TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERKEK İNFERTİLİTESİ ÜZERİNDE SERTOLİ HÜCRELERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Somayyeh HEİDARGHOLİZADEH

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

2015-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERKEK İNFERTİLİTESİ ÜZERİNDE SERTOLİ HÜCRELERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Somayyeh HEİDARGHOLİZADEH

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Oya Sena AYDOS

Bu tezTÜBİTAK tarafından 214S532 numarası ile desteklenmiştir

2015-ANKARA

ÖNSÖZ

Bu tez, günümüz toplumunda büyük bir sorun olan erkek infertilite etyolojisinin açıklanmasına yönelik bir araştırmayı kapsamaktadır. Bu tez çalışmasında erkek infertilite tedavisinde kullanılan FSH hormonunun etkisi infertil erkeklerin TESE örneğinden izole edilen primer Sertoli hücrelerine uygulanarak araştırılmıştır.

Hayatımın her aşamasında sevgisini eksik etmeden beni destekleyen ve her zaman yanımda olan ve tezimi kendisine ithaf ettiğim insan, Aydin HEMMATİ'ye

Tezimin oluşturulması ve yürütülmesi sırasında yardımlarıyla beni bilimsel anlamda yönlendiren, sevgili danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Oya Sena AYDOS'a

Tezimin bütün aşamalarında değerli bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na

Tezimin bütün aşamalarında yardımlaryla beni destekleyen saygıdeğer Uzm. Dr. Sinan ÖZKAVUKCU ve Prof. Dr. Kaan AYDOS'a

Tez çalışmam sırasında bilimsel metodları öğrenmemde ve uygulamamda emeği geçen ve tezimin her aşamasında desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Tülin ÖZKAN ve Dr. Aynur KARADAĞ'a

Tezimin tum aşamalarında yanımda olmaları ve büyük yardımları için en yakın arkadaşlarım Merve BUNSUZ ve Shahrashoub SHARİFİ'ye

Yardımlarıyla bana destek olan sevgili arkadaşlarım Yalda HEKMATSHOAR ve Fuat KAPLAN'a

Bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli arkadaşlarım Dr. Can ATEŞ, Dr. Buket ALTINOK, Yunus YÜKSELTEN, sevgili Sibel ARAT, Furkan BALBAY ve Meral KUTLUTÜRK'e

Sayın hocalarıma, sevgili arkadaşlarıma ve Tüm Tıbbi Biyoloji ailesine,

Eğitimimin her aşamasında sonsuz sevgileriyle bana destek olan, en değerli varlığım aileme sonsuz teşekkür ve sevgilerimle…

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER VE KISALTMALAR ix
ÇİZELGELER xi
ŞEKİLLER xiii
1. GİRİŞ 1
1.1. ERKEK ÜREME ORGANLARINDAN TESTISIN YAPISI 1
1.2. SERTOLİ HÜCRELERİ 2
1.2.1. Sertoli Hücrelerinin Yapısı 2
1.2.2. Sertoli ve Germ Hücreleri Arasında Bulunan Bağlantılar 4
1.2.3. Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları 6
1.2.3.1. Yapısal Destek 6
1.2.3.2. Geçirimsiz Bir Bariyer Oluşturmak 7
1.2.3.3. Kan-Testis Bariyerinin Düzenlenmesi 8
1.2.3.4. Germ Hücre Translokasyonuna Yardımcı Olmak 8
1.2.3.5. Spermiasyon 9
1.2.3.6. Fagositoz 9
1.2.3.7. Pinositoz Ve Reseptör Aracılı Endositoz 10
1.2.3.8. Sekretuvar Fonksiyonu 10
1.2.3.9. Besin Sağlanması 10
1.3. Spermatogenez / Steroidogenez - Genel Bakış 11
1.3.1. Spermatogenez Siklusunun Süresi 12
1.3.2. Spermatogenezde Bulunan Önemli Evreler 12
1.3.2.1. Spermatogenez Evresi 14
1.3.2.2. Spermiyogenez Evresi 15
1.3.2.3. Spermiasyon Evresi 16
1.3.3. Spermatogenezde Etkili Olan Regülatörler 18
1.3.3.1. Hipotalamus-Hipofiz-Gonad Ekseninin Regülatörleri 18

1.3.3.2. Apical ES, BTB ve Hemidesmozom Ekseninin Regülatörleri 20
1.3.3.2.1. Polarite Proteinleri 22
1.3.3.2.2. Reseptör Olmayan Protein Kinazlar 22
1.3.3.2.3. Sitokinler ve Testosteron 23
1.4. İnfertilite 28
1.4.1. Erkek İnfertilitesi 28
1.4.1.1. İnsidans ve Erkek İnfertilite Prevalansi 29
1.4.1.2. Erkek İnfertilitesi Etyolojisi 30
1.4.1.2.1. Erkek Faktörü İnfertilitede Genetik Nedenler 31
1.4.1.2.2. Erkek Faktörü İnfertilitesinin Genetik Olmayan Nedenleri 36
1.4.1.2.2.5. İmmünolojik Faktörler 41
1.5. Seminal Parametrelerin Klinik Tanımlanması 42
1.5.1. Azoospermi 43
1.5.1.1. Azoospermik Hastaların Sınıflandırılması 43
1.5.1.1.1. Pre-Testiküler Azoospermi 45
1.5.1.1.2. Post-Testiküler Tıkanıklık veya Obstrüktif Azoospermi (OA) 45
1.5.1.1.3. Testiküler Yetmezlik veya Obstrüktif Olmayan Azoospermi (NOA) 45
1.5.1.2. Azoospermik Hastaların Tedavisi 46
1.6 TEZİN AMACI 47
2. GEREÇ ve YÖNTEM 50
2.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KIMYASAL MALZEME VE SOLÜSYONLAR 50
2.1.1. Hasta Materyali 50
2.1.2. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Dondurulmasında Kullanılan Malzemeler 51
2.1.3. Sertoli Hücrelerinin Karakterizasyonunda Kullanılan Malzemeler 53

2.1.4. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonunda Kullanılan Malzemeler 54
2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinde Kullanılan Malzemeler 54
2.1.6. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler 55
2.1.7. Sitokin Pcr Array Ve Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitive RT-PCR) Yönteminde Kullanılan Malzemeler 55
2.2. YÖNTEMLER 57
2.2.1. Primer Sertoli Hücre Kültürü 57
2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması 58
2.2.3. Hücrelerin Dondurulması 59
2.2.4. Hücrelerin Sıvı Azottan Çıkarılıp Çözdürülmesi 59
2.2.5. Primer Sertoli Hücrelerin Karakterizasyonu 60
2.2.5.1. Akim Sitometri (İntraselüler Protein Boyama) 60
2.2.5.2. İmmünositokimyasal Yöntem 61
2.2.6. Primer Sertoli Hücrelerine FSH Hormonunun Uygulanması 62
2.2.7. RNA İzolasyonu 62
2.2.8. RNA Kantitasyonu 63
2.2.9. RNA Örneklerinin % 1'lik Jelde Görüntülenmesi 63
2.2.10. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi 64
2.2.11. RT² Profiler'ı ™ PCR Dizi Sistemi 65
2.2.12. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitive RT-PCR) 68
2.2.13. Sonuçların Değerlendirmesi 69
3. BULGULAR 71
3.1. PRİMER SERTOLİHÜCRELERİN MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ 71
3.2. PRİMER SERTOLİ HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU 71
3.2.1. Primer Sertoli hücrelerinin akım sitometri yöntemiyle karakterizasyonu 71
3.2.2. Primer Sertoli Hücrelerinin immünohistokimyasal yöntemiyle karakterizasyonu: 73
3.3. SERTOLİ HÜCRELERİNDEN RNA İZOLASYONU 73

3.4. SİTOKİN PCR ARRAY BULGULARI 75
3.4.1. FSH Uygulanmadan Önce (FSH-) ve Sonra (FSH+) Sitokin PCR Array Bulguları 75
3.4.1.1. FSH- NOA hastaların OA kontrol grubuna göre genlerindeki kat değişimleri 75
3.4.1.2. FSH- NOA hastaların kontrol grubuna göreanlamlıdeğişiklik gösteren genlerindeki kat değişimleri 76
3.4.1.3. FSH- NOA hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerindeki kat değişimleri 77
3.4.1.4. FSH uyguladıktan sonra grupların gen ifade profilleri 78
3.4.1.5. Normal FSH'li hasta grubu ve kontrol grubunun ifade profilleri 79
3.4.1.6. FSH - normal FSH'li hasta grubunun kontrol grubuna göre gen ifade profilleri 80
3.4.1.7. FSH- normal FSH'li hastaların kontrol grubuna göre anlamlıdeğişiklik gösteren genlerindeki kat değişimleri 81
3.4.1.8. FSH- normal FSH'li hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerindeki kat değişimleri 82
3.4.1.9. FSH- ve FSH+ normal FSH'li hastaların gen ifade profilleri 83
3.4.1.10. FSH- ve FSH+ NFSH hastaların anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerin kat değişimi 84
3.5. EŞ ZAMANLI PCR (REAL TİME PCR, QRT-PCR) BULGULARI 86
3.5.1. FSH- YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının FSHR geninde ifade farklılıkları 87
3.5.2. FSH- YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının ABP geninde ifade farklılıkları 87

3.5.3. FSH + YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının FSHR geninde ifade değişimleri 88
3.5.4. FSH + YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının ABP geninde ifade değişimleri 89
TARTIŞMA 91
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 105
5.1. ÖNERILER 106
ÖZET 107
SUMMARY 108
KAYNAKLAR 109
ÖZGEÇMİŞ 143

SİMGELER VE KISALTMALAR

ELS	**:**	Elongated spermatid
IFN	**:**	İnterferon
IL	**:**	İnterlökin
IG	**:**	İmmünglobulin
GnRH	**:**	Gonadotropin salgılatıcı hormon
LH	**:**	lüteinize edici hormon
FSH	**:**	Follikül uyarıcı hormon
ABP	**:**	Androjen bağlayıcı protein
TGF	**:**	Transforme edici büyüme faktörü
TNF	**:**	Tümör nekroz faktörü
CRB	**:**	Crumbs
FAK	**:**	Fokal adezyon kinaz
PDGF	**:**	Trombosit türevli büyüme faktörü
FGF	**:**	Fibroblast büyüme faktörü
TNF	**:**	tümör nekroz faktörü
NGF	**:**	Sinir büyüme faktörü
EGF	**:**	Epidermal büyüme faktörü
MtDNA	**:**	Mitokondriyal DNA
CFTR	**:**	Cystic fibrozis transmembran conductance regülatör
AZF	**:**	Azoospermi Faktörü
DAZ	**:**	Deleted in Azoospermia
ICSI	**:**	İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu
ATP	**:**	Adenozin trifosfat
DAZL	**:**	DAZ benzer
MTHFR	**:**	Metilentetra-hidrofolat redüktaz
HH	**:**	hipergonadotropik hipogonadizm
IGF-1	**:**	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
ROS	**:**	Reaktif oksijen türlerinin
OS	**:**	Oksidatif stres
OA	**:**	Obstrüktif azoospermi

MA	**:**	matürasyon arrest
SCO	**:**	Sertoli cell only syndrome SCO
USAUM	**:**	Üreme sağlığı, araştırma ve uygulama merkezi
NOA	**:**	Non-obstrüktif azoospermi
FBS	**:**	Fötal Dana Serumu
PBS	**:**	Fosfat Tuz Tamponu
EDTA	**:**	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
DMSO	**:**	Dimetilsülfoksit
DEPC	**:**	Diethylpyrocarbonate
cDNA	**:**	Komplementer DNA
FSHR	**:**	FSH reseptörü
ABP	**:**	Androjen bağlayıcı protein
hCG	**:**	İnsan koryonik gonadotropin
Fhf2	**:**	Fibroblast büyüme faktörü homolog faktor 2
MAPK	**:**	Mitojenle aktive olan protein kinaz
VEGFA	**:**	Vascular endotel büyüme faktörü A
EFNA1	**:**	Efrin A1
EFNB1	**:**	Efrin B1
EFNB2	**:**	Efrin B2
KTB	**:**	Kan testis bariyeri
HGF	**:**	Hepatosit büyüme faktörü
TPO	**:**	Thyroid peroxidase
NRG1	**:**	Nerve büyüme faktörü 1
CSF3:	**:**	Colony stimüle edici faktör 3
PI3K	:	Fosfatidil inozitol 3 kinaz
İFN	**:**	İnterferon

ÇİZELGELER

		Sayfa No:
Çizelge 1.1.	Sitokinler ve fonksiyonları testiste	27
Çizelge 1.2.	Seminal parametrelerin klinik tanımlanması	43
Çizelge 1.3.	Ejakulat volümü normal azoospermi nedenleri	44
Çizelge 1.4.	Erkek infertilitesinin genetik anormalileri	44
Çizelge 2.1.	Normal FSH'lı NOA hasta grubunun özellikleri	50
Çizelge 2.2.	Yüksek FSH'lı NOA hasta grubunun özellikleri	51
Çizelge 2.3.	Kontrol grubunun özellikleri	51
Çizelge 2.4.	İnsan primer sitokin kütüphanesi I (Human Cytokine Primer Library I)	56
Çizelge 2.5.	cDNA sentez protokolü	65
Çizelge 2.6.	Sitokin PCR array çalışma protokolü	67
Çizelge 2.7.	qRT-PCR protokolü	69
Çizelge3.1.	RNA bütünlük ve miktar tayinleri	74
Çizelge3.2.	FSH- NOA hastaların OA kontrol grubuna göre genlerindeki kat değişimleri	76
Çizelge 3.4.	FSH- NOA hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerin kat değişimleri	78
Çizelge 3.5.	FSH - normal FSH'li hasta grubunun kontrol grubuna göre gen ifade profilleri	81
Çizelge 3.6.	FSH- NFSH hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren genlerindeki kat değişimleri	82
Çizelge 3.7.	FSH- NFSH hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerindeki kat değişimleri	83
Çizelge 3.8.	FSH- ve FSH+ normal FSH'li hastaların gen ifade profilleri	84

Çizelge 3.9. FSH- ve FSH+ NFSH hastaların anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerin kat değişimi 85

Çizelge 3.10. FSH- YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının FSHR geninde ifade farklılıkları 87

Çizelge 3.11. FSH- YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının ABP geninde ifade farklılıkları 88

Çizelge 3.12. FSH + YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının FSHR geninde ifade değişimleri 89

Çizelge 3.13. FSH + YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının ABP geninde ifade değişimleri 90

ŞEKİLLER

Sayfa No:

Şekil 1.1. Spermatojenik epitel yapisinin şematik bir diyagrami 1

Şekil 1.2. Memeli seminifer tübülün kesiti 4

Şekil 1.3. Memeli testisinin seminifer epitelinin anatomisi 5

Şekil 1.4. Spermatogenez sırasında oluşan hücresel değişiklikler 13

Şekil 1.5. Memeli seminifer epitelinde apikal ES, BTB'de bazal ES, Gap bağlantı ve desmozom benzeri bağlantıların relatif lokalizasyonunu gösteren şematik şekil 14

Şekil 1.6. Spermiyogenezin aşamaları için gerekli olan bazı genler 16

Şekil 1.7. Spermiasyon süreci 17

Şekil 1.8. Spermatogenez ve hücre bağlantıları memeli seminifer epitelinde 21

Şekil 1.9. Polarite proteinler ve reseptör olmayan protein tirozin kinazların rolü apikal ES-KTB fonksiyonal ekseninde 23

Şekil 1.10. İnfertilite dağılımı 29

Şekil 1.11. Erkek infertilitesi bozukluklarının dağılımı 31

Şekil 1.12. Erkek faktörü infertilitesinin genetik nedenleri 32

Şekil 1.13. Y kromozomunun fertilite ve infertilite ile ilişkili olan bölgeleri 34

Şekil 1.14. Erkek faktörü infertilite etyolojisi 36

Şekil 1.15. Erkek faktörü infertilite olgularında etyopatogenez ilişkisi 40

Şekil 1.16. Spermatogenez sırasında epigenetik olaylar 42

Şekil 2.1. Primer sertoli hücrelerine FSH hormon uygulanması 62

Şekil 2.2. PCR sitokin array protokolü. 66

Şekil 3.1. A-B Primer Sertoli hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (100x) 71

Şekil 3.2. Sertoli hücrelerinde vimentin deteksiyonu için flowcytometry analizi 72

Şekil 3.3. Sertoli Hücrelerinde GATA4 deteksiyonu için flowcytometry analizi 72

Şekil 3.4. Primer Sertoli hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (1000x) 73

Şekil 3.5. İzole edilen RNA'larin elektroforez görüntüsü 74

Şekil 3.6. FSH uyguladıktan sonra grupların gen ifade profilleri 79

Şekil 3.7. Normal FSH'li hasta grubu ve kontrol grubunun ifade profilleri 80

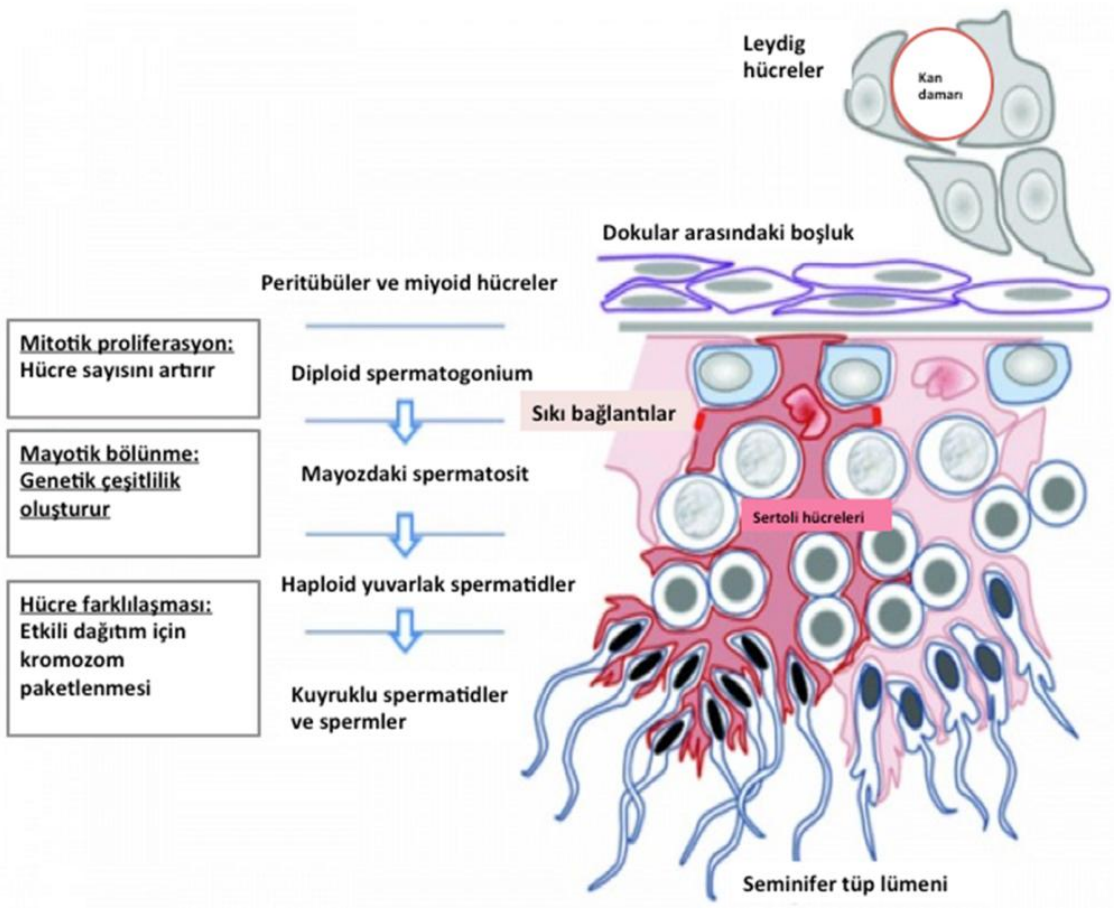
Şekil 3.8. HPRT geni erime eğrisi 86

Şekil 4.1. RA ve FSH'nın Sertoli hücrelerinde NRG1 aktivasyonu ve NRG3 yoluyla mayozu uyarma mekanizması 99

1. GİRİŞ

1.1. ERKEK ÜREME ORGANLARINDAN TESTISIN YAPISI

Testis işlevsel olarak ilişkili iki ayrı bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 1.1). Bu bölgeler interstisyum ve seminifer tübüller olarak adlandırılmaktadır. Erkeklerin ikincil cinsiyet karakterleri, interstisyumda Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron hormonuyla belirlenmektedir. Seminifer tübüllerin epitelinde ise Sertoli hücreleriyle desteklenen spermatogonial kök hücreler bulunmakta ve sperm üretimini sağlamaktadır. Testisin yapısında bulunan spermatogonyumlar bazal lamina üzerinde yer almaktadır. Bu hücreler lümene doğru hareket ettikçe farklılaşıp olgun spermatozoaya dönüşmektedirler. Spermatogenik hücrelerin arasında onlara destek sağlayan Sertoli hücreleri bulunmaktadır (Lee ve ark, 2009).



