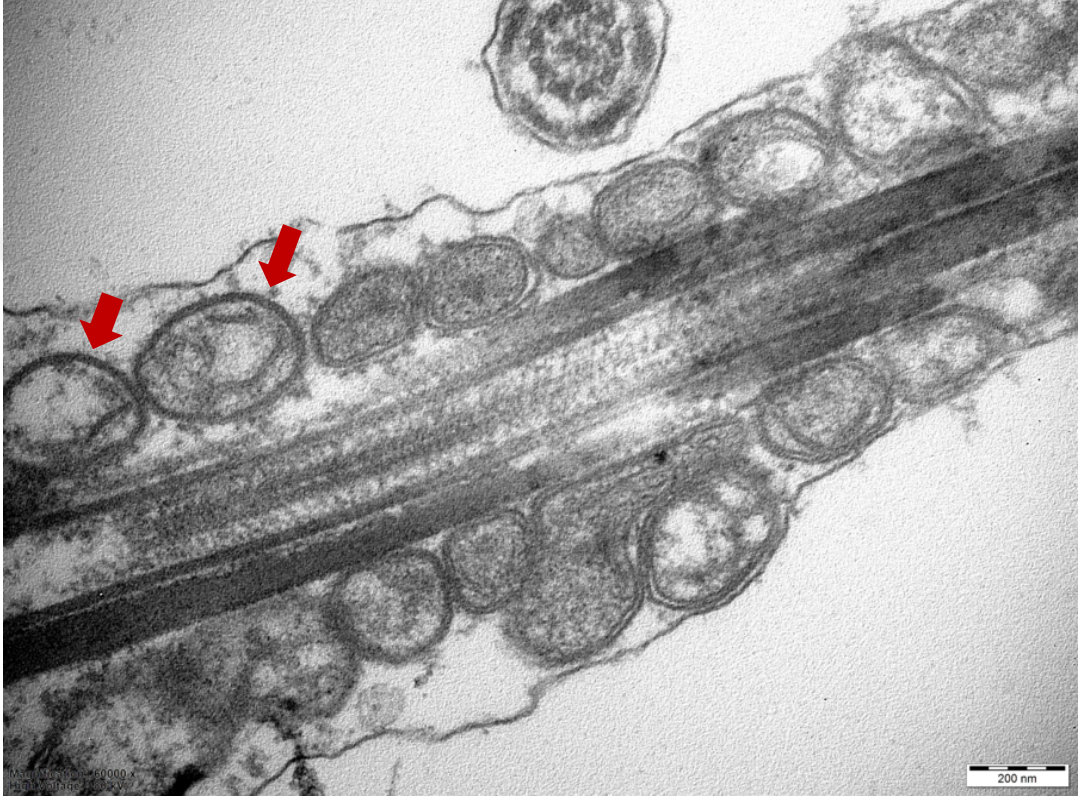
Şekil 6.5.1. Western blot protein ekspresyon miktarları. A: ATG-5, cyt-c ve kontrol proteini GAPDH bantları. B: protein ekspresyon seviyeleri arası fark grafiği.

6.6. Ultrasütrüktürel inceleme sonuçları

Ultra ince kesitlerin elektron mikroskopuyla görüntülenmesi sonucunda normosperm örneklerinde mitokondriler aksonem çevresinde hizalı ve düzgün bir şekilde dizili ve yoğun bir krista yapısına sahip bulunmuştur (Şekil 6.6.1.). Astenozoospermi grubunda ise birtakım değişiklikler gözlenmiştir. Mitokondrilerde krista organizasyonunda bozulmalar, intermembran aralığının genişlemesi, şişme ve boyun bölgesinde mitokondrilerin doğru şekilde konumlanamaması en belirgin değişikliklerdir (Resim 6.6.2.). Bununla birlikte bazı mitokondrilerin etrafında otofagozom benzeri yapısal oluşumlar görülmüştür (Resim 6.6.3., Resim 6.6.4). Bu veriler mitofajinin varlığına işaret etmektedir.



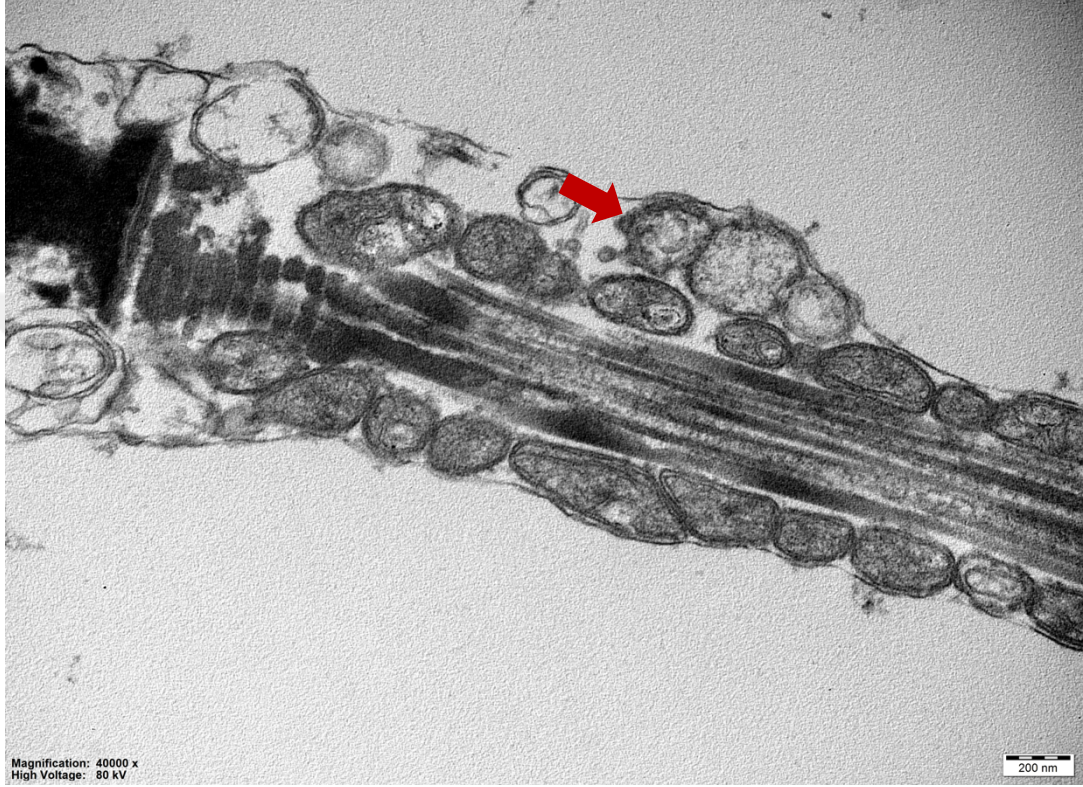
Resim 6.6.1. Normosperm grubu EM görüntüsü. Astenozoospermi grubuyla kıyaslandığında mitokondrilerin daha hizalı bir şekilde organize olduğu görülmektedir. 25.000 X.



Resim 6.6.2. Asterozoospermi grubu sperminin boyun bölgesinin EM görüntüsü. Mitokondrilerin flagella çevresinde dizildiği görülmektedir. Ancak bazılarında krista organizasyonunun bozulduğu belirgin şekilde göze çarpmaktadır (kırmızı ok). Mitokondrinin işlev kaybı sonucu ölüme gittiğini düşündürmektedir. 60.000X



Resim 6.6.3. Asterozoospermi grubu sperminin otofajik membran EM görüntüsü. Mitokondrilerin yakınında çeşitli membran benzeri yapıların olduğu görülmekte ve bunların otofajik veziküller olduğu düşünülmektedir (kırmızı ok). 40.000X



Resim 6.6.4. Astenozoospermi grubunda otofagozom EM görüntüsü. Kırmızı ok ile gösterilen yapı çift membranlı otofagozomdur. Hasarlı mitokondriyi çevrelediği düşünülmektedir. 40.000X

6.7. Antioksidan enzim aktiviteleri

Semen örneklerindeki antioksidan miktarları ve gruplar arası farkı Tablo 6.7.1.'de görülmektedir. Genel olarak astenozoospermi grubunda antioksidan miktarının azaldığı görülmektedir.