Şekil 1.1. Spermatojenik epitel yapisinin şematik bir diyagrami (Hunter ve ark, 2012)

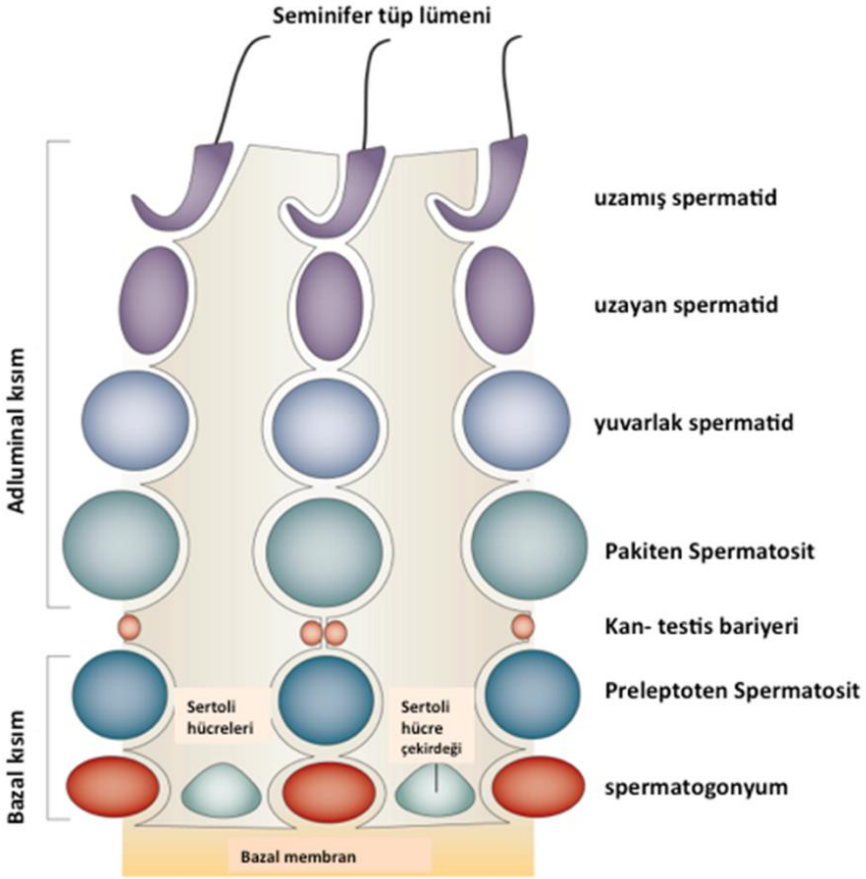
1.2. SERTOLİ HÜCRELERİ

Seminifer epitelin bazal membranından lümene doğru uzayan somatik bileşenler olarak tanımlanan Sertoli hücreleri, (Şekil 1.1) spermatogenez sürecinde rol oynayan önemli hücrelerden sayılmaktadır. Bu hücreler FSH ve testosteron gibi faktörler tarafından gelen endokrin ve parakrin uyarıya yanıt olarak, parakrin regülasyonu ve germ hücrelerin diferansiyasyonu için yapısal destek sağlamaktadır. Sertoli hücreleri düzensiz çekirdeğe sahip olup, daha kompleks bir epitelyum oluşturmak için germ hücrelerine yapışmaktadırlar. Ayrıca bu iki tip hücre arasında değişik sıkı ve yapışık bağlantıların oluşmasının yanı sıra bu bağlantıların sağladıkları kan-testis bariyeri de bu yapılar arasında yer almaktadır. Bu kompleks yapı diferansiyasyon sırasında, germ hücrelerinin lokalizasyonunu ve lümene doğru hareketlerini regüle etmektedir. Kan- testis bariyeri yeni oluşan haploid germ hücelerin immün sistem hücrelerine maruz kalmaktan korumaktadır. Ayrıca sıkı bağlantılar Sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasında sinyalizasyon olaylarını kolaylaştırmaktadır. Yapılan birkaç çalışmada bu hücrelerin, germ hücrelerinin gelişmelerinde ve hareket kazanmalarında kaçınılmaz role sahip olduklarını göstermiştir (Griswold, 1998). Salgı üreten hücreler olarak Sertoli hüreleri, Steel (kit-ligand) gibi büyüme faktorlerini ve anti-apoptotik faktörleri, ayrıca proteinler ve diğer birleşenleri içeren seminifer tübül içerisindeki sıvıyı üretmektedirler. Androjen bağlayıcı protein, transferrin, plazminojen aktivatörü, glikoproteinler, sülfo-proteinler ve miyo-inositol, Sertoli hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Alves ve ark., 2013). Sertoli hücreleri, erkek germ hücrelerinin geliştiği çeşitli çevresel nişleri kontrol etmek için gereklidirler (Hunter vd., 2012).

1.2.1. Sertoli Hücrelerinin Yapısı

1800'lerin sonlarında Sertoli hücrelerin keşfedilmesinden bu yana, bu hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi onların devamlı değişen yapıları ve epitel döngüsünün 14 aşama boyunca gelişmekte olan germ hücreleriyle üç boyutlu ilişkide olması nedeniyle son derece zor olmuştur (Russell,1993). Ancak yine de Sertoli hücreleri,

seminifer tübülde en çok incelenen hücre tiplerinden sayılmaktadır. Bu hücreler düzensiz morfolojiye sahip, bazaldan adluminal kompartmana doğru uzayan ve yetişkin ratların seminifer epitel hacminin yaklaşık %17–19'unu işgal eden sütun şeklinde hücrelerdir (Russell ve ark,1990). Sertoli hücreleri testiste ekstrasellüler matriksin bir değiştirilmiş formu olan bazal membranla direkt olarak ilişkilidirler (Şekil 1.2), (Dym, 1994). Bu hücreler büyük bir yüzey alanına sahiplerdir. Yetişkin rat testisinde bulunan germ hücreleri ile kıyasladıklarında yaklaşık 1:50 oranında bulunmaktadırlar ve bu özellik onlara gelişmekte olan germ hücrelerini destekleme kapasitesi sağlamaktadır (Weber ve ark 1983). Bu destek hem spermatogenez, hem de germ hücrelerin gelişimi için gereklidir (Dolores ve ark, 2003). Sertoli hücreleri morfolojik olarak Tip A ve Tip B olmak üzere iki kategoriye ayrılabilirler (Russell, 1993): Tip A Sertoli hücrelerinde, serbest halde lümene bırakılmaya hazır olan olgun spermatidler, sitoplazmik kriptlerin derinlerinde lokalize halde iken; Tip B Sertoli hücreleinde bu sitoplazmik kriptler zor görünürler ya da hiç bulunmamaktadır. Bu nedenle epitel döngüsünün 14 aşaması boyunca Tip A Sertoli hücrelerinin, Tip B Sertoli hücrelerine kendilerini dönüştürmeleri, germ hücreleri gelişme ve hareketleri sırasında oluşan hücresel değişikliklere adapte olmaları için gereklidir. Hücre morfolojisinde II, VII, VIII, IX–XI, ve XIII–XIV aşamalarında önemli değişiklikler görülmektedir. Bu durum Sertoli hücre fonksiyonunun, germ hücreleriyle birlikte epitel döngüsünü oluşturmasında oldukça önemlidir (Parvinen, 1982).

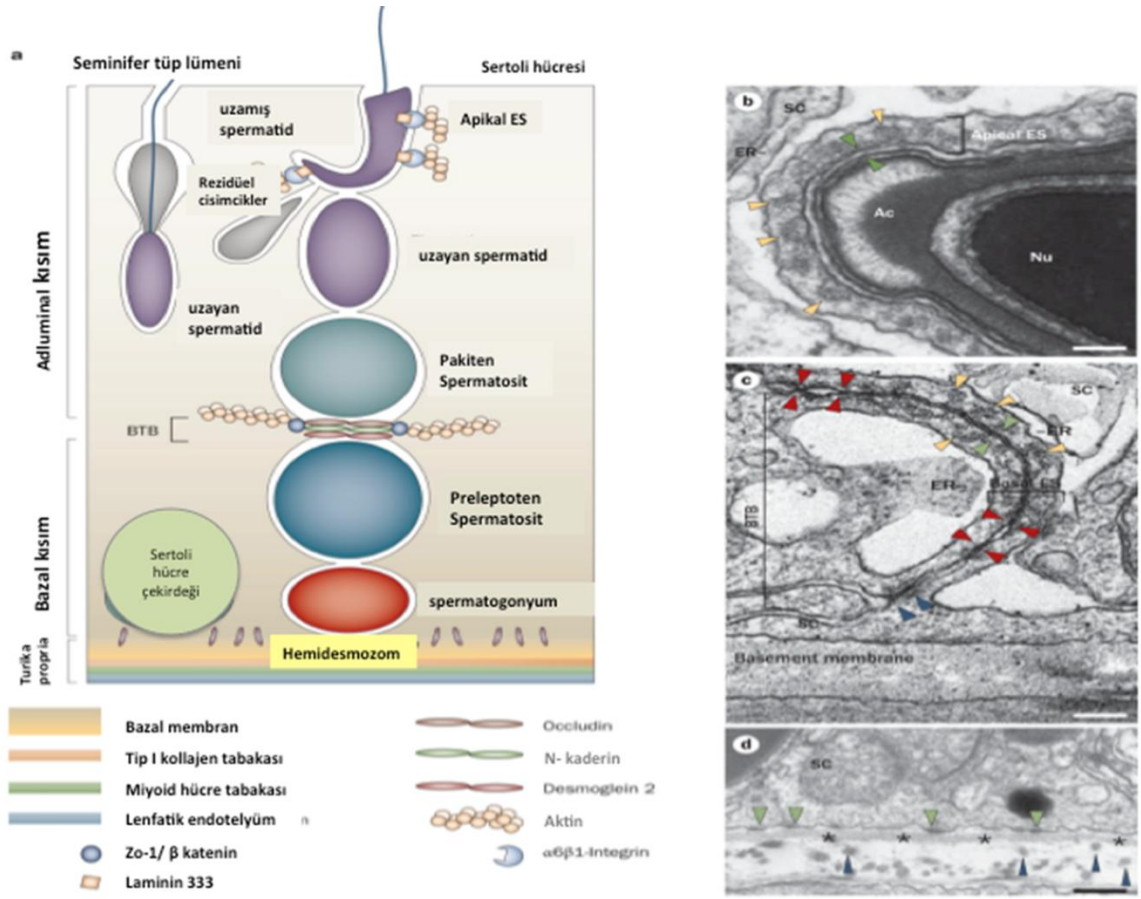


Şekil 1.2. Memeli seminifer tübülün kesiti (Cheng ve Mruk, 2010)

1.2.2. Sertoli ve Germ Hücreleri Arasında Bulunan Bağlantılar

Apikal ektoplazmi spesifikasyonlar (ES), kan-testis bariyeri (BTB) ve hemidesmozom: Testiste bulunan ES bir aktin-bazlı ankraj bağlantı olmakla birlikte iki farklı bölgede bulunmaktadır (Şekil 1.3). İlk konumu seminifer epitelinde mayoz sonrası oluşan spermatidler ve Sertoli hücreleri arasındadır. Bu tür ES apikal ES olarak tanımlanmaktadır ve bu yapı uzamakta olan ve ELS spermatidlerin (ELS = Elongated spermatid) baş kısımlarının tamamına çevrilmektedir (Şekil 1.3a ve şekil 1.3b) (Russell, 1977; Vogl ve ark, 2008; Mruk ve ark, 2008). Uzamakta olan spermatidler, ELS'ler ve Sertoli hücreleri arasında bulunan apikal ES, daha erken aşamadaki spermatidler ve Sertoli hücreleri arasında bulunan desmozom- gap bağlantıların tümünün kaybolması nedeniyle, spermatidlerin gelişmeleri için var olan tek ankraj bağlantı sayılmaktadır. ES'nın ikinci konumu BTB'de bitişik Sertoli

hücreleri arasında ve bazal ES olarak tanımlanmaktadır (Şekil 3c). Ancak birkaç sene önce yapılan çalışmalar desmozomun ve gap bağlantılarının, gap bağlantı proteinlerini ve bazal ES proteinlerini düzenlemek için birlikte çalıştıklarını göstermektedir (Dolayısıyla desmozom- gap bağlantı olarak adlandırılmaktadır). Bu düzenleme belki de farklı bağlantı türleri arasında gerekli çapraz bağlantıları sağlar ve böylece sıkı bağlantı geçirgenlik bariyerini korur (Li ve ark, 2009; Lie ve ark, 2010). Hemidezmozom Sertoli hücresi ve bazal membran arasındaki ara yüzeyde mevcut olan bir ara filaman bazlı hücre-matris ankraj bağlantısıdır (Şekil 3d). Seminifer tübül epitelinde, BTB'nin hemidesmozoma yakın bir bölgede bulunması, sıkı bağlantılar, bazal ES, desmozom ve gap bağlantıların BTB bütünlüğünü sağlamak için hemidesmozom ile etkileşime geçebildiğini göstermektedir (Cheng ve Mruk, 2010).



Şekil 1.3. Memeli testisinin seminifer epitelinin anatomisi (Cheng ve Mruk, 2010)

A) Apikal ES, BTB Ve Hemidezmozomun Anatomik Özellikleri Ve Ilişkileri B) Apikal ES C) BTB D) Hemidezmozom

1.2.3. Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları

Günümüze kadar, çoğu doğrudan germ hücre gelişimi ve hareketi ile ilgili olmak üzere, birkaç Sertoli hücre fonksiyonu tanımlanmıştır. Bu fonksiyonlar yapısal destek sağlamak, geçirimsiz ve immünolojik bir bariyer oluşturmak, germ hücre hareketi ve sperm oluşumuna katılmak, salgı ürünleri ile germ hücrelerini beslemek şeklinde sıralanabilir (Jegou, 1992). Sertoli hücreleri kullanılarak in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmış ve bu hücrelerin germ hücreleri ile fizyolojik ilişkileri belirlenmiştir.

1.2.3.1. Yapısal Destek

Sertoli hücreleri, ekstraselüler matriks bileşenlerinin birikimine doğrudan katılarak ve özel hücre bağlantıların oluşumuna izin vererek seminifer epitelde germ hücrelerini geliştirmek için destek sağlamaktadırlar (Russell, 1993). Sertoli hücrelerinin bir başka çarpıcı özelliği, seminifer epitelin kolektif organizasyonundan sorumlu olan iyi gelişmiş hücre iskelet yapısına sahip olmalarıdır. Morfolojik çalışmalar Sertoli hücre iskeletinin, germ hücrelerin şekillerinin ve pozisyonlarının korumasına, hücre içinde organellerin taşımasına, hücre-hücre ve hücre- ekstraselüler matriks temas bölgelerinde hücre zarının stabilizasyonununa yardımcı olarak gelişmekte olan germ hücrelerinin hareketine ve spermiasyon sırasında seminifer epitelden olgun spermatidlerin serbest bırakılmasına katkı sağladığını göstermektedir. Bu hücrelerin iskeleti aktin, ara filamentler ve mikrotübüller olarak adlandırılan üç büyük bileşenden oluşmaktadır. Her bileşenin epitel döngüsünün 14 aşaması ile ilişkili olarak değişen dağılımlarının, benzersiz bir modele sahip olduğu gösterilmiştir. Bütün bu bileşenler germ hücre hareketinin kolaylaştırmasında önemli bir rol oynamaktadır (Morales ve ark, 1993).

1.2.3.2. Geçirimsiz Bir Bariyer Oluşturmak

Kan-testis bariyeri epitelyumu spermatogonium ve adluminal bölme olmak üzere iki bölüme ayırmaktadır. Spermatogonium bölmesi, pre-leptoten ve leptoten spermatositlerin ikamet ettiği bazal bölmedir. Adluminal bölme ise spermatogenez ve spermiyogenezin çeşitli aşamalarında olan mayotik spermatositler ve spermatidlerin olduğu bölmedir (Cavicchia ve Sacerdote, 1988). Kan-testis bariyerinin üç temel işlevi vardır: özel bir ortam oluşturur, moleküllerin geçişini düzenler ve immünolojik bir bariyer olarak hizmet eder. İlk olarak, kan-testis bariyeri germ hücre gelişimi ve hareketi için gerekli özel bir mikroçevre oluşturarak testisin karmaşık yapısal organizasyonuna doğrudan katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle, Sertoli hücreleri, sentezlemek, salgılamak ve verimli bir şekilde germ hücrelerinin gelişmesi, büyümesi ve farklılaşması için temel olan ürünleri iletmek zorundadır (Mather ve ark,1983). İlk olarak Thorbecke ve arkadaşları tarafından ve daha sonra Skinner ve Griswold tarafından rapor edilen testiküler transferrin sentezi Sertoli hücre özelliklerinin klasik bir örneğidir (Thorbecke ve ark, 1973; Skinner ve Griswold, 1980). Adluminal bölmede bulunan germ hücrelerinin serumda bulunan demire erişimleri olmadığından, bu erişim Sertoli hücreleri tarafından düzenlenen bir taşıma mekanizması ile gerçekleşmektedir. Seminifer epitelin dışında ve içinde, besin ve atık gibi ürünlerin hareketini düzenleyen sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturmaktadır (Madara, 1998) Testislerde, ürünlerin regüle hareketinin en iyi örneği FSH biyolojisinde görülür. FSH'nın en önemli etki merkezi Sertoli hücreleri üzerinde yer almaktadır. FSH kolayca seminifer tubül içine giremediğinden, bu hormonun bağlanacağı reseptörlerin de Sertoli hücre membranının bazal kompartmanda kalan kısmı üzerinde yer alması beklenir. Kan-testis bariyerinin üçüncü temel işlevi, haploid germ hücrelerinin hücre yüzeylerinde bulunan antijenlerinin, organizmanın bağışıklık sistem hücreleri tarafından tanınmaması için immünolojik bariyer oluşturmak ve germ hücrelerini korumaktır. Bu durum kendi spermine karşı aşılanmış olan organizma ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, son zamanlardaki araştırmalar Sertoli hücrelerinin ve germ hücrelerinin interferonlar (IFN'ler), interlökinler (IL'ler) ve sitokinlerin üretimi sayesinde eşsiz bir anti-virüs savunma sistemine sahip olduklarını göstermiştir (Dejucq ve ark,1998).

Kan-testis bariyeri, adluminal bölmeye immünglobulin (Ig) ve lenfosit girişini önlemektedir (Beagley ve ark, 1998).

1.2.3.3. Kan-Testis Bariyerinin Düzenlenmesi

Memelilerin vücudundaki kan-testis bariyeri ve kan-beyin bariyeri, kan damarlarının endotelinde ve epidermiste bulunan sıkı bağlantılarla karşılaştırılabilen sıkı bariyerlerdendir. Ancak, kan-testis bariyeri spermatogenez sırasında oluşan germ hücrelerinin geçişini sağlamak için periyodik olarak açılması gerektiğinden farklı bir mekanizmaya sahiptir. Örneğin, gelişmekte olan pre-leptoten/leptoten aşamasındaki spermatositlerin epitel döngüsünün VIII-IX erken geç dönemde oluştuğu bilinen kan-testis bariyerinden çapraz geçişle geçmesi gerekmektedir (Russell, 1977). Bu süreç Sertoli-Sertoli ve Sertoli-germ hücre bağlantılarının koparılıp yeniden birleştirilmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu aynı zamanda, kan-testis bariyerinin olağanüstü dinamik doğasını göstermektedir. Ancak, germ hücre hareketini sağlayan mekanizma(lar)'ın aydınlatılması gerekmektedir. Buna ek olarak, kan-testis bariyerinin oluşumunu ve bakımını düzenleyen faktör(ler) şu anda bilinmemektedir. Burada gonadotropinlerin rol oynadığı bilinmektedir ancak büyük ölçüde keşfedilmemiş kalan noktaları mevcuttur. Yakın zamana kadar kan-testis bariyerinin biyolojisi hakkında yapılan çalışmalardaki bilgi eksikliği, büyük ölçüde Sertoli hücresi sıkı bağlantı dinamiklerini incelemek için in vitro ve in vivo ortamdaki uygun modellerin eksikliğinden kaynaklanmıştır.

1.2.3.4. Germ Hücre Translokasyonuna Yardımcı Olmak

Sertoli hücreleri göç eden germ hücrelerinin fibroblastlarda olduğu gibi intrensek bir haraket kabiliyetleri bulunmadığı için, Sertoli hücreleri göç eden germ hücrelerinin hareketine katılırlar (de Kretser ve Kerr,1988) Germ hücre hareketinin altında yatan olası bir mekanizma GTPaz süper ailesinin üyelerini içermektedir (Lau ve Mruk, 2003) Ayrıca, diğer araştırmalar seminifer epitel boyunca uzayan spermatidler/ELS

translokasyonunun, büyük ölçüde ES tarafından kazandırıldığını göstermiştir (Vogl AW ve ark, 2000). ES bölgesinde mevcut olan dynein (Gutmann ve ark, 2000) ve Miyozin-VIIa (Velichkova ve ark, 2002), ATPazları, ve GTPazları (Lui ve ark, 2002) gibi birkaç motor proteininin mikrotübüllerle birlikte seminifer epitel boyunca uzayan spermatidler/ELS'lerin göçüne yardım ettikleri gösterilmiştir. Sertoli-Sertoli ve Sertoli-germ hücrelerinin sıkı bağlantılarının koparılmasını gerektiren bu süreç, yüksek ölçüde seçici bir süreçtir. Örneğin Tip-A spermatogonyumun kaldırılması mümkün değildir fakat bazal membrana bağlı kalmak zorundadır. Bu durum spesifik hücre tiplerinin bazal membrandan bazal kompartmana taşınabilmesi için ilginç bir mekanizmanın var olduğunu göstermektedir.

1.2.3.5. Spermiasyon

Sertoli hücreleri, olgun spermatidlerin seminifer epitelinden serbest bırakılması için gereklidirler. Bu işlem, bir dizi mekanizmayı kapsamaktadır. Bunlar: Sertoli hücre sitoplazmik süreçler tarafından spermatidin baş kısımlarının kapsüllenmesi, Sertoli hücre kriptlerinden spermatidlerin dışarıya çıkarılması; ve spermatid baş kısımlarının serbest bırakılmasını içermektedir (Russell, 1993; Mruk ve Cheng, 2004).

1.2.3.6. Fagositoz

Sertoli hücre sitoplazmik kriptlerinden, olgun spermatidlerin serbest bırakılmaları sonrasında, Sertoli hücreleri spermatogenez sırasında dejenere olan spermatidleri ve diğer germ hücrelerinden serbest bırakılan artık organları fagosite etmektedir. Bu bağlamda, Sertoli hücreleri seminifer epitel bütünlüğünü koruyarak makrofajlar gibi işlev görmektedirler (Morales ve Clermont, 1991; Mruk ve Cheng, 2004).

1.2.3.7. Pinositoz Ve Reseptör Aracılı Endositoz

Fagositoza ek olarak, çalışmalar Sertoli hücrelerinin sırasıyla epitelin adluminal ve bazal bölümlerinde aktif pinositoz ve reseptör aracılı endositoz yapabildiklerinin göstermiştir (Dai ve ark, 1987).

1.2.3.8. Sekretuvar Fonksiyonu

Sertoli hücreleri salgı hücreleridir. Sertoli hücreleri tarafından üretilen toplam proteinlerin yaklaşık %15'i salgılanacak olan glikoproteinlerdir. Birçok çalışmada belirtilen bu salgı proteinleri, array (dizi) ile tespit ve karakterize etmişlerdir; bu proteinler proteazlar, proteaz inhibitörleri, hormonlar, enerji substratları, büyüme faktörleri, parakrin faktörler, ve ekstrasellüler matriks komponentlerini içermektedir (Benahmed, 1996) ve (Dorrington ve ark,1993; Mruk ve Cheng, 2004).

1.2.3.9. Besin Sağlanması

Çoğu germ hücrelerinin sağ kalımı için önemli olan amino asitler, karbonhidratlar, yağlar, vitaminler, metal iyonları gibi Sertoli hücre ürünlerinin, kan-testis bariyeri arkasında bulunan spermatidler ve spermatositler için yeterli miktarda sentezlenmeleri ve onlara verimli bir şekilde ulaştırılmaları gerekmektedir. Bu iki hücre tipi arasındaki karmaşık ilişki (Bardin ve ark,1988), Sertoli hücrelerinden germ hücrelerine besleyici maddelerin transferini büyük ölçüde mümkün kılmaktadır. Germ hücrelerinin kültür ortamında 24 saat kültür edildikten sonra (Boekelheide ve ark, 2000) hayatta kalma yeteneğine sahip olmamaları, bu hücrelerin besleyici tabaka olmaksızın kültür ortamında yaşamadıklarının göstergesidir. Varsayılan bir Sertoli hücre ürünü olan ve in vitro germ hücre apoptozunu engelleyen (Yan ve ark, 2000) kök hücre faktörü, germ hücre sağ kalımının büyük oranda Sertoli hücrelerine bağlı olduğunu göstermektedir. Nitekim daha önceki çalışmalarda, Sertoli hücrelerinin germ hücreleri ile ko-kültüre edildiği zaman in vitro koşullarda germ hücrelerinin

yaklaşık 8 gün hayatta kaldıkları gösterilmiştir (Tres ve Kierszenbaum, 1983). Germ hücrelerinin in vivo ve in vitro ortamda sağ kalımlarını arttırabilen faktörlerin, hormonların (testosteron, dihidrotestosteron ve estradiol gibi) ve sitokinlerin testis dokusundan salgılandığı gösterilmiştir (Mruk ve Cheng, 2004).

1.3. Spermatogenez / Steroidogenez - Genel Bakış

Spermatogenez, erkek germ hücrelerinin olgunlaşması ve çoğalması ile sonuçlanan karmaşık bir süreçtir (de Rooij, 2001). Spermatogenez özellikle seminifer tübüllerin epitelinde meydana gelmektedir ve mitoz, mayoz, spermiyogenez ve spermiasyon olarak dört ayrı evreyi içermektedir. Bu süreç boyunca hücreler, yavaş yavaş bazal membrandan yukarı doğru matur spermatozoa haline gelerek, lümene doğru serbest bırakılmak üzere hareket etmekte ve kasılma hareketleriyle epididime geçmektedirler. Bu hücreler tam olgunlaşıp motilite yeteneği kazanana kadar epididimde korunmaktadırlar. Tüm süreç spermatogenezin seminifer epitel döngüsü olarak adlandırılmaktadır. Farklı morfolojik kriterler bakımından incelendiğinde spermatogenez, erkeklerde altı aşamada; farelerde on iki ve sıçanlarda on dört aşamada gerçekleşmektedir (Walker, 2009; Mathur ve ark, 2011)

Puberte başlangıcında spermatogenez tip B spermatogoniaları oluşturmak üzere kök hücrelerin (ilkel tip A spermatogonium) bölünmesiyle başlanmaktadır. Testisin seminifer tübüllerinde bulunan bu diferansiye olmuş spermatogonial kök hücreler mitoz ile bölünerek preleptoten primer spermatositlerini oluşturmaktadırlar. Primer spermatositler birinci mayoz bölünme ile haploid sekonder spermatositlere dönüşmektedir. Sekonder spermatositler de ikinci mayoz bölünme geçirerek yuvarlak (round) spermatidleri meydana getirmektedirler. Böylece her bir primer spermatositten 4 adet spermatid meydana gelmektedir (Hess ve ark., 2009). Mayoz bölünmenin tamamı Sertoli hücrelerinin kendi aralarında sitoplazmik uzantılarıyla oluşturdukları kan-testis bariyerinin arkasında yani vücudun immün sistem hücrelerinin bulunmadığı ortamda gerçekleşmektedir (Mathur ve ark, 2011).

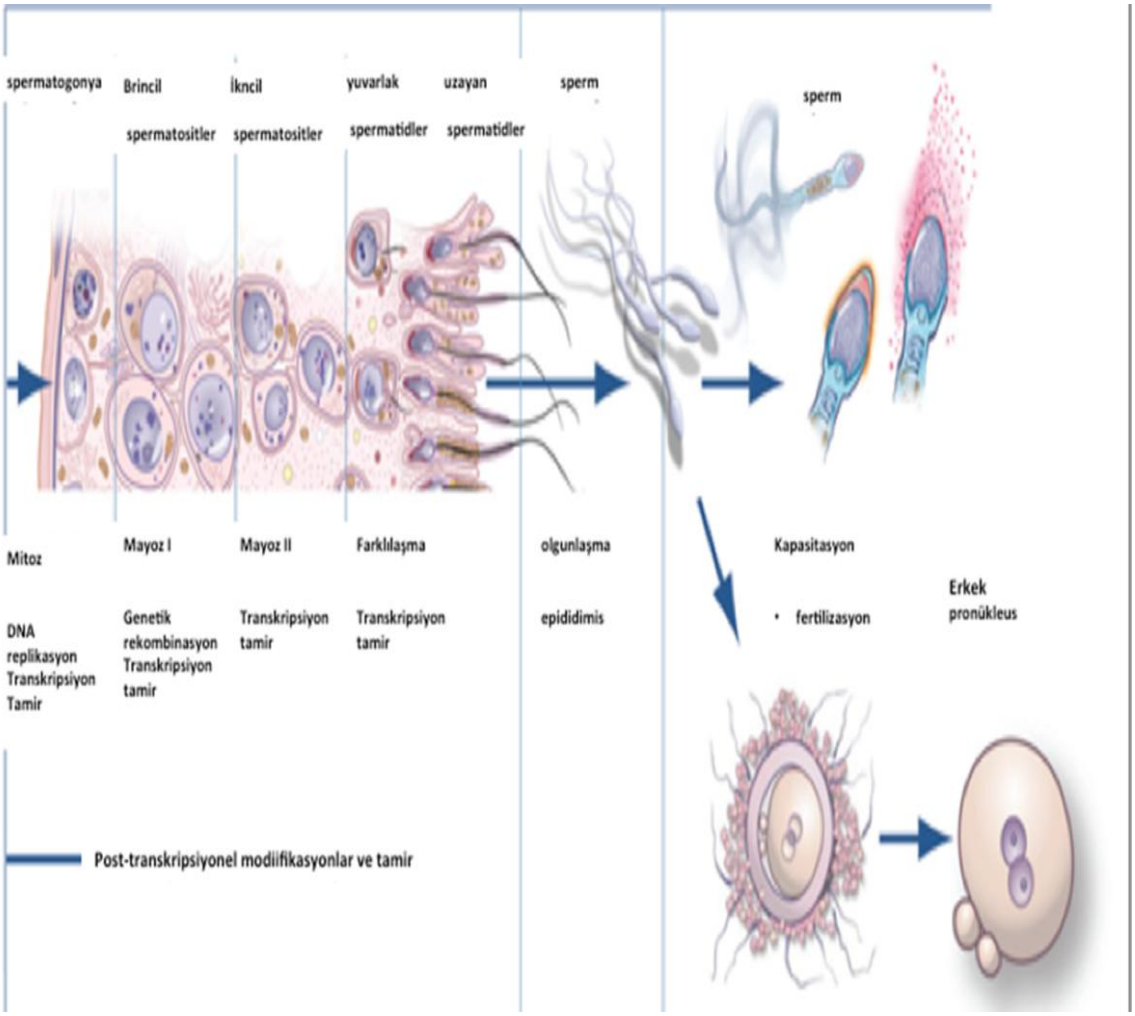
Bu karmaşık süreç, gelişimsel spermatogenez boyunca düzenlenmiş olan ve germ hücre gelişiminin belirli aşamaları sırasında temel roller oynayan proteinleri kodlayan genlerin ifadesi yoluyla düzenlenmektedir. Ökaryotlarda her hücre aynı genleri içerir ancak bulunan tüm genler, her hücrede ifade olmamaktadır. Bazı genler sadece gerekli olduklarında ifade edilir ve farklılaşan hücrelerin benzersiz özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır (Ketkar ve Reddy, 2013).

1.3.1. Spermatogenez Siklusunun Süresi

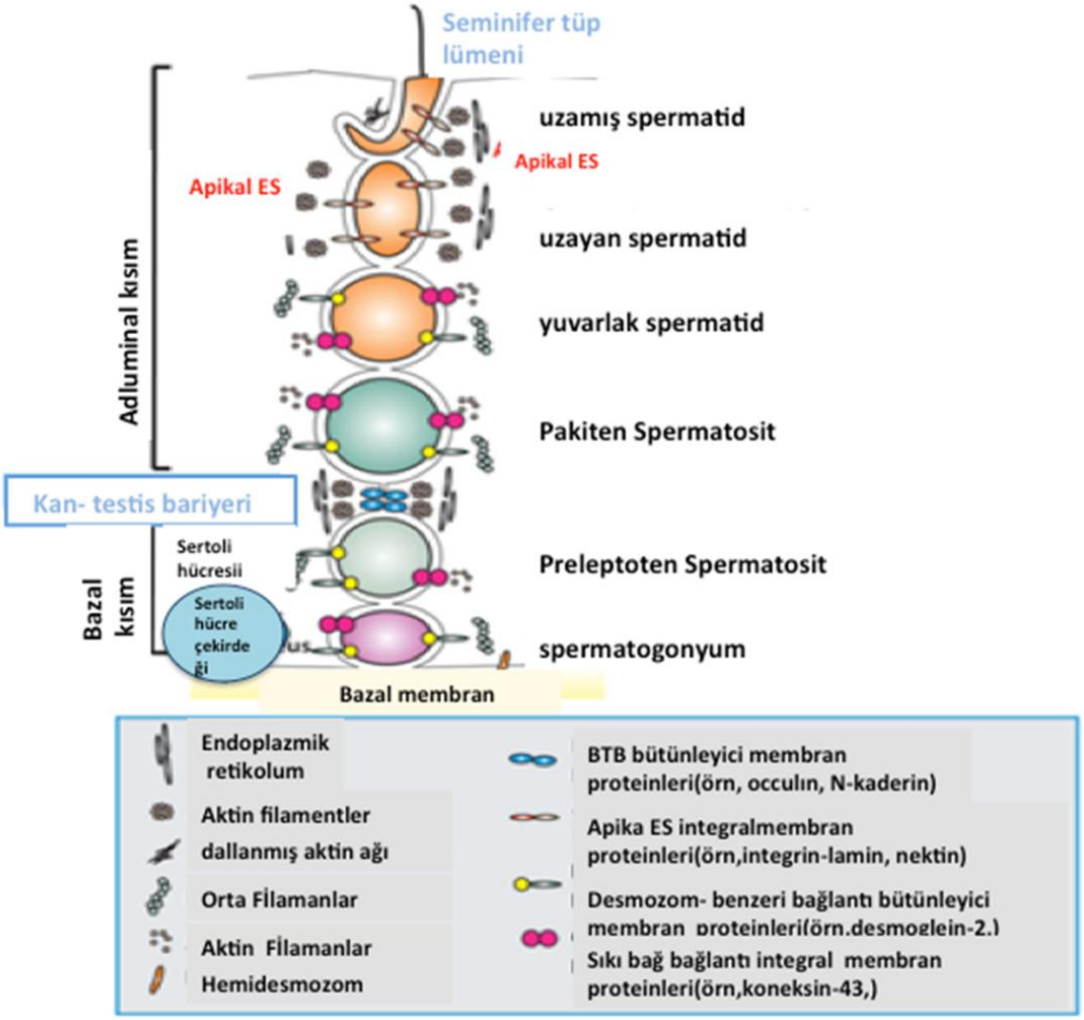
Misell ve arkadaşları (2006) spermatogenezin başladığı andan itibaren, oluşan spermlerin menide görünme süresinin yaklaşık 64 gün olduğunu ilk defa göstermişlerdir. Bu süre daha önceki tahmin edilen 70-80 günlük süreden önemli ölçüde daha kısadır. Bir spermatogonium hücresinin mayoz bölünmeye girdikten sonra ejakulatta görülmesi için geçen ortalama süre 64 ± 8 gündür (42-76 gün). Normal erkeklerde, seminifer epitelinden serbest bırakılan sperm, sonraki ejakulasyondan önce eski ve yeni sperm karışmaksızın koordineli bir şekilde epididime girmektedir (Mruk ve Cheng, 2004; Mathur ve ark, 2011).