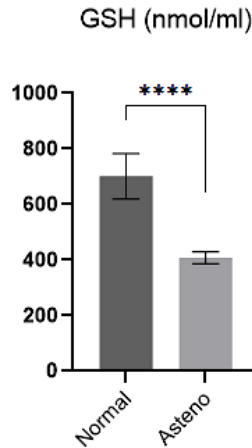
Tablo 6.7.1. Antioksidan enzim değerleri

Parametre	Ortalama±s.s		p değeri
	Normal (n=30)	Asteno (n=30)	
GSH (nmol/ml) ^a	701±448	408±114.6	<0.0001 (****)
FRAP (nmol/ml) ^a	1353.74±435	940±217.1	<0.0001 (****)
GSH-PX (nmol /dk/ml) ^a	56.7±11.2	45.7±11.4	0.0011 (**)
SOD (IU/ml) ^a	116±40.4	70.4±12.7	<0.0001 (****)

^aMann Whitney U test

6.7.1. GSH

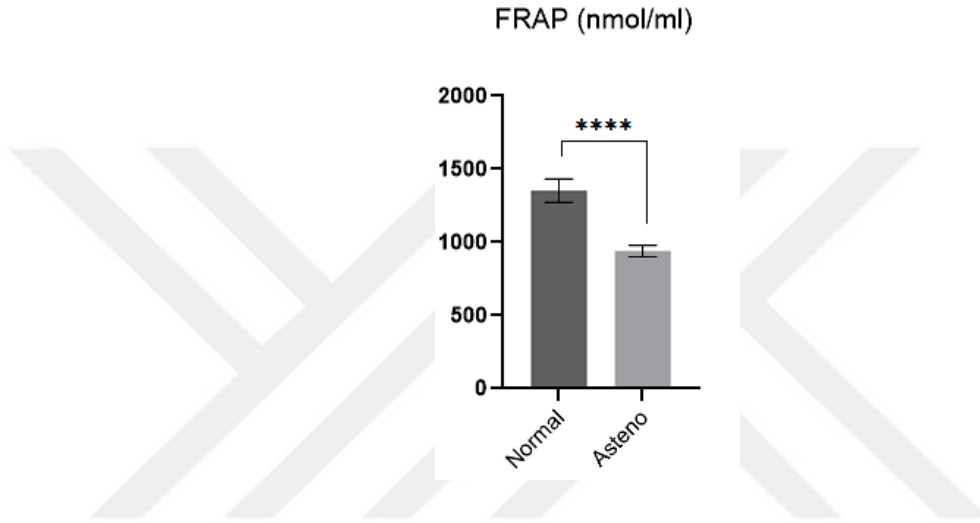
Astenozoospermi grubundaki seminal plazma GSH değeri normosperm grubundan düşük bulunmuştur. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.0001) (Şekil 6.7.1.1.)



Şekil 6.7.1.1.. Normosperm ve astenozoospermi grupları GSH miktarları

6.7.2. FRAP

Antioksidan kapasiteyi gösteren FRAP incelendiğinde normospermi grubunda oldukça fazla miktarda olduğu görülmüştür. Astenozoospermi grubunda ise daha düşük oranda bulunmuştur (Şekil 6.7.2.1.).Gruplar arası anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.0001$). Bu düşüğe oksidatif stresin neden olduğu düşünülmektedir.

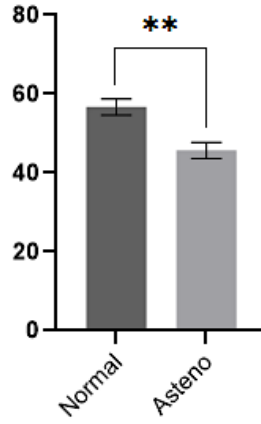


Şekil 6.7.2.1. Normosperm ve astenozoopermi grupları FRAP miktarları

6.7.3. GSH-Px

Glutasyon peroksidaz aktivitesi incelendiğinde diğer antioksidanlara kıyasla iki grup arasında daha az anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p=0.0011$) (Şekil 6.7.3.1.). Ancak yine de normosperm grubunda miktarının daha yüksek olduğu bulunmuştur.

GPX (nmol /dk/ml)

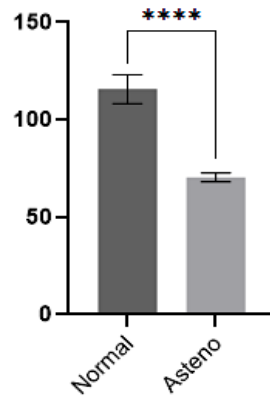


Şekil 6.7.3.1. Normosperm ve astenozoospermi grupları GSH-Px miktarları

6.7.4. SOD

Serbest radikallere karşı savunmada görev alan SOD miktarı beklendiği gibi normosperm grubunda yüksek bulunurken astenozoospermi grubunda düşük bulunarak anlamlı fark göstermiştir ($p < 0.0001$) (Şekil 6.7.4.1).

SOD (IU/ml)



Şekil 6.7.4.1. Normosperm ve astenozoospermi grupları SOD miktarları

6.8. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Değerlendirmesi

Gruplarda oksidatif stresin varlığını incelemek için MDA ve AOPP miktarları incelenmiştir (Tablo 6.8.1). Sonuçlara göre astenozoospermi grubunda oksidatif stresin arttığı ve anlamlı fark gösterdiği bulunmuştur.

Tablo 6.8.1. Oksidatif stresin değerlendirilmesi

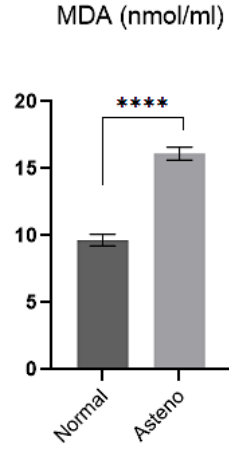
Parametre	Ortalama±s.s		p değeri
	Normal (n=30)	Asteno (n=30)	
MDA (nmol/ml) ^a	9.66±2.40	16.1±2.58	<0.0001 (****)
AOPP (pmol/ml) ^b	4.12± 1.99	8.45± 2.43	<0.0001 (****)

^aStudent t test

^bMann Whitney U test

6.8.1. MDA

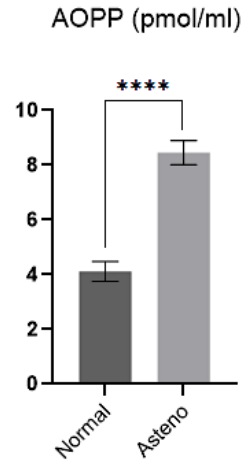
Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA miktarı seminal plazmada bakıldığında astenozoospermi grubunda (16.1±2.58) normosperm grubundan (9.66±2.40) oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak yüksek anlamlı çıkmıştır (p<0.0001) (Şekil 6.8.1.1)



Şekil 6.8.1.1. Normosperm ve astenozoospermi grupları MDA miktarları

6.8.2. AOPP

Protein hasarının göstergesi olan AOPP astenozoospermi grubunda normosperm grubunun iki katından daha fazla saptanmıştır. Gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$) (Şekil 6.8.2.1.)



Şekil 6.8.2.1. Normosperm ve astenozoospermi grupları AOPP miktarları

6.9. Mitofaji ve Apoptoz Korelasyonu

Astenozoospermi ve normosperm grubunda farklı miktarda ifade edildiği bulunan ATG-5 ve cyt-c proteinlerinin birbirleriyle korelasyonu istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuca göre her iki grupta bu iki antikor arasında pozitif bir korelasyonun olduğu bulunmuştur (Tablo 6.9.1.). ATG-5 ve cyt-c korelasyonunda, normosperm grubu p değeri <0.0001 bulunurken astenospermi grubunda p değeri 0.0002 bulunmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda mitofaji ve apoptozun birbirini indüklediği sonucuna varılmıştır.

Tablo 6.9.1. ATG-5 ve cyt-c korelasyonu

	Normo ATG-5 (n=30)	Asteno ATG-5 (n=30)
Normo cyt-c (n=30)	r=0.750 ^a p<0.0001	—
Asteno cyt-c (n=30)	—	r=0.632 ^b p=0.0002

^aPearson korelasyonu

^bSpearman korelasyonu

6.10. Oksidatif Stres ve ATG-5, cyt-c Korelasyonu

Oksidatif stresin astenozoospermi grubunda arttığı ve buna paralel olarak ATG-5 ve cyt-c protein miktarlarının arttığını gözlemlemiştik. Bu veriler doğrultusunda oksidatif stresle belirtilen proteinler arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edildi. Sonuçlara bakıldığında ATG-5 ve cyt-c miktarları ile oksidatif stres belirteçleri MDA ve AOPP arasında korelasyon olmadığı görüldü (p>0.05) (Tablo 6.10.1.).

Tablo 6.10.1. ATG-5 ve Cyt-c seviyelerinin MDA ve AOPP ile korelasyonu

	N	NORMO				ASTENO			
		MDA		AOPP		MDA		AOPP	
		r	p	r	p	r	p	r	p
ATG-5 ^a	30	-0.026	0.890	0.280	0.135	-0.329	0.075	-0.081	0.67
Cyt-c ^b	30	-0.070	0.714	0.074	0.696	-0.255	0.18	-0.28	0.14

^aPearson Korelasyonu

^bSpearman Korelasyonu



7. TARTIŞMA

Testiste üretimleri sırasında spermatozoa, akrozom (Golgi keseciğinden türetilen), nukleus ve sperm kuyruğunun orta kısmında yer alan mitokondriler hariç hücre organellerinin çoğunu kaybetmektedir. Her biri önemli olsa da mitokondri, hücrel metabolizma ve kuyruk hareketi için gerekli enerjiyi sağlamak, ROT üretmek gibi görevleri nedeniyle hareket problemi olan sperm örneklerinde akla gelen ilk organeldir. Mitokondrilerin yapısındaki veya işleyişindeki herhangi bir bozukluk, homeostazı bozarak farklı yollarla hücre üzerine olumsuz etki göstermektedir (103).

Mitokondriden üretilen ROT, iki ucu keskin bir kılıçtır: spermatozodaki tirozin fosforilasyonu, kolesterol akışı ve sperm-yumurta etkileşimi için çok önemlidir. Ancak aynı zamanda oksidatif stres yoluyla patolojik süreçlerde de rol oynamaktadır (72). Erkek kısırlığı vakalarının yaklaşık %30-80'inin spermatozodaki ROT aracılı hasarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (104). Spermatozodaki orta miktarda ROT, sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve döllenme için gereklidir. Ancak spermatozoda aşırı ROT üretimi, lipid peroksidasyonunu ve DNA hasarını artırarak erkek fertilitasını etkilemektedir (105). Ayrıca aşırı ROT, hücre içi ATP konsantrasyonunu azaltır, bu da flagella atım frekansının ve spermatozodaki fosforilasyonun azalmasına neden olur ve sperm motilitesinin kaybına neden olur (106).

Lipit peroksidasyonu, sperm hücrelerindeki oksidatif stresin spesifik bir göstergesi olarak kabul edilir ve öncelikle malondialdehit gibi lipid peroksidasyonunun son ürünlerini tespit ederek değerlendirilmektedir. Yapılan bir çalışmada astenoteratospermi olan hastalarda MDA oranının yüksek olduğu ve bunun vitamin e uygulamasıyla düşürülebileceği ve dolayısıyla hareketin artacağı bildirilmiştir. Antioksidan takviyesinin oksidatif stresin azaltılması için etkili bir yöntem olabileceğini vurgulamışlardır (107). MDA, SOD ve GSH-Px oranları infertil erkeklerde daha yüksek bulunmuştur. MDA sperm hareketliliği ile negatif korelasyon göstermiştir (108). Sigara kullanımına bağlı olarak MDA artışının, erkeklerde sperm motilitesi ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (109). Bizim çalışmamızda astenozoospermi grubunda MDA miktarının arttığı bulunmuştur. Bu da MDA'nın sperm hareketini negatif etkilediğine dair literatürdeki verilerle benzerlik göstermektedir.

Oksidatif stres belirteçlerinden birisi de proteinlerin oksidasyonunu gösteren AOPP'dir. Fertil erkeklere kıyasla azospermik ve teratospermik hastaların seminal plazmasında AOPP'nin arttığı bulunmuştur (110). Tersine boğa spermleriyle yapılan bir çalışmada taze ve yüksek hareketliliğe sahip semen örneklerindeki AOPP oranı düşük hareketlilerden daha yüksek bulunmuştur. Bunun da yüksek mitokondriyal aktivite sonucu artan oksidatif stres kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir (111). Çalışmamız sonuçlarına göre AOPP düşük hareketli spermlerde daha yüksek oranda bulunmuştur. Oksidatif stresin artmasına bağlı olarak mitokondrilerde oluşan hasar sonucu bu artışın gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Spermin ROT'ların neden olduğu hasara karşı iyi bilinen duyarlılığı ve sınırlı savunma kapasitesi nedeniyle, oksidan ve antioksidan dengenin bozulmasına yol açan tüm çevresel faktörler potansiyel olarak spermin fertilizasyon kapasitesine etki etmektedir (69, 112). Ayrıca, antioksidanların kullanımı insan sperm DNA fragmentasyonunun göreceli olarak korunmasına yol açmıştır ve ICSI sonucunu iyileştirmiştir (113,114). Bizim çalışmamızda astenozoospermi grubunda FRAP miktarı normosperm grubundan daha düşük bulunmuştur. Ancak semen parametreleriyle arasında korelasyon bulunmamıştır. Gholinezhad vd. (115) infertil erkeklerde seminal plazma FRAP'ının anlamlı derecede düşük olduğunu ve sperm sayısı ve hareketliliği ile pozitif korelasyon gösterdiğini göstermişlerdir. Nasiri vd. (116) astenoteratozoospermik grupta seminal plazma FRAP konsantrasyonlarının, sağlıklı erkeklerden oluşan normozoospermik grupla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük olduğunu bulmuşlardır. Bir başka çalışmada fertil normozoospermik gruba kıyasla astenoteratozoospermi grubu ve oligostenoteratozoospermi grubunda seminal plazma FRAP miktarı ile sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (117). Bir diğer çalışma ise semen parametreleri ile seminal plazmadaki FRAP konsantrasyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulamamıştır. Ancak kan serumundaki FRAP konsantrasyonu normosperme göre daha düşük çıkmış ve fark anlamlı bulunmuştur (118).

Yapılan bir çalışmada sperm dondurma işlemi öncesi seminal plazma antioksidanlarının ölçümü yapılmış ve çözme sonrası SOD, GSH-Px, FRAP aktivite seviyelerinin, sperm hareketliliği ve plazma membran bütünlüğü ile pozitif ve hücre içi ROS seviyeleri ile negatif olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (119). Çalışmamız

sonucuna göre GSH-Px astenozoospermi grubunda daha az miktarda bulunmuştur ve total sperm sayısı ve progresif motilite ile pozitif korelasyon göstermiştir. GSH'nin spermatozoanın hareketliliğini sağlayan orta parça ve kuyruk bölgesinde lokalize olduğu bulunmuştur (120). Sperm hareketliliği seminal GSH düzeyleriyle pozitif ilişkilidir (121). GSH'nin sülfidril gruplarının aşırı oksidasyonu hareketliliğin kaybına neden olmaktadır. İnfertil erkeklerin daha düşük GSH'ye sahip olduğu bilinmektedir (122). GSH'nin aşırı azalmasının mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (123). Astenozoospermi grubunda MDA ve AOPP artışı ile paralel olarak ATG-5 ve cyt-c proteinlerinin de artmış olduğu görüldü. Ancak bu iki protein ve MDA / AOPP seviyeleri arasında korelasyon bulunmamıştır. Bu da oksidatif stres ilişkili otofaji ve apoptoz aktivasyonu olmadığını düşündürmektedir.