1.3.2. Spermatogenezde Bulunan Önemli Evreler

Spermatogenez özellikle seminifer tübüllerin epitelinde meydana gelmektedir ve **mitoz, mayoz, spermiyogenez ve spermiasyon** olarak dört ayrı evreyi içermektedir (şekil 1.4). Bu süreç boyunca hücreler, yavaş yavaş bazal membrandan yukarı doğru matur spermatozoa haline gelerek, lümene doğru serbest bırakılmak üzere hareket etmekte (şekil 1.5) ve kasılma hareketleriyle epididime geçmektedirler. Bu hücreler tam olgunlaşıp motilite yeteneği kazanana kadar epididimde korunmaktadırlar. Tüm süreç spermatogenezin seminifer epitel döngüsü olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 1.4. Spermatogenez sırasında oluşan hücresel değişiklikler (du Plessis ve ark, 2011)



Şekil 1.5. Memeli seminifer epitelinde apikal ES, BTB'de bazal ES, Gap bağlantı ve desmozom benzeri bağlantıların relatif lokalizasyonunu gösteren şematik şekil (CHENG ve MRUK, 2011)

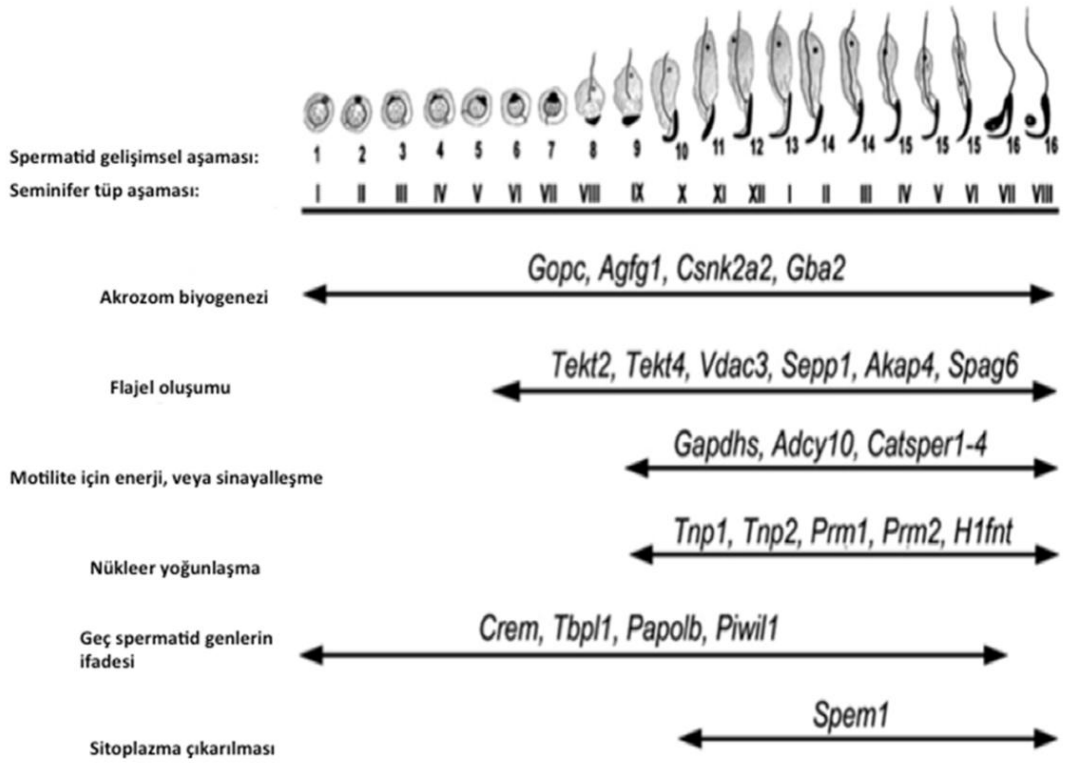
1.3.2.1. Spermatogenez Evresi

Spermatogenez son derece kompleks, diploid germ kök hücrelerden haploid sperm hücresinin diferansiye edildiği bir farklılaşma sürecidir. Gelişimsel süreç, spermatogoniumların mitoz ile çoğalması ile seminifer epitelin bazal bölmesinde başlar ve spermatositlere diferansiyasyonuna kadar uzanır. Spermatogoniaların mitoz bölünme ile çoğalması, mitotik faz olarak adlandırılmıştır. Primer spermatositler daha sonra peşpeşe iki mayoz bölünme geçirerek haploid yuvarlak spermatidler haline dönüşmektedirler (Yan, 2009).

1.3.2.2. Spermiyogenez Evresi

Spermiyogenez olarak adlandırılan son aşama, yuvarlak spermatidlerin ELS'lere ve spermatozoaya diferansiye olmasıyla karakterize, kompleks bir morfogenez sürecidir. Spermiyogenez germ hücrelerinin olgunlaşması olarak tanımlanmaktadır. Başka bir deyişle yuvarlak spermatidlerin olgun spermatozoa oluşturacak şekilde metamorfoza uğraması sürecidir. Bu sırada spermatidin sitoplazmasında ve nükleusunda önemli morfolojik, hücresel ve moleküler değişiklikler gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler spermatidin baş kısmında hücre çekirdeğini oluşturan genetik materyalin yoğunlaştırılması, kısmen çekirdeği kapsayan akrozom gelişimi, orta kısımda sıkı şekilde paketlenmiş mitokondri oluşumu ile birlikte kuyruk uzaması, sitoplazma kaybı, sitoplazma içinde bulunan organellerin yer değiştirmesi ve histon proteinlerinin protaminlerle yer değişimi ile karakterize olmaktadır (Cheng ve Mruk., 2011). Esas olarak, her aşama gelişmekte olan germ hücreleri (özellikle spermatidler olarak) ve Sertoli hücreleri arasındaki eşsiz hücresel bağlantılardan oluşmaktadır ve ve bu hücresel bağlantılar seminifer tüp kesitlerde net olarak gözlemlenebilir (Cheng ve Mruk, 2011).

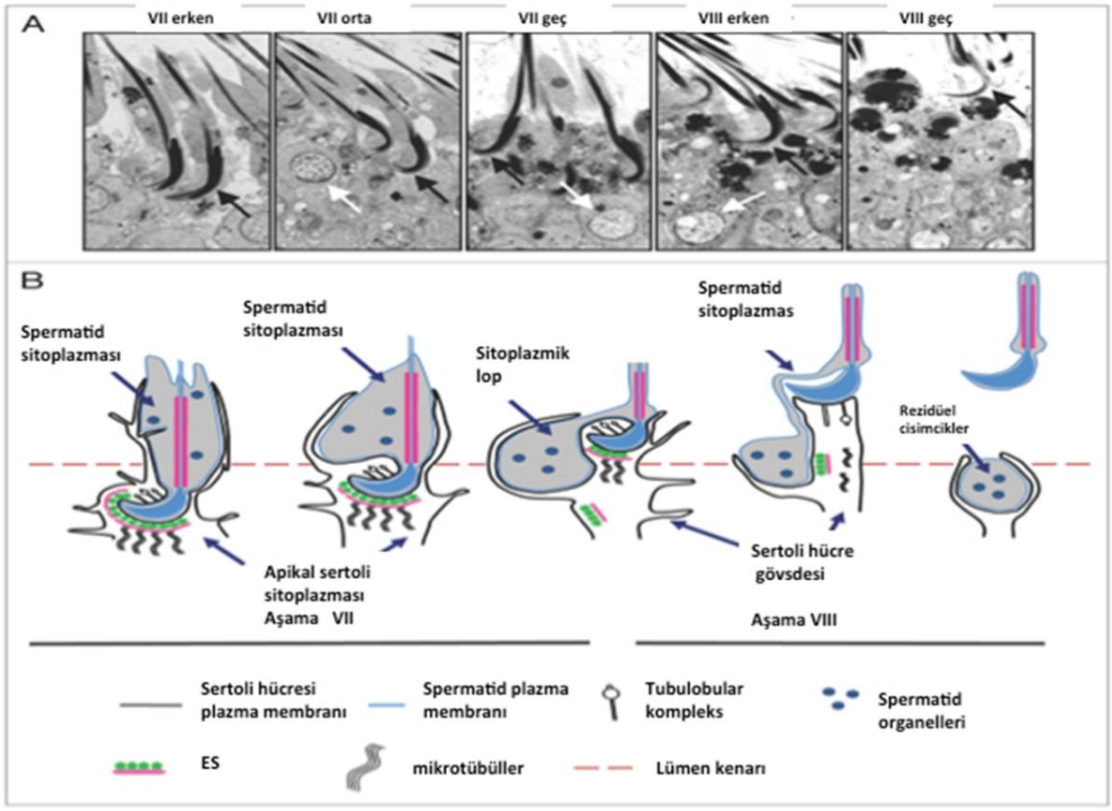
Spermiyogenez erkek haploid germ hücrelerine özgüdür. Bu benzersiz süreç genellikle özgül fonksiyonlarını yürütmek için kendine özgü gen ve gen ürünlerine ihtiyaç duymaktadır. Farede yapılan "knock out" çalışmalarda spermiyogenezin aşamaları için gerekli olan genler belirlenmiştir. Bu genlerin bazıları şekil 6'da gösterilmiştir (Şekil 1.6). Spermiyogenez 16 aşamayı içermektedir (1 ila 16 ile etiketlenen) ve seminifer epitel aşamaları arasında spesifik ilişkiler romen rakamlarıyla gösterilmektedir (1 ila 8'e kadar). Yaklaşık 600 tane testise özgü protein kodlayan genler arasından, yaklaşık 350 geninin haploid erkek germ hücrelerinde spesifik olarak ifade edildiği bulunmuştur (Yan, 2009).



Şekil 1.6. Spermiyogenezin aşamaları için gerekli olan bazı genler (Yan, 2009)

1.3.2.3. Spermiasyon Evresi

Spermiasyon yeni biçimlenmiş olan spermatozoanın Sertoli destek hücrelerinden ayrılarak seminiferus tübüller boyunca dışarıya çıkarılmak üzere rete testise doğru sevk edilmesi süreci olup seminifer tübül epitelinin apikalinde birkaç gün içinde gerçekleşmektedir (Şekil 1.7). Spermiasyon, spermatid baş ve sitoplazmasının yeniden modellenmesi, özel adezyon yapıların ayrılması ve son olarak spermatidin Sertoli hücresinden ayrılması olmak üzere birçok farklı basamakları içermektedir. (O'Donnell ve ark, 2011).



Şekil 1.7. Spermiasyon süreci (O'Donnell ve ark, 2011)

a) Normal erişkin sıçanda spermiasyon morfolojisi vii erken aşamasının viii geç evresine kadar hemen ayrılmadan önce b) Spermiasyon sürecinin diagramı

Spermiasyon çeşitli yapılar ve adezyon kompleksleriyle, ultra-yapısal düzeyde olan ilginç bir süreçtir. Bu kompleks yapılar normal spermin verimli olarak salınması için birlikte çalışmaktadır. Spermiasyon ES yapısının etkin olarak çözülmesine ihtiyaç duymaktadır. Bu süreç, spermiyogenez boyunca germ hücrelerinin ES'den kolaylaştıırlmış kopma mekanizmalarında yeni bakış açıları ortaya çıkarmaktadır. İntegrin merkezli adezyon bağlantıları, bir çözünme esnasında spermatid için sıkı bir yapışma sağlamaktadır. Bu durum, Sertoli hücrelerinin spermatid baş kısmına tutunmasına ve spermatid sitoplazması kaldırıldığı anda onun seminifer tübül lümenine doğru uzamasına izin vermektedir. Bu adezyon bağlantıların bileşimi spermiasyon ilerledikçe değişmektedir. Bazı adezyon ile ilgili proteinler, sadece spermiasyon başlangıcında belirgin hale gelirken, diğerleri spermiyogenezin uzama aşaması sırasında spermatid-Sertoli hücre arayüzünde (interface) kalmıştır. ES yapısından ayrılırken, adezyon ilişkili bir protein alt kümesi rol alır Diğer proteinler

kopmaya kadar sürekli bulunup daha sonra lümen içine spermatidlerin anlık serbest bırakılmasına aracılık edebilmektedirler. Spermiasyonun çeşitli aşamaları tamamlanırken ve Sertoli hücreleri spermatidleri serbest bırakmak için hazırlarken spermatid sürecinde yer alan adezyon bağlantıları sürekli tranformasyona uğramaktadırlar. Spermiasyon, spermatogenezin final matürasyon aşaması olduğu için bu süreç sperm morfolojisinde katkı sağlamaktadır. Bu nedenle bu sürecin erkek fertilitesini optimize etmek için önemli etkisi vardır. Doğum kontrolü ve belki de kısırlık için bilinen bir hedef olarak tasarlanmış spermiasyonu bozan veya ilerleten ajanlar erkek fertilite mekanizmasında terapötik etkiye sahip olacaktır (O'Donnell ve ark, 2011).

1.3.3. Spermatogenezde Etkili Olan Regülatörler

Sertoli-germ hücrelerinin büyük etkileşimleri spermatogenez boyunca seminifer epitelinde gerçekleşebilmektedir (Cheng ve Mruk, 2002; Mruk ve Cheng, 2004; de Kretser ve Kerr, 1994; Parvinen, 1982; Kierszenbaum,1994; Russell, 1980). Spermatogenez bir germ hücresinin bazal bölgeden adluminal bölgeye hareket ederek olgun sperme gelişmesi olarak tanımlanmasına rağmen bu süreç çok fazla sayıda uygulamalar içermektedir. Aynı zamanda bu olayın kolaylaştırılması için germ ve Sertoli hücrelerinin sinyalleşmelerine gerek duyulmaktadır. Bu sinyal sekanslar tam olarak açıklanamasa da en az iki kaynağı bulunmaktadır: Tübül dışından gelen eksternal sinyal (örneğin., Leydig hücreleri, peritübüler Miyoid hücreler ve hipofiz bezinden salınan parakrin ve hormonal faktörler), ve germ ve Sertoli hücreleri arasında bulunan internal etkileşimler (örneğin., integrin aracılı siyalizasyonlar) (Gnessi ve ark, 1997; Dym, 1994; Griswold, 1995).

1.3.3.1. Hipotalamus-Hipofiz-Gonad Ekseninin Regülatörleri

Spermatogenez, hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin hormonal iletişimi sonucunda devam etmektedir (Meng ve ark, 2005; Fritz ve ark, 1976; Mathur ve ark, 2011). Bu

eksenin disfonksiyonu kısırlığa yol açmaktadır (Sharpe, 1994; Sokol, 2009). Hipotalamustan salgılanan Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ön hipofizden lüteinize edici hormon (LH) ve Follikül uyarıcı hormon (FSH) salınmasını uyarmaktadır. LH Leydig hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanıp testosteron üretimini sağlamaktadır. Testosteron spermatogenezle ilişkili olan ve erkek sekonder cinsiyet karakterlerini belirleyen çok önemli bir hormondur.

FSH, spermatogonyumdan itibaren sperm hücrelerinin çoğalma, hayatta kalım ve gelişmesinden sorumludur. Aynı zamanda, fötal ve pubertal dönemlerde Sertoli hücrelerinin çoğalmasında da rol alır (Cooke ve ark, 1992; Cortes ve ark, 1987). Sertoli hücrelerinde büyüme faktörü ve interlökinlerin yapılmasını uyararak, spermatogonyumların gelişmesini sağlar (Ruwanpura ve ark, 2008; Cooke ve ark, 1992; Cortes ve ark, 1987; Parvinen, 1982).

FSH'nın infertilitede önemli role sahip olmasının yanı sıra, FSHR genetik anormallikleri normal üremeyi etkilemektedir. FSHR'nin Ala189Val homozigos mutasyonu indirgenmiş testis hacmi, yüksek FSH konsantrasyonu ve bozulmuş spermatogenez ile sonuçlanmaktadır (Tapanainen et al. 1997; Kris Lend ve ark, 2010).

Ayrıca ön hipofizde üretilen FSH, Sertoli hücreleri üzerinden androjen bağlayıcı protein (ABP) üretilmesini sağlamaktadır. ABP testislerde testosteron konsantrasyonu için gereklidir ki bu da spermatogenezin etkili biçimde ilerlemesine aracılık etmektedir. Fritz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ABP salınımının artması FSH etkisindeki ratlardan elde edilen primer Sertoli hücre kültüründe *in vitro* ortamda gösterilmiştir. Bu sonuçlar ABP'in Sertoli hücreleri vasıtasıyla üretilmesini göstermektedir (Fritz v ark, 1976; Mathur ve ark, 2011).

Santiemma ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ABP'in FSH'ya yanıt olarak salınması primer insan Sertoli hücre kültüründe gösterilmiştir. Ayrıca ABP'in kültür ortamında salınımının FSH dozuna bağlı olduğu bu çalışmada tespit edilmiştir (Santiemma ve ark, 1992).

ABP testiste spermatogenezin ilerlemesini sağlamasının yanı sıra testosteronun bağlanması için gerekli olan bir reseptör olarak vazife görmektedir (Mathur ve ark., 2011).

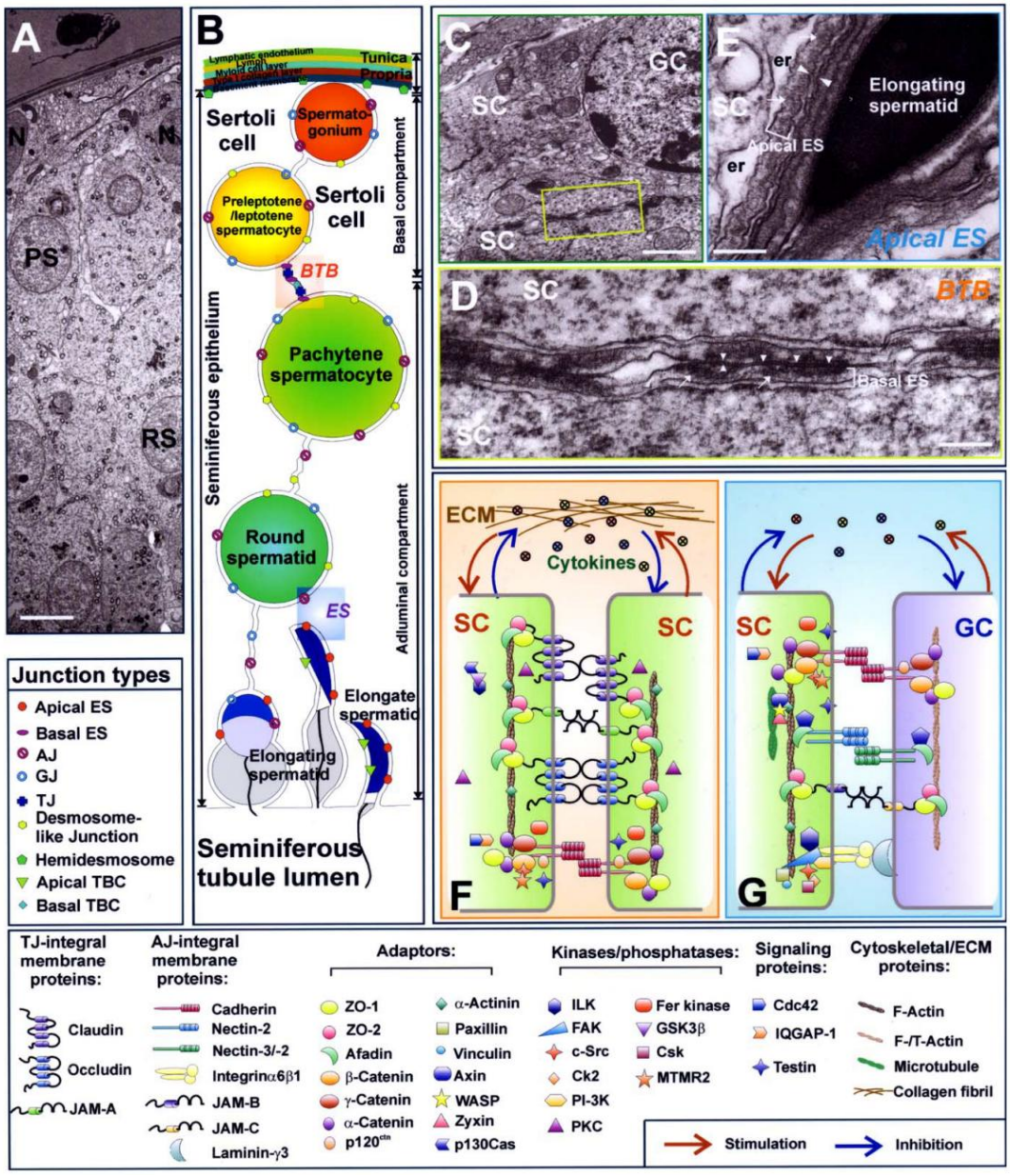
Testis ABP, Sertoli hücre salgı ürünüdür. Aynı zamanda Sertoli hücre fonksiyonu ve gelişimi için belirteç olarak sayılmaktadır. Sertoli hücreleri tarafından üretilen ve bir salgılama proteini olan ABP testis ve epididimde androjen seviyelerini düzenleyerek spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Son 25 yıl içerisinde yapılan çalışmaların çoğu, ABP'in bu fonksiyonunu teyit etmektedir (Munell ve ark, 2002).

Ayrıca, androjene bağlanan ABP çeşitli deneysel modellerde fertilite ve spermatogenezin düzenlemesine katkıda bulunmaktadır. ABP transgenik farelerin testislerinde infertiliteye yol açan yapısal ve fonksiyonel anormallikler görülmektedir (Chang ve ark, 2004).

1.3.3.2. Apical ES, BTB ve Hemidesmozom Ekseninin Regülatörleri

Spermiasyon ve BTB'in yeniden yapılanması kısmen ES–BTB–hemidesmozom ekseni tarafından koordine edilmiştir. Spermiasyon - Olgun spermin Sertoli hücrelerinden ayrılması - preleptoten spermatositlerin BTB arasından ayrılması ve leptoten, zigoten ve pakiten spermatositlere dönüşmesidir. Başka bir değişle BTB'in seminifer epitel döngüsünün VIII safhasında yeniden yapılanması spermatositlerin geçişini kolaylaştımaktadır. Aynı zamanda ELS-Sertoli hücreler bağlantılarının çözülmesi bu bölümde gerçekleştiği için apikal ES olarak adlandırılmaktadır (şekil 1.8). Geçtiğimiz on yıl içindeki çalışmalar protein ve/veya biyomolekül içeren dört farklı grubun bu fonksiyonel ekseninin düzenlenmesini göstermektedir: Polarite proteinleri, sitokinler, testosteron ve reseptör olmayan protein kinazlar. İmmünolojik bariyer fonksiyonu spermatositlerin göç etmeleri esnasında muhafaza edilmesi gerekirken, ayrıca, son on yıl içindeki çalışmalar, transforme edici büyüme faktörü (TGF) -β3, tümör nekroz faktörü (TNF) gibi sitokinlerin ve testosteronun, BTB'nin

bütünlüğü üzerinde ters etkiye sahip olduklarını göstermektedir: Sitokinlerin Sertoli hücre sıkı bağlantı geçirgenliği bozmalarına rağmen, (Xia ve ark, 2006; Li ve ark, 2006; Lui ve ark, 2003; Wong ve ark, 2004) testosteron bu bağlantıyı desteklemektedir (Meng ve ark, 2005; Wang ve ark, 2006; Yan ve ark, 2008).



Şekil 1.8. Spermatogenez ve hücre bağlantıları memeli seminifer epitelinde

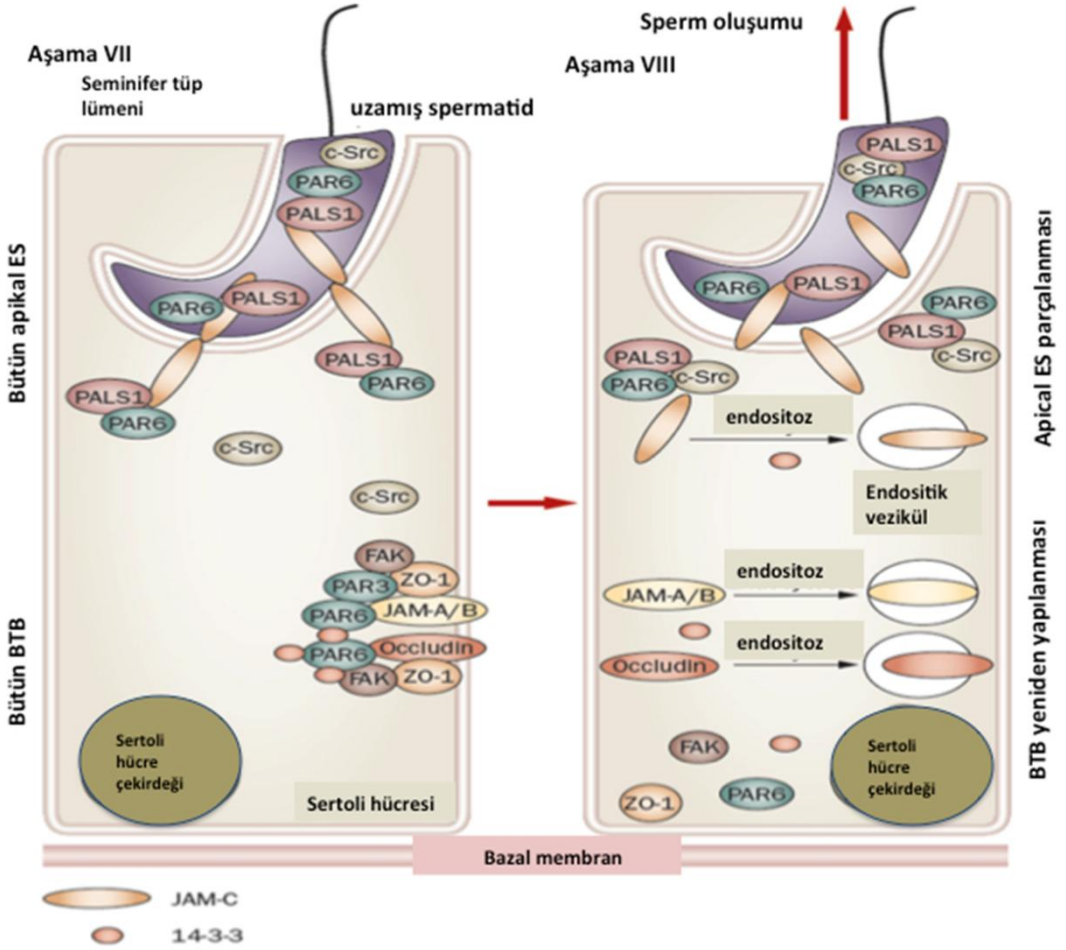
(A) Sertoli ve germ hücreleri arasındaki ilişkisini gösteren elektron mikrograf (B) Gelişmekte olan germ hücrelerinin şematik şekli ve Sertoli hücreleriyle spermatogenez sırasında ilişkileri (C–E) Küçük ve büyük büyütmede BTB'ini gösteren elektron mikrograf (Xia ve ark, 2005).

1.3.3.2.1. Polarite Proteinleri

Ancak testiste seminifer epitelinde bulunan ve BTB proteinlerinden olan Crumbs (CRB), Scribble ve hatalı bölümleme (PAR) protein kompleksleri aynı zamanda da apikal ES'de lokalize edilmiştir. Bu polarite proteinleri testiste fonksiyonel eksenin düzenlenmesi için gereklidirler (Şekil 9) (Cheng ve Mruk, 2010). Polarite proteinler ayrıca protein endositozu, geri dönüşüm ve belki de germ hücre göçü sırasında seminifer epitelin yeniden yapılandırılması için etkili bir mekanizma oluştururlar (Cheng ve Mruk, 2010).

1.3.3.2.2. Reseptör Olmayan Protein Kinazlar

Reseptör olmayan protein kinazlarlardan olan PAR6 protein kompleksinin bir önemli regülatörü apikal ES'de birleşmeyi sağlamaktadır (Wong ve ark, 2008). Diğer bir reseptör olmayan protein tirozin kinazlardan olan Fokal adezyon kinaz (FAK), yetişkin fare testis BTB'sinin occludin–ZO-1 protein kompleksinin entegre bir bileşenidir (Siu ve ark, 2003). İlginç bir şekilde, bu proteinin fosforile ve aktive formları apikal ES yerine ağırlık olarak BTB'de lokalize edilmiştir (Beardsley ve ark, 2006). FAK'ın Sertoli hücrelerinde RNAi ile susturulması (yıkılması) occludin–ZO-1 protein kompleksini bozan, occludin fosforilasyonu bozar (Siu ve ark, 2009) ve protein endositozunda bir artış ile occludin ve ZO-1'in hücre yüzeyinden sitozola (Siu ve ark, 2009) yeniden lokalizasyonuyla sonuçlanmaktadır (Setchell ve ark, 2008). Bu bulgular BTB dinamiklerinde FAK'ın önemini göstermektedir (Şekil 1.9), (Cheng ve Mruk, 2010).



Şekil 1.9. Polarite proteinler ve reseptör olmayan protein tirozin kinazların rolü apikal ES-KTB fonksiyonal ekseninde (Cheng ve Mruk, 2010).

1.3.3.2.3. Sitokinler ve Testosteron

Sitokinler, memelilerde hemen hemen her çekirdekli hücre tarafından üretilen ve bir otokrin veya parakrin faktörü olarak, hücre fizyolojisi üzerinde pleitropik etkilere sahip olan düzenleyici peptidlerdir. (boyut olarak genellikle 30 kDa)(Vilcek, 2003). Testiste, Sertoli ve germ hücreleri, TGF-b süper ailesinin üyeleri (örneğin, TGF-bs, Aktivinler, İnhibinler), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), interlökinler (örneğin, IL-1, IL-6, IL-11), tümör nekroz faktörü (örneğin, TNFa, Fas ligandı), interferonlar (örneğin, IFN-a, IFN-g), fibroblast büyüme faktörü (FGF), sinir büyüme faktörü (NGF) ve kök hücre faktörü (veya steel faktörü) içeren bazı sitokinleri üretmektedirler (çizelge 1)(Cheng ve Mruk, 2002; Mruk ve Cheng, 2004; Gnessi ve

ark, 1997; Mruk ve Cheng, 2000; Bardin ve ark, 1994). Bu sitokinler muhtemelen Sertoli ve germ hücreler arasındaki ilişkiye, seminifer epitelde germ hücrelerin hareketlerinin kolaylaştırılmasına ayrıca germ hücre diferansiyasyonu gibi diğer hücresel olaylara epitel döngü boyunca aracılık etmektedir (Xia ve ark, 2005).TGF-β, epidermal büyüme faktörü (EGF), interlökin(IL)-1α, IL-13 ve TNF gibi sitokinlerin farklı epitel dokularda sıkı bağlantıların fonksiyon düzenlenmelerinde rol oynadıkları açıkça gösterilmiştir (Walsh ve ark, 2000; Xia ve ark, 2005; Turner, 2009; Li, 2009; Koch ve Nusrat, 2009; Kirschner ve ark, 2009). Örneğin, TNF, occludin endositozunu uyararak intestinal bariyer fonksiyonunu bozabilmektedir. Ancak BTB bariyerinde sitokinlerin kesin rolü on yıl önceye kadar belirlenmemiştir. Ilk defa TGF-β ve TNF'nin Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantı geçirgenlik bariyerinin kurulmasına etki ettiği rapor edilmiştir (Lui ve ark, 2003; Siu ve ark, 2003; Lui ve ark, 2001). O zamandan beri, sıçanlarda ek in vivo çalışmalar, BTB'nin sırasıyla TGF-β ve TNF ile aktif edilen p38 mitojen aracılı aktive edilmiş protein kinaz (Xia ve ark, 2005; Xia ve ark, 2006; Lui ve ark, 2003; Wong ve ark, 2004) ve c-Jun N-terminal kinaz (Li ve ark, 2006; Wong ve ark, 2005) sinyal yolakları tarafından düzenlenir olduğunu göstermiştir. Bu bulgular sitokinlerin germ hücre apoptozisini etkilemelerine rağmen (Pentikainen ve ark, 2001; Suominen ve ark, 2004; (yetişkin fare testisinde Sertoli/germ hücre oranını yaklaşık 1:30–1:50'de (Weber ve ark, 1983; Wong ve Russell, 1983) korumaktadır (Lui ve ark,2003; Loveland ve ark, 2007; O'Bryan ve Hedger, 2008). Aynı zamanda apikal ES ve KTB'de bağlantının yeniden yapılanmasını indüklemelerini göstermektedir (Lui ve ark, 2007; Li ve ark, 2008; Li ve ark, 2009). Esas olarak, bu çalışmalar sitokinlerin apikal ES'de N-cadherin ve BTB'de occludin gibi anahtar integral membran proteinlerinin kararlı durum düzeylerini azaltarak adezyonu bozabilmelerini göstermektedir (Xia ve ark, 2005). Bu gözleme ek olarak Sertoli hücrelerinin sitokinler ile muamelesi sonrasında integral membran KTB proteinlerinin ifade düşüşü, Protein endositozunda (Yan ve ark, 2008; Xia ve ark, 2009) ve endozom-aracılı hücre parçalanmasında (Yan ve ark, 2008) bir artış ile kısmen meydana geldiği birbirini takip eden iki raporda gösterilmiştir. İlginç olarak spermatidlerde rezidüel cisimciklerin Sertoli hücreleriyle spermiasyon öncesinde fagositozu, Sertoli hücrelerin in vitro ortamda IL-1α salgılanmasını indüklemektedir. Bu bulgular, sitokin üretiminin tübüllerin VIII

aşamasında en yüksek olduğundan in vivo gözlemler ile tutarlıdır (Syed ve ark, 1995). Yetişkin farelere intratestiküler şekilde uygulanan IL-1α, epitelden spermatid ayrılmasını indüklemektedir ki bu da spermiasyon ve BTB yeniden yapılanmayi taklit eden bariyerin bozulmasını taklit etmektedir (Sarkar ve ark, 2008). Topluca, bu bulgular spermiasyon öncesi rezidüel cisimciklerin fagositozu sonrasında, Sertoli hücreleri tarafından IL-1α üretimiyle, spermiasyon ve BTB yeniden yapılanmasını epitel döngünün VIII safhasında koordine edilebilmelerini desteklemektedir. Diğer taraftan, testosteron, BTB bütünlüğünü ve bağlantı komplekslerinin birleşmesini desteklemektedir (Wang ve ark, 2009; Meng ve ark, 2005; Wang ve ark, 2006). In vitro çalışmalar da, testosteron tarafından Sertoli hücresi sıkı bağlantı bariyer fonksiyonunun birleşmesi ve bakımı için gerekli olan sıkı bağlantı proteinlerin üretiminin kolaylaştırılmasını göstermiştir (Siu ve ark, 2009; Chung ve Cheng, 2001; Janecki ve ark, 1992). Ayrıca kemirgenler ve insanlarda yüksek düzeyde olan intratestiküler testosteronun testiste sistemik dolaşımdan yaklaşık 50 ila 100 kat daha fazla olması, apikal ES bütünlüğü için kritiktir (Beardsley ve ark, 2006; Zhang ve ark, 2005; Wong ve ark, 2005; Xia ve ark, 2005). Ayrıca, sitokinler ve testosteronun seminifer epitelinde hücre bağlantı bütünlüğü üzerinde karşıt etkilere yol açtığı sonucuna varılmıştır. Testosteronun ve TGF-β2 gibi sitokinlerin protein endositozu ve geri dönüşüm üzerinde etkisini inceleyen son birkaç yıldaki yapılan çalışmalar çok önemli katkılar sağlamıştır Örneğin, her iki sitokin ve testosteron, Sertoli hücrelerinde, *in vitro* ortamında, BTB integral membran proteinlerinin endositoz kinetiklerini arttırabilmektedirler (Xia ve ark, 2009; Yan ve ark 2009). Ancak sadece testoteron endositoz edilmiş proteinlerin Sertoli hücre yüzeyine geri dönüşümünü indüklemektedir (Yan ve ark 2009). Bu nedenle sıkı bağlantı bariyer fonksiyonunu desteklemektedir. Buna rağmen sitokin aracılı endositozu indüklenmiş proteinler intrasellüler degredasyon için tahsis edilmiştir. Bu bulgular epitel döngüsünün VIII safhasında ve preleptoten spermatositlerin BTB arasından geçişi sırasında, immüonolojik bariyer fonkiyonunun nasıl korunabildiğini açıklamaktadır. Testosteron aynı zamanda yeni protein sentezi yaparak spermatositlerin lümene doğru taşınmasında yeni sıkı bağlantı fibrillerinin oluşmasını da kolaylaştırmaktadır. Testosteron yeni sıkı bağlantı proteinlerinin de novo sentezi aynı zamanda içsel sıkı

bağlantı proteinlerinin spermatositlerin lümene yakın bölgesinden altlarına doğru transsitozuyla, "yeni" sıkı bağlantı fibrillerinin montajını kolaylaştırmaktadır.