Normal mitokondride, transmembran potansiyel farkı, mitokondriyal ATP üretimini yönlendiren elektron taşınması ve OXPHOS sürecini yansıtır. Bu nedenle MMP, mitokondriyal aktivitenin önemli bir göstergesi olarak hizmet eder ve dolayısıyla sperm kalitesini yansıtmaktadır (4). Sperm akrosin aktivitesini, akrozomal reaksiyonu ve kromatin bütünlüğünü korumak için mitokondriyal işlevsellik gerekli olabilir (92). MMP, sperm hareketliliğinin potansiyel bir düzenleyicisi ve göstergesi olarak düşünülebilir ve dolayısıyla doğrudan erkek fertilesiyle ilişkilidir (124). Oligozoospermi, astenozoospermi ve oligoastenozoospermisi olan genç yetişkinlerden alınan spermatozoanın, normal spermatozoaya göre önemli ölçüde daha düşük MMP'ye sahip olduğu bulunmuştur; bu da MMP'nin sperm motilitesi ve fertilesinde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (4). Spermde MMP'nin bozulmasının, ATP seviyelerinin azalmasıyla birlikte ROT'un aşırı üretimine neden olduğu bulunmuştur (93). Çalışmamızda hareket problemi olan astenozoospermi grubunda MMP'nin oldukça düştüğü görülmüştür. Oksidatif stresle paralel olarak bu düşüşün ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde toplam hareketlilik ile MMP arasında pozitif bir korelasyon olduğu ortaya koyulmuştur; bu da sperm hareketliliğinin mitokondrinin fonksiyonel bütünlüğüne bağlı olabileceğini düşündürmektedir (125) Düşük sperm MMP'si, IVF uygulanan çiftlerde düşük döllenme oranlarıyla ilişkilendirilen düşük kaliteli sperm hücrelerini yansıtır. Ortaya çıkan oksidatif stres, spermatozoayı, MMP kaybından, DNA fragmantasyonuna ve sonuçta hücre ölümüne yol açan içsel apoptotik kaskad boyunca yönlendirmektedir

(126). Prohibitin, ETS komplekslerinin yapısal bütünlüğünün korunmasına yardımcı olan önemli bir iç mitokondriyal membran proteindir. Prohibitinin, astenozoospermi ve/veya oligoastenozoospermisi olan infertil erkeklerde MMP'yi değiştirerek ve ROS seviyelerini artırarak sperm hareketliliğini düzenlediği görülmektedir (127). Bu hasta gruplarında mitokondriyal ROS ile lipid peroksidasyonu arasında pozitif bir korelasyonun yanı sıra mitokondriyal ROS'un prohibitin ekspresyonu, yüksek MMP ve sperm hareketliliği ile negatif korelasyonu da rapor edilmiştir (128). İncelemelerimiz sonucunda lipid peroksidasyonu son ürünü MDA miktarında artış ve MMP'de düşme ile astenozoospermi grubundaki spermilerin hareketinin azalmış olabileceği kanısına vardık. Bu durum araştırılan mitofaji ve apoptoz süreçlerini de indüklemiş olabilir.

Mitokondriyi hedef alan katyonlar tarafından oksidatif fosforilasyonun hafif artmasının hem otofajiyi hem de mitokondri seçici mitofajiyi indükleyerek terapötik etkilere katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (129). Otofajinin spermatozoayı stresin neden olduğu hasardan koruduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada kolistin uygulaması sonrası ratlarda serbest radikallerin artışıyla ilişkili olarak otofajinin arttığı bulunmuştur (130). Bizim çalışmamızda otofaji ilişkili protein ATG-5'in ekspresyonu değerlendirilmiştir. Sonuçlarımıza göre astenozoospermi grubunda ATG-5 miktarının arttığı bulunmuştur. Oksidatif stresin de arttığı bilindiğinden bu artışın stres kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Böylece spermelerde hareket probleminin ortaya çıktığı kanısına varılmıştır. Daha önce insan spermide ATG-5'in incelendiği çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız insan normosperm ve astenozoospermi örneklerinde ATG-5'in incelendiği ilk çalışma olmuştur.

Otofaji inhibisyonunun spermelerde motilitenin, canlılığın, ATP'nin ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (77). Kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) çok yönlü sinyal moleküllerinden biridir ve mitokondri, hücresel Ca^{2+} 'un önemli düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Ca^{2+} 'un otofaji regülatörlerinden birisi olduğu bilinmektedir. Ancak birçok çalışma Ca^{2+} 'un otofajik akışı antagonize edebileceğini bildirmiştir (131). Spesifik olarak, CaPN1 (kalpain 1) aracılı ATG-5 klivajı için Ca^{2+} vazgeçilmezdir ve bu ATG-5 bölünmesi ATG-12-ATG-5 konjugasyonunu inhibe ederek otofaji indüksiyonunu önlemektedir (132). Esansiyel otofaji geni ATG-5'in baskılanmasının, anormal mitokondri birikimine ve olgun kas

dokusunda verimsiz farklılaşmaya yol açtığı bildirilmiştir (133). ATG-5'in sperm oluşumu sırasında nükleer matürasyon, akrozom oluşumu, rezidüel cisimlerin uzaklaştırılması, mitokondri yeniden düzenlenmesi gibi birden fazla role sahip olduğu ileri sürülmüştür (89). ATG-5 ekspresyonu artan spermelerde hareketin azalmış olduğunu gözlemledik. Bu durum muhtemelen aşırı otofajik aktivasyon sonucunda hasarlı mitokondrilerin doğru şekilde ortadan kaldırılamamasından kaynaklanmaktadır.

Son zamanlarda, çeşitli çalışmalar, fizyolojik ve patofizyolojik koşulların neden olduğu erkek infertilitesinde spermatogonyanın spermatozoaya farklılaşması sürecinde otofajinin sitoprotektif rolünü göstermiştir. Otofajinin aktivasyonunun, spermatogonyal kök hücrelerin korunmasında ve farklılaşan spermatogonyanın hayatta kalmasında koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir. Aktin benzeri 7 A'nın (ACTL7A) kaybının, otofaji inhibisyonu yoluyla kusurlu akrozom-akroplaksozom-manşet kompleksine neden olduğu ve bunun sonucunda küçük başlı spermelerin geliştiği bildirilmiştir (134). Liu ve diğerleri (135) *LC3-II*, *LC3-II/LC3-I* oranı, *ATG-5* ve *Beclin-1* dahil olmak üzere otofaji aktivasyonu belirteçlerinin üreme toksik maddesi tri-orto-kresil fosfat (TOCP) ile tedaviden sonra sıçan spermatogonyal kök hücrelerinde arttığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada ise testiküler hasar oluşturulan ratlarda l-karnitinin etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre l-karnitin, testislerde otofajiyle ilişkili genler *Beclin-1*, *ATG-5* ve *ATG-12*'nin ekspresyonunu artırmıştır. Böylece strese karşı koruma sağladığı düşünülmüştür (136). Ke vd. (137) germ hücresine özgü *Beclin-1* nakavt farelerin testislerinde, otofajinin inhibisyonu sonucunda spermiyogenezde bozulma görüldüğünü ve bunun fertilitenin azalmasına katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada toksisite oluşturulan spermatositlerde aşırı apoptoz ve otofaji olduğu bununla beraber sperm sayısında azalma, sperm hareketliliğinde azalma ve morfolojik bozukluk oranında artış gibi hasarlara neden olduğu bulunmuştur (138). Germ hücrelerinde otofajinin etkisi incelendiğinde, hücrenin hücre hasarını en aza indirme ve hayatta kalmayı artırma çabasının bir parçası olarak ROT ile hasar görmüş proteinlerin ve mitokondrilerin otofaji ile temizlendiği gözlemlenmiştir. Ubikitin ligaz nöropilin (Nrdp1), mitofajiyle ilişkili Parkin'in ubiquitinasyonunu düzenlemektedir ve pro-otofajik protein kalisin bağlayıcı protein (CacyBP) ile etkileşime girmektedir. Nrdp 1'in knock-out edildiği

farelerde, Nrđp1'in otofajiyi düzenleyerek akrozom biyogenezini ve mitokondrilerin dizilimini kontrol ettiği bulunmuştur (139). Yukarıda bahsedilen sonuçlar germ hücrelerinin üretimi aşamasında otofajinin etkisini gösteren çalışmalara aittir. Ancak matür insan spermlerinde görülen çeşitli problemler ve otofaji ilişkisinin araştırıldığı çalışma sayısı nadirdir. Çalışmamız sonucunda bu konuda literatürde yer alacak yeni bulgular elde edilmiştir.

Otofajinin embriyonik gelişim sırasında hücre ölümünde önemli işlevleri vardır. *Atg* genlerinin farelerde embriyonik gelişim sırasında apoptotik hücrelerin temizlenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (140). Ancak otofajinin hücre ölümünü teşvik ettiği veya önlediği konusunda tartışmalar mevcuttur. İnhibe edilen otofaji, apoptotik hücrelerin yüzdesini artırabilmektedir. Böylece otofajinin hücreleri apoptozdan koruduğu yönünde çalışma sonuçları ortaya çıkmıştır (141). Yin vd. (142) yaptıkları bir çalışmada otofajinin artmasının fare spermatozoidlerinin apoptozunu inhibe ederek spermatogenezini kurtaracağı sonucuna varmışlardır. Başka bir çalışmada dibütıl fitalat (DBP) uygulanmasının erkek germ hücrelerinde, apoptoz, ER stresi ve otofajinin eşlik ettiği testis atrofisini önemli ölçüde indüklediği bulunmuştur. ER stresinin ve otofajinin inhibisyonunun ise germ hücrelerinde ve testislerde DBP'nin neden olduğu hasarı önemli ölçüde ağırlaştırdığı görülmüştür (143). Radyofrekansa maruz kalan spermatozoid kök hücrelerinde ise apoptotik hücrelerin yüzdesinin artırmadığı ancak otofajinin inhibisyonunun, apoptotik hücrelerin yüzdesini artırdığı bulunmuştur (144). ER stresi sonucunda meydana gelen otofajinin incelendiği bir çalışmada ATG-5, ATG-7 ve ATG-5 + ATG-7'nin aşırı ekspresyonunun apoptozu inhibe edebildiği ve kondrositlerde hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (145). Ancak otofaji ve apoptozun hücre ölümünü teşvik etmek ve sonunda spermatogenezin yok olmasına yol açmak için antagonist değil ortak olarak hareket edebileceği de belirtilmiştir (146). Oksidatif streste apoptozun indüklenmesi üzerine yapılan çalışmalarda mitokondri ilişkili yollarla birlikte mitokondri ilişkili olmayan yolların da varlığına değinilmektedir. Çalışmamızda mitokondriden salınan cyt-c incelendiği ve astenozoospermi grubunda ekspresyonunun oksidatif stresle birlikte artmış olduğu gözlemlendiği için mitokondri ilişkili bir yolak üzerinden ROT etkisinde apoptozun indüklediği düşünölmektedir. Ayrıca otofaji ve apoptoz arasındaki korelasyon incelendiğinde gruplarda ATG-5 ve cyt-c arasında pozitif bir korelasyon

olduğu bulunmuştur. Bu da iki sürecin birbirini upregüle edecek şekilde etkilediğini göstermektedir.

Yousefi vd. (147) yaptığı bir çalışmada ATG-5 klivajının, cyt-c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu tetikleyerek apoptozu desteklediği bildirilmiştir. Apoptotik olmayan hücrelerde ATG-5 sitozolde ve mitokondri üzerinde dağınık bir boyanma göstermiştir. ATG-5'in sitozolden mitokondriye geçerek apoptozu indüklediği düşünülmektedir. Normalde ATG-5 33 kDa'dur ama apoptoz arttığında 24 kDa olan formu daha yüksek oranda tespit edilmiş ve bu da apoptozun göstergesi olarak düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada flutamid ve DEHP uygulamasıyla kriptorşid ratlar üretilmiştir. Uygulama sonrası cyt-c ekspresyonunun arttığı ve bununla paralel olarak otofaji belirteçlerinin de arttığı bildirilmiştir (148). Cyt-c normalde elektronları hızlı bir şekilde alıp verme yeteneğinden dolayı iyi bilinen bir ROS temizleyicisidir (149). Ancak DNA hasarına yanıt olarak çekirdeğe geçiş yaptığı ve burada kaspaz aktivitesinden bağımsız olarak kromatin kondensasyonunu indükleyerek apoptoz sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir (150).

Mitofajiyi izlemek için kullanılan tekniklerden biri transmisyon elektron mikroskopudur (TEM). TEM görüntüleri, organelin üst yapısı, İMM ve DMM bütünlüğü, mitokondriyal boyuttaki değişiklikler ve mitofajiden önceki mitokondri-ER etkileşimi hakkında değerli bilgiler sağlayabilir. Organelin otofajik membranlarla lokalizasyonu veya yakınlığı ve otofagozomun oluşumu, mitokondriyal otofaji için gerekli adımlardır (151). ATG-5 knock-out farelerde olgun spermler elektron mikroskopik incelendiğinde bozulmuş mitokondri yeniden düzenlemesinin germ hücrelerinde ATG-5 kaybına bağlı olarak ortaya çıktığı ve bunun sperm hareketliliğinde gözlenen azalmayı açıklayabileceği belirtilmiştir (89). Elektron mikroskopuyla görüntüleme sonuçlarına göre astenozoospermi grubunda mitokondrilerin krista yapısında organizasyon bozuklukları olduğunu bulduk. Bazı mitokondrilerde şişme şeklinde hacim artışı gözlenmiştir. En önemlisi ise otofagozom benzeri oluşumların ve içinde mitokondri olan otofagozomların bulunması mitofajinin normosperm grubuna göre daha fazla olduğunu kanıtlar niteliktedir. ,

8. SONUÇ

Çalışmamız sonuçlarına göre astenozoospermi grubunda mitofaji, apoptoz ve oksidatif stresin arttığı bulunmuştur. Mitofaji ve apoptoz arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Dolayısıyla bu iki süreçten herhangi birindeki artış diğèrinin de artmasına sebep olacaktır. İlginç bir şekilde oksidatif stres artışı ATG-5 ve cyt-c ile korelasyon göstermemiştir. Mitofaji ve apoptozun ROT bağımsız şekilde etkileşim gösterebileceği kanısına varılmaktadır.