Testosteron, primer spermatositler lümene doğru ilerledikçe geride kalan alanlarda, yeni sıkı bağlantı proteinlerinin sentezini uyararak'yeni'sıkı bağlayıcı fibrillerin oluşmasına yardımcı olur.

Aynı zamanda Sertoli ve germ hücreleri tarafından sentezlenen sitokinler göç etmekte olan spermatositlerin yukarısında yer alan'eski'sıkı bağlantı fibrillerinin sökülmesini tetiklemektedir. Bu da germ hücrelerinin bariyerden geçmesini sağlayabilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, tüm sitokinlerin bağlantının sökülmesine neden olmaları bilinmesine rağmen kesinlikle ek fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Topluca bu bulgular, polarite proteinleri, testosteron ve sitokinlerin, spermatogenez sırasında apikal ES ve BTB'de bağlantının yeniden yapılanmasını koordine ettiklerini göstermektedir. İlginç olarak, mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) fareye uygulandığında Sertoli hücre hasarına ve bunun sonucunda apikal ES bozulmasına yol açmıştır. Apikal ES bozulması, uzamakta olan spermatidlerin epitelyumdan olgunlaşmadan önce dökülmesiyle sonuçlanmıştır (Yao ve ark, 2010). Bu fenotipik değişikliklerin matriks metalloproteinaz 2, (Yao ve ark, 2010) ve TNF (Yao ve ark, 2009) düzeyinde bir artış, aynı zamanda apikal ES proteinlerinin (laminin γ3 and β1-integrin) ve BTB proteinlerinin (occludin and ZO-1) önemli kaybı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Yao ve ark, 2009). Ayrıca matriks metalloproteinaz 2'nin TNF aracılı BTB yeniden yapılanması indüklemesinde kritik role sahip olduğu düşünülmektedir (Yao ve ark, 2009). Bu da eksende, matriks metalloproteinaz 2 ve sitokinler arasında bir fizyolojik ilişkiyi göstermektedir. TNF, Sertoli hücrelerinde matriks metalloproteinaz 9'un üretimini uyarmaktadır ki bu da BTB'de Sertoli hücre sıkı bağlantı proteinlerini bozmak amacıyla kolajen zincirlerini bölmektedir (Siu ve ark, 2003). Bu bulgular, sitokinlerin biylojik olarak aktif kolajen üreten proteazlar vasıtasıyla bazal membrandaki değişiklikleri düzenlediklerini göstermektedir. Bu da BTB ve bazal membran arasında bir fonksiyonel eksenin var olduğunu desteklemektedir (Cheng ve Mruk, 2010).

Çizelge 1.1. Sitokinler ve fonksiyonları testiste (Xiave ark, 2005)

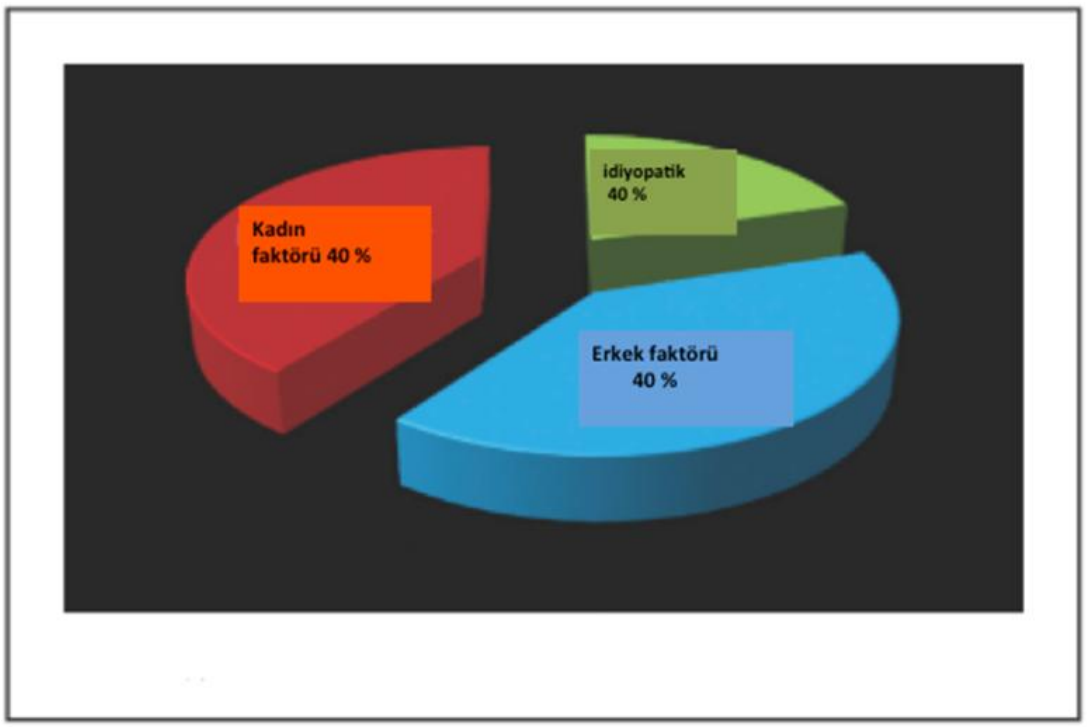
GRUP	SİTOKİN	KO FARE	SELÜLER EKSPRESYON	TESTİSTEKİ FONKSİYONU	REFERANSLAR
TGF-β	TGF-β1	Perinetal/neonatal lethal	Sertoli, Leydig, germ, myoid hücreleri	Testiküler gelişim	[109,112,119,123]
	TGF-β2	Perinetal lethal	Sertoli, Leydig ve germ hücreleri	Testiküler gelişim	
	TGF-β3	Perinetal lethal	Sertoli ve germ hücreleri	Bağlantı dinamikleri	
	Aktivin/inhibin βA	Perinetal lethal	Sertoli ve peritübüler hücreler	FSH üretimi regülasyonu, Testiküler gelişim	[109,228]
	Aktivin/inhibin βB	Canlı /reprodüktif Anomalite (dişi)	Sertoli ve germ hücreleri		
	BMP-4	Embriyonik lethal (-/-)/ Düşük doğurtkanlık (+/-)	Pakiten spermatosit Sertoli hücreleri (erken postnatal)	Spermatogenez devamlılığı; spermagonia diferansiyasyonu	[109,229-231]
TNF	TNFα	Canlı /fertil	Sertoli ve germ hücreleri	Steroidogenezin baskılanması, TJ bozulması, GC apoptozu inhibisyonu	[57,106-108,218,232]
	FasL	Canlı	Spermatositler/spermatitler; Sertoli Hücreleri (?)	Apoptoz indüklenmesi, immün-bağışıklığın korunması	[233-235]
	TRAIL	Canlı /fertil	Germ ve Leydig hücreleri	GC apoptoz	[236,237]
Büyüme Faktörleri	EGF	Canlı /fertil	Sertoli ve Germ hücreleri	Spermatogenez devamlılığı; Steroidogenez stimülasyonu	[238-240]
	FGF4	Embriyonik lethal	Sertoli hücreleri	Spermatogenezin artması	[241-243]
	HGF	Embriyonik lethal	Spermatozoa, myoid hücreleri	Sperm motilitesinin başlaması, testiküler kord oluşumunun indüklenmesi	[244-246]
	MIF	Canlı /fertil	Leydig hücreleri	Sertoli- Leydig hücre parakrin mediatör/inhibin üretiminin baskılanması	[247,248]
	SCF	Perinetal lethal (-/-), steril (+/-)	Sertoli hücreleri (diferansiye spetmatogonia'da c-Kit reseptörü)	Spermatogenez; sertoli hücre-spermatogonia adezyonu (membran bağlı form)	[11,249,250]
	VEGF (A)	Embriyonik lethal (+/-)	Sertoli hücreleri (germ hücreleri üzerinde reseptör) Leydig hücreleri	Spermatogonial proliferasyon, spermiyogenez	[251-253]
İnterlökin/ interferon	IL-1α/-1β	Canlı/ Düşük doğurtkanlık	Sertoli hücreleri, spermatositler, spermatitler	Steroidogenezin baskılanması, sertoli hücre sekresyonunun düzenlemesi	[254,255]
	IFN-γ	Canlı /fertil	Spermatogonia, interstitium	Steroidogenezin baskılanması, FasL ekspresyonunun uyarılması	[256,257]

1.4. İnfertilite

İnfertilite, bir yıl boyunca korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebe kalınamaması olarak tanımlanmaktadır (Poongothai ve ark, 2009, Hamada ve ark., 2011). Dünya çapında reprodüktif yaşta olan çiftlerin yaklaşık %13-18'i ırk ve etnik grubu dikkate almaksızın infertiliteden etkilenmektedir (Jones ve Toner, 1993). İnfertilite her ne kadar hayatı tehdit eden bir durum olmasa da sosyal damgalanma (stigma) ile ilişkili yoğun toplumsal baskı ve ebeveyn baskısıyla sonuçlanan travmatik bir durumdur (Abid ve ark, 2008).

1.4.1. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, gebeliğin hiç oluşmadığı durumda primer ve daha önce gebelik oluşmuş fakat sonra istendiği halde tekrar gebelik oluşamıyorsa sekonder olarak tanımlanmaktadır. Hastaların %67-71'inde primer infertilite ve %29-33'ünde sekonder infertilite görünmektedir (Irvine, 1998). İnfertilitede erkek faktörü, olguların yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır Bu %50'lik erkek faktörü infertilite grubu ise genellikle %30 erkek kaynaklı nedenlerle, %20 hem kadın hem erkek kaynaklı nedenlerle olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 1.10) (Zenzes, 2000; Hamada ve ark, 2011).



Şekil 1.10. İnfertilite dağılımı (Mahanta ve ark, 2011)

1.4.1.1. İnsidans ve Erkek İnfertilite Prevalansi

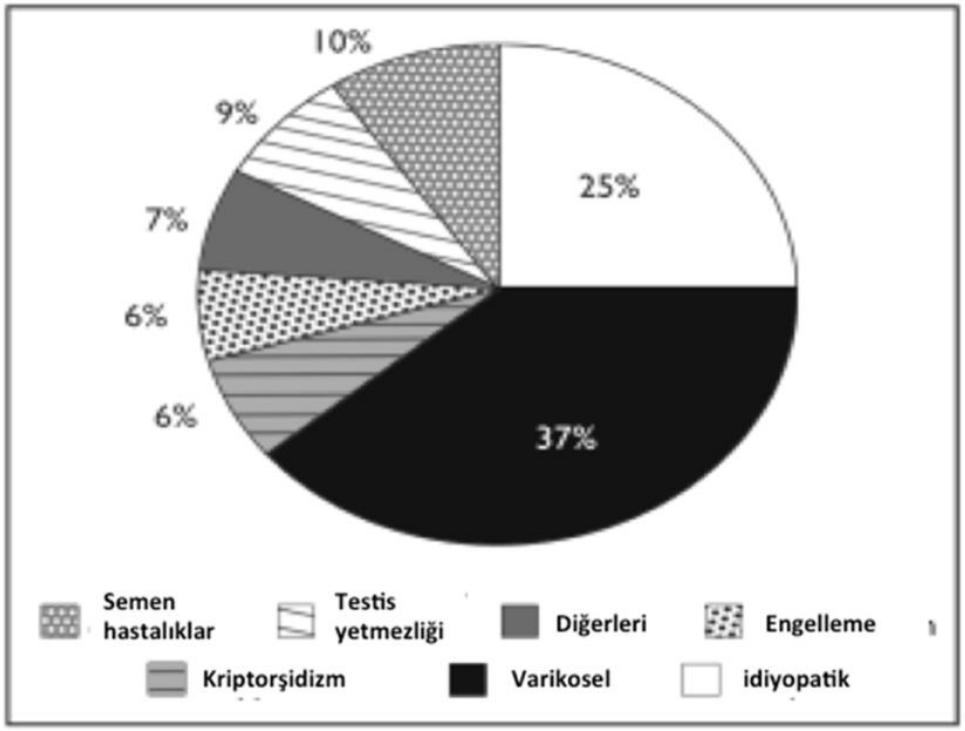
Kısırlığın sıklığı açıkça kullanılan tanıma bağlı olmaktadır. Yaygın klinik uygulama ve pek çok çalışmada infertilite, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınamaması olarak tanımlanmasına rağmen, bazı araştırmacılar 'normal' popülasyonda gözlemlenen doğurganlık dağılımına dayanarak infertiliteyi korunmasız cinsel ilişkiye rağmen iki yıl boyunca gebe kalınamaması durumu olarak tanımlamışlardır (Anonymous, 1996a). Çalışmaların çoğunda Infertilite prevalansı ya klinik tabanlıdır ya da nüfus örneklerine dayanmaktadır. Klinik tabanlı çalışmalara sadece medikal yardım alan erkekler dahil olduğu için subfertilitenin yaygınlığı göz ardı edilmektedir. Benzer bir şekilde infertilite sayılabilmesi için daha uzun zaman (2 yıl) tanımlayan çalışmalarda prevalans oranının düşük olması beklenmektedir (Templeton ve ark, 1990). Son yayımlanan çalışmalarda, İnfertilite prevalansı olarak genelde tüm evli çiftlerin %14'ü kabul edilir. Klinik tabanlı çalışmalarda çiftlerin çoğu primer infertilite göstermesine rağmen, populasyon tabanlı çalışmalarda sekonder infertil erkeklerin eşit ya da daha fazla oldukları gösterilmiştir (Hirsch ve

Mosher, 1987). Bu durum, iki grup arasında sağlık hizmetleri alımındaki farklılıkları yansıtmaktadır (Irvine, 1998).

Ayrıca infertil çiftlerin arasında, erkek infertilite yaygınlığının coğrafi varyasyona bağlı olduğu gösterilmiştir. Fransa'da yüksek bir ortalamada, yaklaşık %59; İngiltere'de ve Hindistan'ın Keşmir Vadisi'nde %26-32; Güney Afrika, Endonezya ve Finlandiya'da %36 oranında görülmektedir (Thonneauve ark, 1991). Böylece, sunulan mevcut raporlar etnik, iklim, mesleki farklılıklar gibi etkenlerin ortalama sperm konsantrasyonunu, sayısını, kalitesini ve dolayısıyla erkek infertilitesini etkilediğini göstermektedir. Ancak, gelişmemiş ülkelerde infertilite sıklığının daha yüksek oranlarda seyretmesi ülkeler arasında önemli bir fark olarak tespit edilmiştir. Ülkeler arası oluşan fark tanı ve tedavi için ayrılan kaynaklarda eşitsizliğe bağlı olabilmektedir (Hamada ve ark, 2011). Bu sonuçlara göre dünyada her yıl 60-80 milyon çift, 15-20 milyonu sadece Hindistan'da olmak üzere, kısırlıktan şikayetçi olmaktadırlar. Üreme sağlığını ilgilendiren bu durum önemli ulusal bir sorundur. Özellikle birçok vakada olduğu gibi infertilite önlenebilir durumda ise, bu problemin çözümü için zaman kaybetmeksizin harekete geçilmelidir (Poongothai ve ark, 2009).

1.4.1.2. Erkek İnfertilitesi Etyolojisi

Erkek infertilitesi, hastalıkların majör bir bölümünü kapsayan çok faktörlü bir sendromdur. Erkek faktörü infertilite olgularının yaklaşık %37-58'inda bir neden bulunamamaktadır ve bu olgular idiyopatik olarak adlandırılır (Poongothai ve ark, 2009). Bu kategori erkek üreme fonksiyonunda kendiliğinden oluşan bir bozukluktan kaynaklanan "nedeni bilinmeyen erkek infertilitesi" olarak tanımlanmaktadır (Hamada ve ark, 2011) ve konjenital veya edinsel olabilmektedir. Kısırlığın %10 kadar olan bölümü tıbbi olarak açıklanamamaktadır. Erkek kısırlığının bilinen nedenleri oldukça fazladır ama bir dizi ana gruba ayrılabilir. Erkek infertilite bozuklukları genetik ve genetik olmayan nedenler ile ilişkili olabilmektedir (Şekil 1.11) (Poongothai ve ark, 2009).



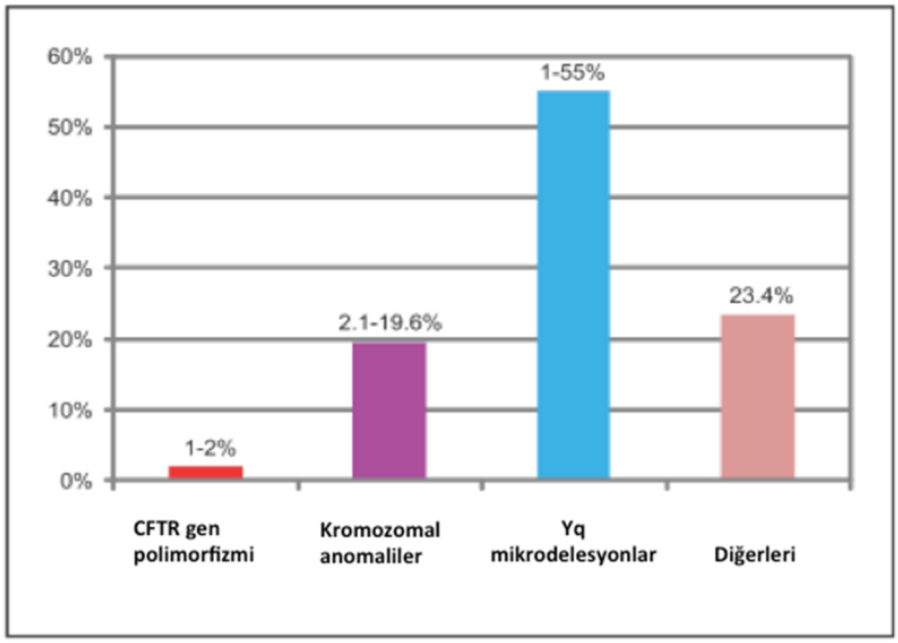
Şekil 1.11. Erkek infertilitesi bozukluklarının dağılımı (Poongothai ve ark, 2009)

İnfertil erkeklerin sperm analizleri, azoospermi, oligozoospermi, teratozoospermi, astenozoospermi, nekrospermi ve pyospermi gibi birçok anormal durumda ortaya çıkabilmektedir. İnfertilite kliniğinden yardım isteyen erkeklerin yaklaşık %30'unda, oligozoospermi veya etiyolojisi bilinmeyen azoosperminin olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle erkek infertilite nedenlerini belirlemek hastalığın tedavisi açısından önemli bir ihtiyaçtır (Poongothai ve ark, 2009).

1.4.1.2.1. Erkek Faktörü İnfertilitede Genetik Nedenler

Moleküler tekniklerin gelişmesi infertilite genetiğinde büyük ilerleme sağlamıştır. Ancak, erkek kısırlığının genetik nedenlerinin belirlenmesi halen sınırlı kalmaktadır. Genetik anomaliler, açıklanamayan oligozoospermi ve azoospermi olan erkeklerde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri olarak tespit edilmiştir. Kromozomal bozukluklar, Y kromozom mikrodelesyonları, mitokondriyal DNA (mtDNA)

mutasyonları, tek gen hastalıkları, multifaktöriyel hastalıklar ve genetik kökenli endokrin bozukluklar gibi genetik faktörler şiddetli erkek infertilitesinin ~%10-15'ini etkilemektedir (Şekil 1.12) (Poongothai ve ark, 2009).



Şekil 1.12. Erkek faktörü infertilitesinin genetik nedenleri (shamsi ve ark, 2011).

1.4.1.2.1.1. Kromozom Bozuklukları

İnsanlarda erkek infertilitesi genellikle kromozom anomalileri ile ilgilidir. Klinefelter sendromu (XXY) ve özgül translokasyonlar erkek infertilitesi nedenleri arasında yer almaktadır (McLachlan ve ark, 1998). Androjen reseptörü nokta mutasyonları ve CFTR (cystc fibrozis transmembrane conductance regülatör) geni mutasyonları yaygın olarak konjenital vaz deferens anomalileri ve spermatogenik bozukluklar ile ilişkili olan iki önemli gen defektidir (Dohle ve ark, 1999). İnfertil erkeklerde en sık karşılaşılan durumlar ise sperm kromozomu anomalisi, mayoz mutasyonları veya testiküler mikroçevreden kaynaklanan bir diploididir (Poongothai ve ark, 2009).

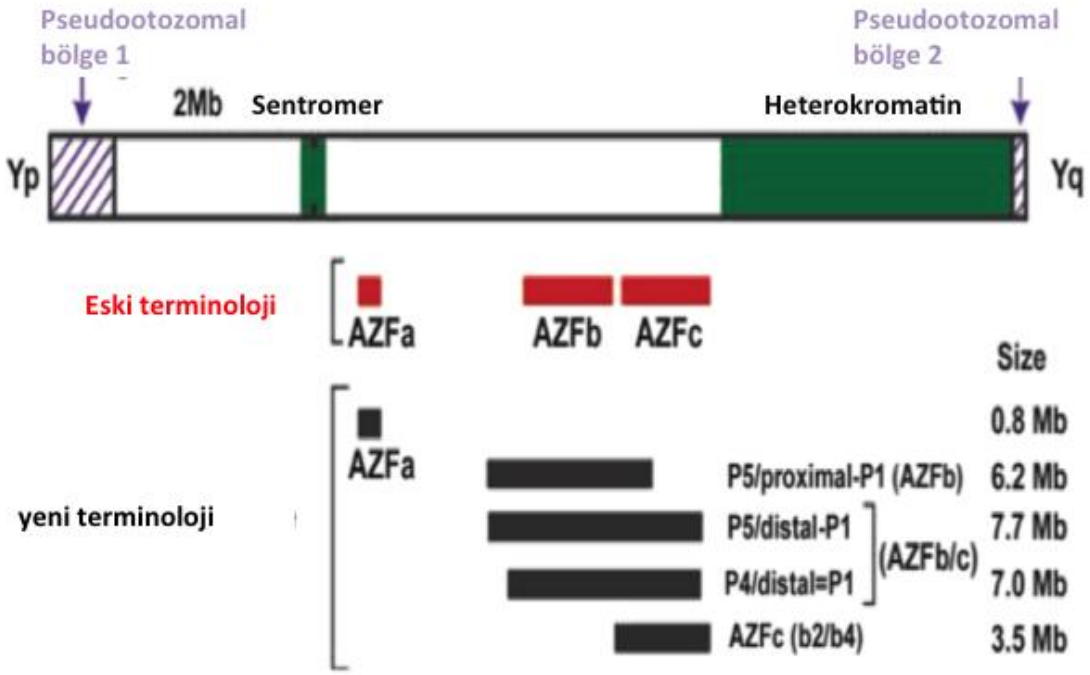
1.4.1.2.1.2. Y Kromozomunun Mikrodelesyonu (Y-Kromozom İnfertilitesi)

Erkek infertilitesi ile ilişkili en önemli patogenetik kusurlarından biri Y kromozomu (Yq) uzun kolunun mikrodelesyonlarıdır. Y-kromozomu infertilitesi olan erkeklerde hiçbir belirti yoktur, ancak fiziksel muayenede küçük testisler ve/veya kriptorşidizm ve varikosel ortaya çıkabilmektedir (Esteves ve Agarwal, 2011) Azoospermik erkeklerin %13'ü, şiddetli oligozoospermi erkeklerin %1 ila %7'si, şiddetli primer testis yetmezliği ve 5 milyon/ml'den daha az sperm yoğunluğu olan erkeklerin %5'i Y kromozomu mikrodelesyonu taşımaktadır (McLachlan ve ark, 1998). Yq11'de "Azoospermi Faktörü (AZF)" lokusunu da içeren ve delete olan bölge yer almaktadır. Bu bölge AZFa, AZFb AZFc ve AZFd olarak adlandırılan dört tane birbiri ile örtüşmeyen alt bölgeye ayrılmaktadır (Vogt ve ark, 1996; Poongothai ve ark, 2009; Uluğ ve ark, 2006).

Bireysel mikrodelesyonların nispi frekansı AZFc, AZFa ve AZFb bölgeleri için sırayla %60, %5 ve %16'dır. Ancak kombine delesyonlar, vakaların yaklaşık %15'inde meydana gelmektedir (Shefi ve Turek, 2006). Delesyonlar büyük palindromik tekrarlar arasında meydana gelme eğiliminde oldukları için, Repping ve arkadaşları tekrarlayan delesyonlar için yan tekrarların adını kullanarak daha uygun bir isimlendirme önermişlerdir (Şekil 1.13) (Repping ve ark, 2002; Esteves ve Agarwal, 2011). Bu bölgelerin her biri özel bir testiküler histoloji ile ilişkili olabilir ve infertiliteyle ilişkili olabilecek pek çok aday gen bu bölgeler içinde bulunmaktadır. "Deleted in Azoospermia (DAZ)" gen ailesi, delesyonu en sık görülen AZF aday geni olarak tanımlanmış olup AZFc bölgesinde lokalize olmaktadır.

Yq de novo delesyonları erkeklerde en sık meydana gelen kromozomal anormalilerden birisidir. Mayoz veya erken pre-implantasyon gelişimi sırasında, yüksek sıklıkta tekrarlayan DNA dizilerinin arasındaki rekombinasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Edwards ve Bishop,1997; Poongothai ve ark, 2009).

Spermatogenik başarısızlığın değişik derecelerini taşıyan infertil erkekler üzerinde son zamanlarda yapılan çalışmalarda, "gr/gr" delesyonu ve Y kromozom 1.6-Mb delesyonu spesifik olarak henüz tanımlanmıştır. Y-kromozomu infertilitesi Y-bağlantılı bir şekilde kalıtılmaktadır (Nathanson ve ark, 2005). Delesyonlar genellikle de novodur ve bu nedenle probandın babasında mevcut değildir. Nadiren, bir aile içinde Y kromozomunun aynı delesyonu bazı erkeklerde (diğerlerinde değil) de kısırlığa neden olabilmektedir. Bu nedenle AZF bölgesinde delesyonu olan bazı infertil erkeklerin infertil oğulları olabilmektedir (Saut ve ark, 2000). AZF bölgelerinin delesyonu nedeniyle infertil olan erkeklerin örneklerinden, intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yöntemi kullanılarak gerçekleşen gebeliklerde erkek çocukların da babalarıyla benzer delesyon taşıdıkları gösterilmiştir (Esteves ve Agarwal, 2011).



Şekil 1.13. Y kromozomunun fertilite ve infertilite ile ilişkili olan bölgeleri (Esteves ve Agarwal, 2011)

1.4.1.2.1.3. Mitokondri DNA mutasyonları

Sperm hareketliliği üzerinde önemli bir etkiye sahip olan ve solunum zincirinin birçok temel bileşenlerini üretebilen mitokondri kendi genomunu (çekirdek dışı genom) taşımaktadır. Sperm üretiminin kalitesi ve miktarı hem çevresel, hem de genetik faktörler tarafından büyük ölçüde etkilenebilmektedir. Sperm mitokondrisi, spermatozoa evresinde bu hücrelerin yüksek adenozin trifosfat (ATP) talep etmeleri nedeniyle önemli bir rol oynamaktadır (Díez-Sánchez ve ark, 2003). Spermin çıplak mitokondriyal DNA'sı (mtDNA) üzerine reaktif oksijen türleri ya da serbest radikaller tarafından yapılan rastgele saldırılar kaçınılmaz olarak patolojik sonuçlara yol açmaktadır. Bu durum mitokondriyal genomunun oksidatif hasarına veya mutasyonuna neden olabilmektedir ve erkeklerde kısırlığa yol açabilmektedir. MtDNA zincirinin uzama ve onarımında yer alan anahtar çekirdek enzimi: DNA polimeraz gammadır (15q25). Bu enzimin mutasyonu, adenozin trifosfat üretimini etkilemektedir (Poongothai ve ark, 2009).

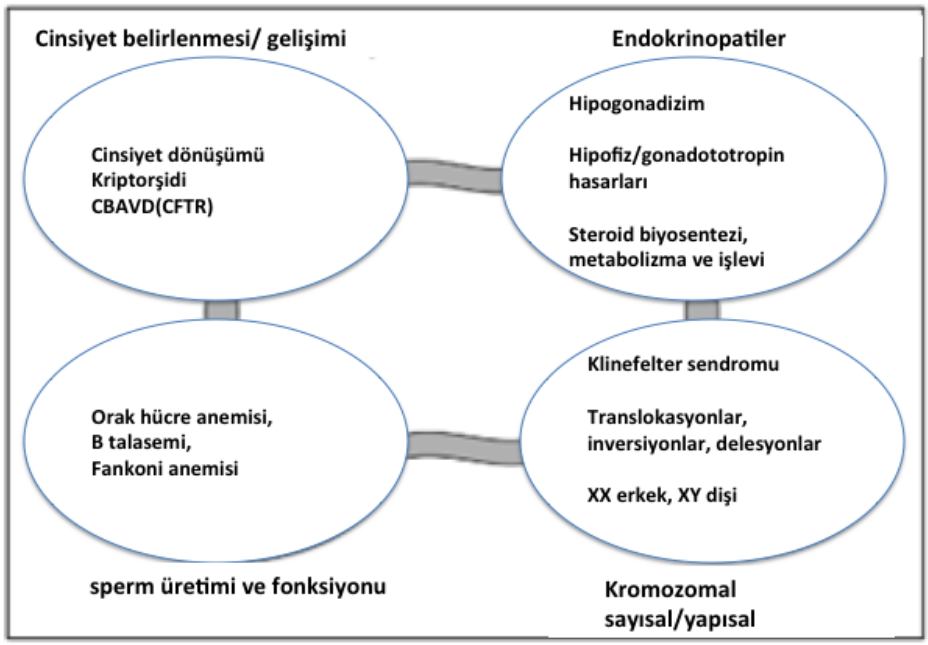
1.4.1.2.1.4. Monogenik Bozukluklar

Monogenik genetik bozukluklar, defekt taşıyan tek bir genin doğrudan mutasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bu bozukluklar Mendel kanunlarına göre basit bir model ile aktarılmaktadırlar. Erkek infertilitesi ile ilişkili birincil genetik defekt olarak tanımlanan 50'nin üzerinde monogenik bozukluk vardır. Kromozom 3'ün kısa kolunda (3p24) bulunan ve DAZ geninin otozomal homoloğu olan DAZL (DAZ-Like) geninde gerçekleşen bir otozomal anomalinin spermatogenik kusurdan sorumlu olabilmesi mümkün olabilmektedir. Y kromozomunun uzun kolundaki AZF lokusunun genetik bozukluğu ise işaretli bölge sekanslarını saptayan tekniklerin gelişmesi ile ortaya konmuştur (Poongothai ve ark, 2009).

1.4.1.2.1.5. Multifaktöriyel Bozukluklar

Multifaktöriyel bozukluklar, genellikle çevresel nedenlerin eşlik ettiği birçok gendeki mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir (Şekil 1.14). Örneğin, metilentetra-hidrofolat

redüktaz (MTHFR) geninde meydana gelen mutasyonun (C677t), farklı multifaktöriyel bozukluklara yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir (Singh ve ark, 2005).



Şekil 1.14. Erkek faktörü infertilite etyolojisi (Poongothai ve ark, 2009).

1.4.1.2.2. Erkek Faktörü İnfertilitesinin Genetik Olmayan Nedenleri

Genital enfeksiyonlar, erkek genital sistemindeki yapısal anomaliler, varikosel, doğuştan tek ya da çift taraflı vaz deferens yokluğu (CAUVD/CABVD), kronik hastalıklar, hipogonadotropik hipogonadizm, önceden gerçekleşen skrotal veya kasık bölgesi ameliyatları, ilaç tedavileri, kimyasallara maruz kalma, hayat stili ve çevre gibi genetik olmayan faktörler erkeklerde infertiliteye neden olarak gösterilebilir (Egozcue ve ark, 2000).

1.4.1.2.2.1. Biyokimyasal Faktörler / Hormonlar

Spermatogenez süreci hormonal olarak da düzenlenmektedir ve erkek infertilitesini etkileyebilen sorunlar şunlarla ilişkilidir: (i) hipotalamus salgılarını ya da

fonksiyonunu etkileyen bozukluklar; (ii) hipofiz gelişim bozuklukları; (iii) Hipofizin LH ve FSH salgılanmasının ve fonksiyonununun primer bozuklukları. LH ve FSH testis ve yumurtalıklar için trofik hormonlar olduğu için bu gonadotropinlerin azaltılmış salgıları (hypogonadotrophism) cinsel organlarda bozuklukla (hipogonadizm) sonuçlanmaktadır (Huynh ve ark, 2002). Luteinleştirici hormonun (LH) ve folikül uyarıcı hormonun yüksek konsantrasyonu yanında, gonadal steroidlerin düşük konsantrasyonları kısırlığın bir nedeni olan gonadal yetersizlikiğe neden olmaktadır. Erkekte, LH'ın yüksek konsantrasyonları, hipergonadotropik hipogonadizm'den (HH) kaynaklanabilmektedir. HH birincil testis yetmezliği, seminifer tübül disgenezisi (Klinefelter sendromu), Sertoli hücre yetmezliği ve Anorşi gibi çeşitli nedenlere bağlı olabilmektedir (Poongothai ve ark, 2009).

Çoğu zaman, bozulmuş erkek üremesi testis yaralanması nedeniyle germ hücreleri, destek somatik (Sertoli) veya steroidojenik (Leydig) hücrelerinin direkt yaralanmasından kaynaklanmaktadır. Leptin (bir büyüme hormonu) ve insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) de dahil olmak üzere pek çok diğer hormon, spermatogenezde bir rol oynayabilmektedir (Steinman ve ark, 2001).

1.4.1.2.2.2. Varikosel

Spermatik kord pampiniform pleksus'un belirgin bir şekilde şişmiş damarlanmasının bir sonucu olan varikosel, erkek subfertilitesinin en yaygın sebebi olarak tanımlanabilmektedir. İnfertilite kliniklerine başvuran erkeklerin büyük bir grubunda yapılan fertilite parametrelerinde varikoselin etkili olduğu görülmüştür (World Health Organization, 1992). Varikosel, skrotum içinde solucanlarla dolu bir çanta gibi hissedilir ve infertilite ile ilişkili olabilmektedir (Richens, 2004) "Subklinik varikosel" fiziki muayene ile tespit edilemeyecek kadar küçük bir lezyonu ifade etmektedir (Poongothai ve ark, 2009).