Mitofaji ve apoptoz sadece ilişkili birer proteinle incelendiği için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Spesifik sinyal yolakları seçilip bu konuda detaylı incelemeler yapılması infertilitenin etiyolojisine dair yeni bilgilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Yin J, Ni B, Tian ZQ, Yang F, Liao WG, Gao YQ. Regulatory effects of autophagy on spermatogenesis. *Biology of Reproduction*. 96(3), 525–530, 2017.
2. World Health Organization . WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6. Geneva: WHO Press; 2021.
3. Vives-Bauza C, Przedborski S. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends Mol Med*. 17(3), 158-65, 2011.
4. Zhang WD, Zhang Z, Zhang LL, Fu T, Li YS, Zhang HZ. Oxygen free radicals and mitochondrial signaling in oligospermia and asthenospermia. *Molecular Medicine Reports* *Molecular Medicine Reports*. 0(4), 1875-1880, 2014.
5. Yefimova MG, Buschiazzi A, Burel A, Lavault MT, Pimentel C, Jouve G, et al. Autophagy is increased in cryptorchid testis resulting in abnormal spermatozoa. *Asian J Androl*. 21(6),570-576, 2019.
6. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):3448-3459.
7. Tamrakar SR, Bastakoti R. Determinants of infertility in couples. *Journal of Nepal Health Research Council*. 17;85–9, 2019.
8. Murdica V, Giacomini E, Alteri A, Bartolacci A, Cermisoni GC, Zarovni N, et al. Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation. *Fertility Sterility*. 111;897-908, 2019.
9. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*. 9(12):e1001356, 2012.
10. Salonia A, Bettocchi C, Carvalho J. EAU Guidelines on Sexual and Reproductive Health. Arnhem, The Netherlands : EAU Guidelines, 2020.
11. Ventimiglia E, Capogrosso P, Boeri L, et al.: Infertility as a proxy of general male health: results of a cross-sectional survey. *Fertil Steril*. 104(1):48–55, 2015.
12. Lotti F, Maggi M. Sexual dysfunction and male infertility. *Nat Rev Urol*. 15(5):287–307, 2018.

13. Raman JD, Nobert CF, Goldstein M: Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. *J Urol.* 174(5):1819–22, 2005.
14. Yu Q, Zhou Q, Wei Q, Li J, Feng C, Mao X. SEMG1 may be the candidate gene for idiopathic asthenozoospermia. *Andrologia.* 46: 158–166, 2014.
15. Liu KS, Mao XD, Pan F, An RF. Effect and mechanisms of reproductive tract infection on oxidative stress parameters, sperm DNA fragmentation, and semen quality in infertile males. *Reprod Biol Endocrinol.* 28;19(1):97, 2021.
16. Lai YM, Lee JF, Huang HY. The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril.* 67:1152–1155, 1997.
17. Seckin S, Ramadan H, Mouanness M, Gidon A, Thornton M, Merhi Z. A Case of Asthenozoospermia Following COVID-19 Infection. *Reprod Sci.* 29(9):2703-2705, 2022.
18. Alipour H, Duus RK, Wimmer R, Dardmeh F, Du Plessis SS, Jørgensen N, Christiansen OB, Hnida C, Nielsen HI, Van Der Horst G. Seminal plasma metabolomics profiles following long (4-7 days) and short (2 h) sexual abstinence periods. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 264:178-183, 2021.
19. Marshburn PB, Giddings A, Causby S, Matthews ML, Usadi RS, Steuerwald N. Influence of ejaculatory abstinence on seminal total antioxidant capacity and sperm membrane lipid peroxidation. *Fertility & Sterility.* 102(3), 705–710, 2014.
20. Borges EJ, Braga DPAF, Zanetti BF, Iaconelli A, Setti AS. Revisiting the impact of ejaculatory abstinence on semen quality and intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Andrology.* 7(2), 213–219, 2019.
21. Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol.* 53:35–40, 2010.
22. Daoud S, Sellami A, Bouassida M, Kebaili S, Ammar Keskes L, Rebai T, Chakroun Feki N. Routine assessment of occupational exposure and its relation to semen quality in infertile men: a cross-sectional study. *Turk J Med Sci.* 47:902–907, 2017.
23. Shu, F, Zhou X, Li F, Lu D, Lei B, Li Q, et al. Analysis of the correlation of CATSPER single nucleotide polymorphisms (SNPs) with idiopathic

- asthenospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 32: 1643–1649, 2015.
24. Figueroa E, Valdebenito I, Zepeda AB, Figueroa CA, Dumorne K, Castillo RL, Farias JG. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. *Rev Aquacult*. 1:12, 2015.
 25. Alchinbayev MK, Aralbayeva AN, Tuleyeva LN, Duysenbayeva SM, Makazhanov MA. Aneuploidies level in sperm nuclei in patients with infertility. *Mutagenesis*. 31(5):559-65, 2016.
 26. Song GJ, Lewis V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertil Steril*. 90(6):2238-44, 2008.
 27. Chan DC, Schon EA. Eliminating mitochondrial DNA from sperm. *Dev Cell*. 13;22(3):469-70, 2012.
 28. Wu H, Huffman AM, Whitcomb BW, Josyula S, Labrie S, Tougias E, Rahil T, Sites CK, Pilsner JR. Sperm mitochondrial DNA measures and semen parameters among men undergoing fertility treatment. *Reprod Biomed Online*. 38(1):66-75, 2019.
 29. Horani A, Ferkol TW, Dutcher SK, Brody SL. Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. *Paediatr Respir Rev* 18:18–24, 2016.
 30. Nicastro D, Schwartz C, Pierson J, Gaudette R, Porter ME, McIntosh JR. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. *Science*. 313:944–8, 2006.
 31. Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod*. 17:524–38, 2011.
 32. Escalier D, Toure A. Morphological defects of sperm flagellum implicated in human male infertility. *Med Sci* 28:503–511, 2012.
 33. Khelifa M, Coutton C, Zouari R, Karaouzene T, Rendu J, Bidart M., et al. F. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *American Journal of Human Genetics*. 94(1), 95–104, 2014.
 34. Curi SM. Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl*. 49:343–349, 2003.

35. Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit. *J. Androl.* 29, 469-487, 2008.
36. Mescher AL. *Junqueira Temel Histoloji, Atlas Kitap, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.* 2:434, 2016.
37. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji. 2. Baskı, İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi.* s. 335-36, 2016
38. Liebich A, Schmid N, Koupourtidou C, Herrmann C, Dietrich KG, Welter H, Ninkovic J, Mayerhofer A. The Molecular Signature of Human Testicular Peritubular Cells Revealed by Single-Cell Analysis. *Cells.* 19;11(22):3685, 2022.
39. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Ankara, Palme Yayıncılık.* s. 532-33, 2006.
40. Ruthig VA, Lamb DJ. Updates in Sertoli Cell-Mediated Signaling During Spermatogenesis and Advances in Restoring Sertoli Cell Function. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4;13:897196, 2022.
41. Misell LM., Holochwost,D, Boban D, Santi N, Shefi, S, Hellerstein MK. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *J. Urol.* 175, 242-246, 2006.
42. Rato L, Alves M, Socorro S. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol.* 9:330–338, 2012.
43. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays.* 22;423-430, 2000.
44. Paniagua R, Nistal M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *J. Anat.* 139, 535–552, 1984.
45. Goossens E, Tournaye H. Adult stem cells in the human testis. *Semin. Reprod. Med.* 31, 39–48, 2013.
46. Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 83, 2–7, 2019.
47. Alvarez Sedo C, Rawe VY, Chemes HE. Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Hum. Reprod.* 27, 1912–1921, 2012.
48. Sutovsky PMG. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis, in: C.J.D. Jonge, C.L.R. Barratt (Eds.), *The Sperm Cell:*

Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York. 1–30, 2006.

49. Ferramosca A, Zara V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Res Int.* 20, 2014.
50. du Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G, van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?. *Asian J Androl.* 17(2):230–235, 2015.
51. Sica V, Izzo V, Pedro JMB, Zamzami N, Maiuri MC. Chapter 3 e mitophagy: sensors, regulators, and effectors. In: Hayat MA, editor. *Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging.* Academic Press. p. 91e104, 2016.
52. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science.* 285:1393–6, 1996.
53. Lemasters JJ. Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism. *J Gastroenterol Hepatol.* 22:31–7, 2007.
54. Briston T, Roberts M, Lewis S, et al. Mitochondrial permeability transition pore: sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability. *Sci Rep.* 7:10492, 2017.
55. Seidlmayer LK, Juettner VV, Kettlewell S, Pavlov EV, Blatter LA, Dedkova EN. Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca^{2+} , ROS, pH, and inorganic Polyphosphate. *Cardiovasc Res.* 106:237e48, 2015.
56. Bohovych I, Chan SS, Khalimonchuk O. Mitochondrial protein quality control: the mechanisms guarding mitochondrial health. *Antioxid Redox Signal.* 22:977–994, 2015.
57. Sugiura A, McLelland GL, Fon EA, McBride HM. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* 33:2142–2156, 2014.
58. Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, et al. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PLoS One.* 6:e18112, 2011.

59. Ferramosca A, Zara V. Mitochondria and fertility: the mitochondria critical role on spermatozoa function. *JDRReAM*. 1:26, 2017.
60. Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril*. 526e30, 2006.
61. Meinhardt A, Wilhelm B, Seitz J. Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Human Reproduction*. 5, 108–119, 1999.
62. Vertika S, Singh KK, Rajender S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility an update. *Mitochondrion*. 54, 26–40, 2020.
63. Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol. Reprod*. 96, 2–12., 2017.
64. Bansal SK, Gupta N, Sankhwar SN, Rajender S. Differential Genes Expression between Fertile and Infertile Spermatozoa Revealed by Transcriptome Analysis. *PLoS One*. 14, 10(5), 0127007, 2015.
65. Zhang Z, Miao J, Wang Y. Mitochondrial regulation in spermatogenesis. *Reproduction*. 163(4), R55-R69, 2022.
66. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 505, 335–343, 2014.
67. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8, 813–824, 2007.
68. Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol. Reprod*. 91, 77, 2014.
69. Duca Y, Calogero AE, Cannarella R, Condorelli RA, La Vignera S. Current and emerging medical therapeutic agents for idiopathic male infertility. *Exp. Opin. Pharmacother*. 20, 55–67, 2019.
70. Wykes S, Krawetz S. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem*. 278, 29471–29477, 2003.
71. Chianese R, Pierantoni R. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. *Antioxidants*. 11, 10(1), 92, 2021.

72. Aitken RJ, Drevet JR. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants*. 9:111, 2020.
73. Baker MA, Weinberg A, Hetherington L, Villaverde AI, Velkov T, Baell J, Gordon CP. Defining the mechanisms by which the reactive oxygen species by-product, 4-hydroxynonenal, affects human sperm cell function. *Biol Reprod*. 92:108e11, 2015.
74. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol*. 28(4),170-185, 2018.
75. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*. 462(2), 245-53, 2007.
76. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death?. *Autophagy*. 1(2), 66-74, 2005.
77. Aparicio IM, Espino J, Bejarano I, Gallardo-Soler A, Campo ML. Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. *Sci Rep*. 6, 33647, 2016.
78. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of cell biology*. 212:379–387, 2016.
79. Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet*. 46: 265–287, 2012.
80. Gomes LC, Scorrano L. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim Biophys Acta*. 1833(1):205-12, 2013.
81. Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*. 1;391:42-53, 2017.
82. Rogov VV, Suzuki H, Marinković M, Lang V, Kato R, Kawasaki M, et al. Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins. *Sci Rep*. 7: 1–12, 2017.
83. Lee Y, Lee HY, Hanna RA, and Gustafsson AB. Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301: 1924–1931, 2011.
84. Chen M, Chen Z, Wang Y, Tan Z, Zhu C, Li Y, et al. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy*. 12: 689–702, 2016.

85. Cai C, Wu F, He J, Zhang Y, Shi N, Peng X, Ou Q, et al. Mitochondrial quality control in diabetic cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Int J Biol Sci.* 15;18(14):5276-5290, 2022.
86. Ohsumi Y, Mizushima N. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin Cell Dev Biol.* 15(2), 231-6, 2004.
87. Matsushita M, Suzuki NN, Obara K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. Structure of Atg5-Atg16, a complex essential for autophagy. *J Biol Chem.* 282(9), 6763-72, 2007.
88. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 12(9), 823-30, 2010.
89. Huang Q, Liu Y, Zhang S, Yap YT, Li W, Zhang D, et al. Autophagy core protein ATG5 is required for elongating spermatid development, sperm individualization and normal fertility in male mice. *Autophagy.* 17(7), 1753-1767, 2021.
90. Gu NH, Zhao WL, Wang GS. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol Endocrinol.* 17,66, 2019.
91. Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Ann Rev Cell Biol.* 4:155–81, 1988.
92. Zhang G, Yang W, Zou P, Jiang F, Zeng Y, Chen Q, et al. Mitochondrial functionality modifies human sperm acrosin activity, acrosome reaction capability and chromatin integrity. *Hum Reprod.* 1,34(1), 3-11, 2019.
93. Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, et al. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril,* 2, 844-50, 2003.
94. Zhu Z, Kawai T, Umehara T, Hoque SAM, Zeng W, Shimada M. Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. *Free Radical Biol Med.* 141,159-71, 2019.
95. James BR, Griffith TS. Tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand-induced apoptotic pathways in cancer immunosurveillance: Molecular mechanisms and prospects for therapy. *Res. Rep. Biochem.* 5, 1-10, 2015.
96. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47,143-83, 2007.

97. Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: Potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod.* 10, 825–834, 2004.
98. Bauer TM, Murphy E. Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circ. Res.* 126(2), 280-293, 2020.
99. Karch J, Molkentin JD. Regulated necrotic cell death: The passive aggressive side of Bax and Bak. *Circ. Res.* 116(11), 1800-1809, 2015.
100. Söderquist L, Rodriguez-Martinez H, Janson L. Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of A.I. bull spermatozoa in relation to fertility. *Zentralbl Veterinarmed A.* 38(3), 165-74, 1991.
101. Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod.* 19, 2267–2276, 2004.
102. Grunewald S, Sharma R, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 72, 878–888, 2009.
103. Boguenet M, Bouet PE, Spiers A, Reynier P, May-Panloup P. Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Hum Reprod Update.* 27(4), 697-719, 2021.
104. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Men's Health.* 32, 1–17, 2014.
105. Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species", *Hum. Reprod.* 10, 387–399, 2004.
106. Pereira R, Sa R, Barros A, Sousa M. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J. Androl.* 19, 5–14, 2017.
107. Ghafarizadeh AA, Malmir M, Naderi Noreini S, Faraji T, Ebrahimi Z. The effect of vitamin E on sperm motility and viability in asthenoteratozoospermic men: In vitro study. *Andrologia.* 53(1), 13891, 2021.
108. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia.* 49, 10, 2017.

109. Ghaffari MA, Rostami M. Lipid Peroxidation and Nitric Oxide Levels in Male Smokers' Spermatozoa and their Relation with Sperm Motility. *J Reprod Infertil.* 13(2), 81-7, 2012.
110. Kratz EM, Piwowar A, Zeman M, Stebelová K, Thalhammer T. Decreased melatonin levels and increased levels of advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility. *Reprod Fertil Dev.* 28(4), 507-15, 2016.
111. Vigolo V, Giaretta E, Da Dalt L, Damiani J, Gabai G, Bertuzzo F. Relationships between Biomarkers of Oxidative Stress in Seminal Plasma and Sperm Motility in Bulls before and after Cryopreservation. *Animals (Basel).* 22;12(19), 2534, 2022.
112. Calogero AE, Condorelli RA, Russo GI, La Vignera S. Conservative Nonhormonal Options for the Treatment of Male Infertility: Antibiotics, Anti-Inflammatory Drugs, and Antioxidants. *Biomed. Res. Int.* 4650182, 2017.
113. Agarwal A, Nallella K, Allamaneni S, Said T. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online.* 8, 616-627, 2004.
114. Greco E, Romano S, Lacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod.* 20, 2590–2594, 2005.
115. Gholinezhad M, Aliarab A, Abbaszadeh-Goudarzi G, Yousefnia-Pasha Y, Samadaian N, Rasolpour-Roshan K. Nitric oxide, 8-hydroxydeoxyguanosine, and total antioxidant capacity in human seminal plasma of infertile men and their relationship with sperm parameters. *Clin. Exp. Reprod.* 47, 54–60, 2020.
116. Nasiri A, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Bakhtiari M, Bahrehmand F, Kiani a. Evaluation of the relationship among the levels of SIRT1 and SIRT3 with oxidative stress and DNA fragmentation in asthenoteratozoospermic men. *Int. J. Fertil. Steril.* 15, 135–140, 2021.
117. Colagar AH, Karimi F, Jorsaraei SGA. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno and oligoasthenoteratozoospermic men. *Iran. Red Crescent Med. J.* 15, 780–785, 2013.

118. Janiszewska E, Kokot I, Kmieciak A, Stelmasiak Z, Gilowska I, Faundez R. The Association between Clusterin Sialylation Degree and Levels of Oxidative-Antioxidant Balance Markers in Seminal Plasmas and Blood Sera of Male Partners with Abnormal Sperm Parameters. *Int J Mol Sci.* 13,23(18)-10598, 2022.
119. Catalán J, Yáñez-Ortiz I, Tvarijonaviciute A, González-Arostegui LG, Rubio CP, Yeste M. Impact of Seminal Plasma Antioxidants on Donkey Sperm Cryotolerance. *Antioxidants*, 18,11(2), 417, 2022.
120. Agrawal YP, Vanha-Perttula T. Glutathione, L-glutamic acid and gamma glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. *Int J Androl.* 11,123–31, 1988.
121. Eskiocak S, Gozen AS, Yapar SB, Tavas F, Kilic AS, Eskiocak M. Glutathione and free sulphhydryl content of seminal plasms in healthy medical students during and after exam stress. *Hum Reprod.* 20(9), 2595–600, 2005.
122. Fafula RV, Onufrovych OK, Lefremova UP, Melnyk OV, Nakonechnyi IA, Vorobets DZ. Glutathione content in sperm cells of infertile men. *Regul Mech Biosyst.* 8(2), 156–61, 2017.
123. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 204,263–73, 2005.
124. Agnihotri SK, Agrawal AK, Hakim BA, Vishwakarma AL, Narender T, Sachan R. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 52(9):953-960, 2016.
125. Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril.* 95(7), 2315-9, 2011.
126. Aitken RJ, Whiting S, De Iuliis GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistr.* 287(39), 33048-33060, 2012.
127. Wang MJ, Ou JX, Chen GW, Wu JP, Shi, HJ, Chen H. Does prohibitin expression regulate sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and male fertility?. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(3), 513-519, 2012.

128. Chai RR, Chen GW, Shi HJ, O WS, Martin-Deleon PA, Chen H. Prohibitin involvement in the generation of mitochondrial superoxide at complex I in human sperm. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 21(1), 121-129, 2017.
129. Lyamzaev KG, Tokarchuk AV, Panteleeva AA, Mulkidjanian AY, Skulachev, VP, Chernyak BV. Induction of autophagy by depolarization of mitochondria. *Autophagy*, 14(5), 921-924, 2018.
130. Aksu EH, Kandemir FM, Küçükler S. The effects of hesperidin on colistin induced reproductive damage, autophagy, and apoptosis by reducing oxidative stress. *Andrologia*. 53(2), 13900, 2021.
131. Bootman MD, Chehab T, Bultynck G. The regulation of autophagy by calcium signals: do we have a consensus. *Cell Calcium*. 70, 32–46, 2018.
132. Xia HG, Zhang LH, Chen G. Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy*. 6(1), 61–66, 2010.
133. Sin J, Andres AM, Taylor DJ, Weston T, Hiraumi Y, Stotland A. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Autophagy*. 12, 369 – 380, 2016.
134. Zhang Y, Tang J, Wang X, Sun Y, Yang T, Shen X, et al. Loss of ACTL7A causes small head sperm by defective acrosome-acroplaxome-manchette complex. *Reprod Biol Endocrinol*. 4;21(1), 82, 2023.
135. Liu ML, Wang JL, Wei J, Xu LL, Yu M, Liu XM, et al. Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of rat spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 149(2), 163–170, 2015.
136. Khedr NF, Werida RH. l-carnitine modulates autophagy, oxidative stress and inflammation in trazodone induced testicular toxicity. *Life Sci*. 290, 120025, 2022.
137. Ke L, Lin X, Luo Y, Tao S, Yan C, He Y, et al. Autophagy core protein BECN1 is vital for spermatogenesis and male fertility in mice. *Biol Reprod*. 17, ioad160, 2023.
138. Li Y, Zhang J, Sun L, Zhao H, Jia X, Zhang Y. Fluoride-Induced Sperm Damage and HuR-Mediated Excessive Apoptosis and Autophagy in Spermatocytes. *Biol Trace Elem Res*. 1(1), 295-305, 2023.

139. Luo ZY, Jiang TX, Zhang T, Xu P, Qiu XB. Ubiquitin Ligase Nrdp1 Controls Autophagy-Associated Acrosome Biogenesis and Mitochondrial Arrangement during Spermiogenesis. *Cells*. 12(18),2211, 2023.
140. Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, et al. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*. 128(5),931-46, 2007.
141. Mirzoeva OK, Hann B, Hom YK, Debnath J, Aftab D, Shokat K, Korn WM. Autophagy suppression promotes apoptotic cell death in response to inhibition of the PI3K-mTOR pathway in pancreatic adenocarcinoma. *J Mol Med (Berl)*. 9(9):877-89, 2011.
142. Yin J, Ni B, Yang YD, Tang ZW, Gao ZQ, Feng L. Elevation of autophagy rescues spermatogenesis by inhibiting apoptosis of mouse spermatocytes. *Reproduction*. 156(6), 545-558, 2018.
143. Zhang G, Liu K, Ling X, Wang Z, Zou P, Wang X, vd. DBP-induced endoplasmic reticulum stress in male germ cells causes autophagy, which has a cytoprotective role against apoptosis in vitro and in vivo. *Toxicol Lett*. 245, 86-98, 2016.
144. Liu K, Zhang G, Wang Z, Liu Y, Dong J, Dong X. The protective effect of autophagy on mouse spermatocyte derived cells exposure to 1800MHz radiofrequency electromagnetic radiation. *Toxicol Lett*. 228(3), 216–224, 2014.
145. Zheng W, Xie W, Yin D, Luo R, Liu M, Guo F. ATG5 and ATG7 induced autophagy interplays with UPR via PERK signaling. *Cell Commun Signal*. 17(1), 42, 2019.
146. Zhang M, Jiang M, Bi Y, Zhu H, Zhou Z, Sha J. Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice. *PLoS One*. 7(7), e41412, 2012.
147. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*. 8, 1124–1132, 2006.
148. Wei Y, Zhou Y, Tang XL, Liu B, Shen LJ, Long CL. Testicular developmental impairment caused by flutamide-induced and DEHP-induced cryptorchid rat models is mediated by excessive apoptosis and deficient autophagy. *Toxicol Mech Methods*. 28(7), 507-519, 2018.

149. Wang ZB, Li M, Zhao Y, Xu JX. Cytochrome C is a hydrogen peroxide scavenger in mitochondria. *Protein Pept. Lett.* 10, 247–253, 2003.
150. Nur-E-Kamal A, Gross SR, Pan Z, Balklava Z, Ma J, Liu LF. Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis. *J Biol Chem.* 279(24), 24911-4, 2004.
151. Chakraborty J, Caicci F, Roy M, Ziviani E. Investigating mitochondrial autophagy by routine transmission electron microscopy: Seeing is believing?. *Pharmacol Res.* 160,105097, 2020.



10. ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Sayı : E-10840098-772.02-1904

20/03/2022

Konu: Etik Kurulu Kararı

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Astenozoospermide Mitokondriyal Otofajinin Oksidatif Stresle İlişkisinin Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	KÜBRA NUR UZUN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Uzman Biyolog/ Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evracınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 703E8B5FX1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.



İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No:251		Tarih: 17.03.2022			
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ	Tıp Tarihi ve Etik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Doç. Dr. Mehmet Kemal ÖZDEMİR	Elektrik ve Elektronik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Doç. Dr. İlnur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Dr. Öğr. Üyesi Nezih HACIHASANOĞLU ÇAKMAK	Biyokimya	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	Tıbbi Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur

* :Toplantıda Bulunma

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakımızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 703E8B5FX1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.