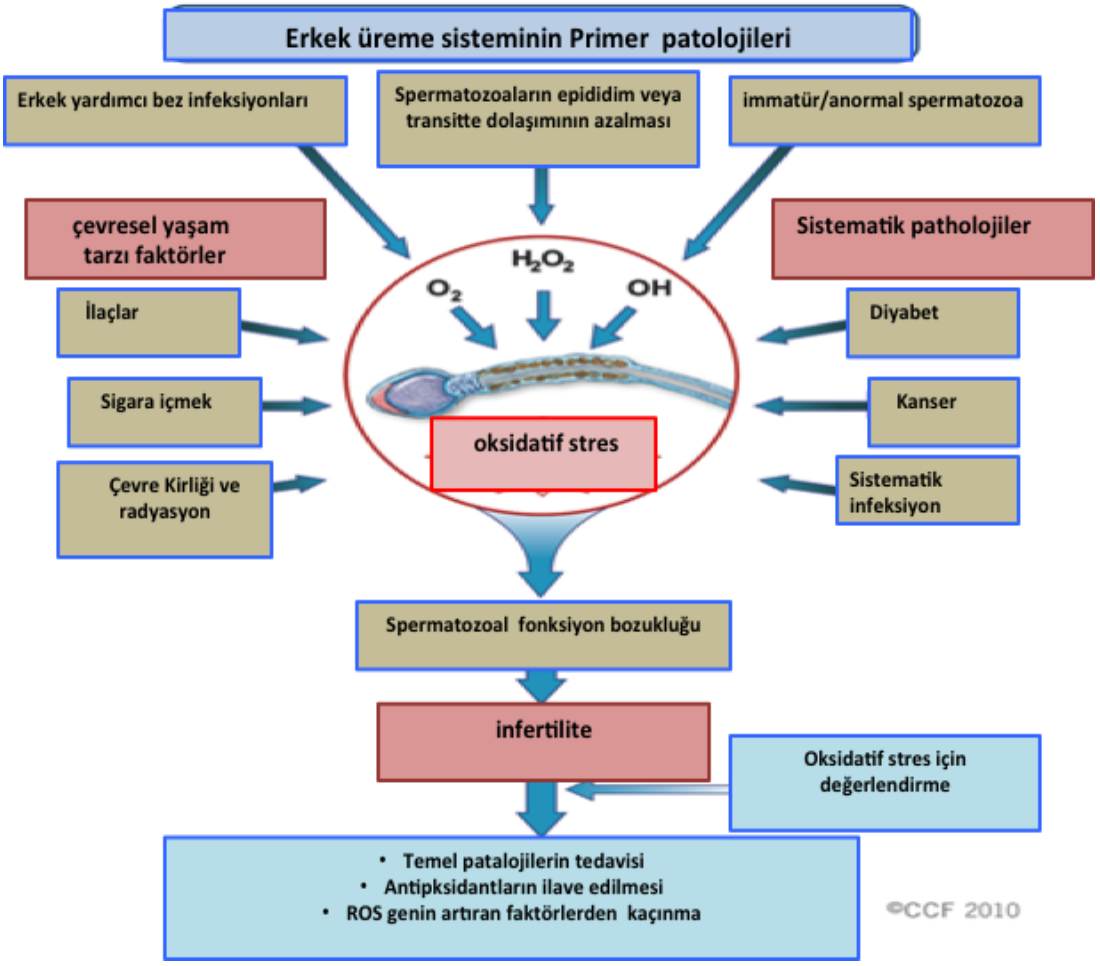
1.4.1.2.2.3. Hayat Stili Etkisi

Gamet ve embriyo gelişimini etkileyebilecek egzersiz eksikliği, sigara, alkol tüketimi, madde kullanımı, hava kirliliği, pestisitler, ağır metal maruziyeti ve kötü beslenme gibi yaşam tarzı ve çevresel faktörler sperm kalitesini etkileyerek kısırlığa yol açmaktadırlar (Sharpe, 2000). Oksidatif stres nedeniyle değişmiş bir ortamın spermatogenik sürecinin yanı sıra sperm kalitesini ve miktarını etkilediğini göstermiştir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olan birçok faktörün oksidatif stresi arttırdığı rapor edilmiştir. Obezite, oksidatif stres, adipoz dokunun pro-inflamatuar sitokinleri serbest bırakması gibi etkiler ROS üretimini arttırmaktadır (Singer ve Granger, 2007). Buna ek olarak adipoz dokunun kasık bölgesinde birikmesi testisin ısınmasına neden olup oksidatif strese ve azalmış sperm kalitesine yol açmaktadır (Pérez-Crespo ve ark, 2007). Kas dokusu, aerobik metabolizması gereği insanlarda ve kemirgenlerde ROS'un büyük ölçüde oluşmasına yol açtığı için aşırı egzersiz aktivitesi oksidatif stres ile ilişkili olmaktadır (Manna ve ark, 2004). Yapılan çalışmalarda sigara kullanımının bozulmuş sperm hareketliliği, döllenme kapasitesi ve sperm membran oksidasyonu ile ilişkili olduğunu infertil erkeklerde gösterilmiştir (Saleh ve ark, 2002). Etanol, ROS üretimini uyarır ve benzer şekilde, aşırı alkol tüketimi, sistemik oksidatif streste bir artışa neden olabilmektedir (Maneesh ve ark, 2006). Ancak, bugüne kadar hiçbir çalışmada, alkol alımı ve sperm oksidatif hasarı arasındaki korelasyon doğrudan gösterilememiştir.

1.4.1.2.2.4. Oksidatif Stres ve İnfertilite

Oksidatif stres (OS) tarafından ROS indüklenmektedir (Kefer ve ark, 2009) ROS'un normal düzeyde olması sperm fizyolojisi için gereklidir; fakat ROS'un aşırı düzeyde olması sperm kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir (Şekil 1.15). Sperm hasarını indükleyen OS'un, erkek infertilitesinin %30–80'inde önemli bir faktör olarak hastalığa katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (Auger ve ark,2001). ROS üretimi çevresel faktörler, bulaşıcı hastalıklar ve yaşam tarzı gibi nedenlerden şiddetli olabilmektedir (Gonzalez-Flecha 2004). OS, direkt ve indirekt deneylerle

ölçülebilmektedir. En çok kullanılan direkt deney, sperm hücre zarının lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit'i ölçmektedir. Sperm DNA hasarı miktarının belirlenmesinde, hücre içi ROS kaynaklı oksidan kullanılarak hasarın doğrudan ölçülmesi bir test olarak kullanılmaktadır (Agarwal ve ark, 2008). Seminal ROS ölçümü için en yaygın dolaylı yöntem kemiluminesanstır. Sperm redoks aktivitelerinin luminol veya lusigen probları kullanılarak ROS seviyesi ölçüm sonuçlarının fertil ve infertil popülasyonlar için saptanmış referans değerleri kullanılabilir (Agarwal ve ark, 2008). Son raporlar, erkek infertilitesinde OS tedavi yönetimine odaklanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fertilite modülatörleri olarak antioksidanlar ve B vitaminlerin etkisine olan ilgi artmaktadır (Esteves ve Agarwal, 2011). Alfa-tokoferol (Vitamin A), askorbik asit (C vitamini) ve retinoidler (Vitamin A) gibi antioksidanlar güçlü ROS tutuculardır. Vitamin B konsantrasyonları, yüksek homosistein konsantrasyonlarına neden olmaktadır ve fosfolipidler, proteinler, DNA ve RNA'nın metilasyon döngüsünü bozabilmektedir. Bu süreç spermatogenezde gereklidir. Wong ve arkadaşları, folik asit (5 mg) ve çinko fosfat'ın (66 mg), subfertil erkeklerin toplam normal sperm sayısında %74 artışa neden olduğunu göstermişlerdir (Wong ve ark, 2002). Boxmeer ve arkadaşları, seminal plazma içindeki düşük folat konsantrasyonunun, fertil erkeklerde daha fazla sperm DNA hasarı ile bağlantılı olduğunu ilk kez rapor etmişlerdir (Boxmeer ve ark, 2009). Folat eksikliğinde urasil yerine timin yanlış katılması nedeniyle DNA kırılganlığı artmaktadır (Boxmeer ve ark, 2009). Araştırmacılar ayrıca vitamin E ve C takviyesiyle, klinik gebelik ICSI sonrası implantasyon oranının anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. (Greco ve ark, 2005; Esteves ve Agarwal, 2011).



Şekil 1.15. Erkek faktörü infertilite olgularında etyopatogenez ilişkisi (Esteves ve Agarwal, 2011).

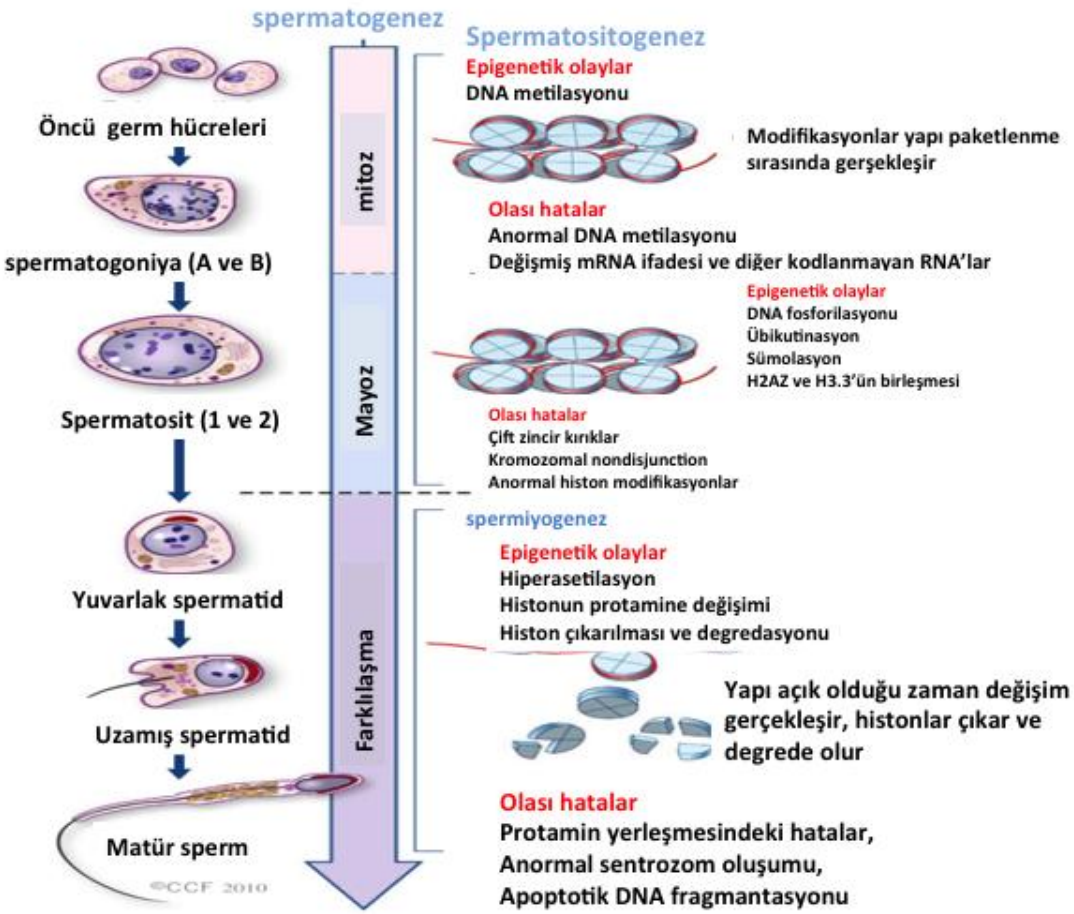
Lökositospermiye neden olan Post-testiküler genital sistem enfeksiyonu ve inflamasyonu (örneğin, epididim, testis veya prostat bezinin kombine iltihabı prostatit gibi), artan ROS düzeylerine yol açarak sperm DNA hasarı ile ilişkilendirilmektedir (Schaeffer, 2003). Prostat enfeksiyonundan sorumlu olan bakteriler, idrar yolu ya da cinsel yolla aktarılabilmektedir (Fraczek ve ark, 2008). Tüm bu patojenler, genital yola lökositlerin akını ile ile akut inflamatuvar yanıtı başlatmaktadırlar ve bu durum ROS üretiminde bir artışla sonuçlanmaktadır (Potts ve ark, 2000). Bu vakalar oksidatif sperm patolojisinin yüksek derecelerine sahiplerdir (Brackett ve ark, 2008).

1.4.1.2.2.5. İmmünolojik Faktörler

İmünolojik faktörlerin, insan üreme sürecinin neredeyse her adımında etkili olması nedeniyle, gametlerde antikor kaynaklı hasar, immünolojik kısırlığın önemli bir sebebi olabilmektedir (Poongothai ve ark, 2009).

1.4.1.2.2.6. Epigenetik

Erkek infertilite nedenlerini araştıran bir dizi çalışma sonucunda epigenetik değişikliklerin erkek infertilitesinde katkı sağlayabileceği fikrini destekleyen yeterli bilgi mevcuttur. Anormal epigenetik yeniden programlama, erkek germ hücrelerinde sperm anomalilerine yol açabilmektedir. Bu amaçla yapılan son çalışmalarda, oligozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi görülen erkeklerin sperm örneklerinde, değişmiş epigenetik profillerin bulunduğu gösterilmiştir. Gametogenez ve germ hücre matürasyonu sırasında, germ hücreleri spermde ve oositte cinsiyete özgü paternlerin oluşturulmasını sağlayan epigenetik programlamaya katılmaktadır (Şekil 1.16) (Dada ve ark, 2012).



Şekil 1.16. Spermatogenez sırasında epigenetik olaylar (Dada ve ark, 2012).

1.5. Seminal Parametrelerin Klinik Tanımlanması

İnfertil erkekler, kromozomlarında farklı nüklear değişiklikler göstermektedirler. Bu değişiklikler arasında anormal kromatin yapısı, mikrodelesyonlar, anöploidiler ve DNA zincir kırıkları (tek ve çift) yer almaktadır. Spermatozoanın sayısına ve hareketliliğine bağlı olarak semen örnekleri sınıflandırılırsa: normozoospermi, oligozoospermi, astenozoospermi, teratozoospermi, oligoastenoteratozospermi, azoospermi ve aspermi olarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 1.2) (WHO, 2010).

Çizelge 1.2. Seminal parametrelerin klinik tanımlanması (WHO, 2010)

Terim	Anlamı
Normozoospermi:	Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat,
Oligozoospermi:	Referans değerden düşük sperm konsantrasyonu,
Asthenozoospermi:	Hareketlilik için referans değerden daha düşük değer,
Teratozoospermi:	Morfoloji için referans değerden daha düşük değer
Oligoasthenoteratozoospermia:	Her üç değişkenin de bozukluğuna işaret eder
Azoospermi:	Ejakülatta hiç spermatozoa bulunmaması,
Aspermia:	Hiç ejakülat elde edilememesi

1.5.1. Azoospermi

Azoospermi, semen örneğinde hem spermatozoa, hem de spermatogenik hücrelerin bulunmaması durumudur. Bu durum genellikle gonadların sekresyon bozukluklarına eşlik eden, seminal kanalların tam obtrüksiyonu nedeniyle ortaya çıkabilmektedir. Spermin seminal sıvıda bulunmaması nedeniyle bu durum erkek infertilitesi ile sonuçlanır.

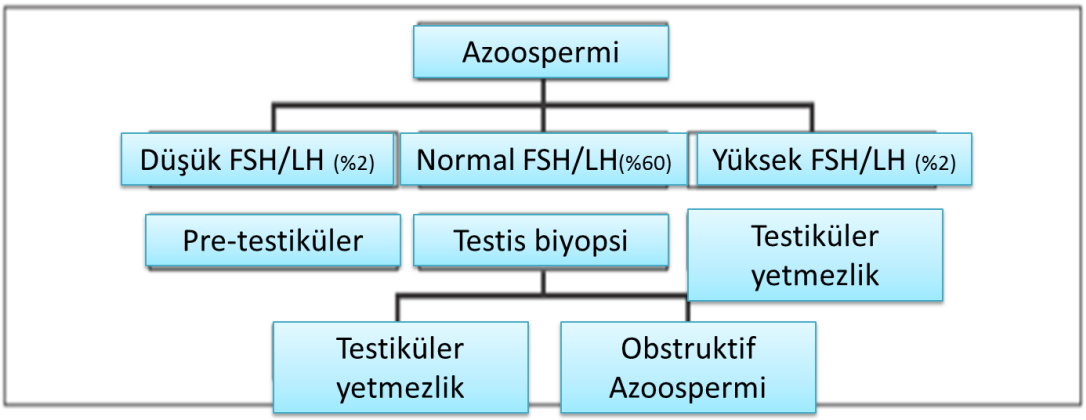
Genel popülasyonda azoospermi vakalarının prevalansı %2 olarak tahmin edilmiştir. Aynı zamanda %10-20 kadar yüksek olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur. Testiküler histoloji, tübüler hasardan hipospermatogeneze kadar değişen, spermatogenik bozuklukların farklı derecelerini göstermektedir (Vijayalakshmi, 2005).

1.5.1.1. Azoospermik Hastaların Sınıflandırılması

Azoosperminin kategorisi, genellikle luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyeleri tarafından belirlenebilmektedir. Pre-testiküler azoospermi tanısı daha açıktır; LH ve FSH düzeyleri düşük seviyede iken testosteron düzeyleri

düşük veya normal seviyelerde olacaktır. Artmış FSH ve LH seviyesi ve bilateral olarak küçük testisleri olan erkeklerde non-obstrüktif azoospermi vardır. Bununla birlikte, FSH ve LH ile ilgili normal düzeyde olan erkeklerde obstrüktif ya da obstrüktif olmayan azoospermi olabilir (Çizelge 1.3)(von Eckardstein ve ark, 1999). Ne yazık ki, non-obstrüktif azospermili erkekleri obstrüktif azoospermili erkeklerden ayırt etmek için hiçbir non-invaziv yöntem yoktur. Bir testis biyopsisi genellikle kesin tanı konması için gereklidir (Çizelge 1.4) (Jarvi ve ark, 2010).

Çizelge 1.3. Ejakulat volümü normal azoospermi nedenleri (Jarvi ve ark, 2010).



Çizelge 1.4. Erkek infertilitesinin genetik anormalileri (O'Flynn O'Brien ve ark, 2010)

Genetik anomalite	Yaygınlık (%)		
	Normozoospermi	**Azoospermi**	**Oligozoospermi**
Kromozomal anomaliteler	5	15	
Klinefelter sendromu	5		10
Robertsonian translokasyonu	0.8	0.09	1.6
Y kromozom mikrodelesyonu	%2'den az	10-15	5-10
AZFa delesyonu (sertoli cell-only sendromu)		0.5-1.0	
AZFb delesyonu (spermatogenik arrest)		0.5-1.0	
AZFc delesyonu (şiddetli oligozoospermiden obstruktif olmayan azoospermiye kadar)		0.5-1.0	
Kısmi *AZFc* delesyonu		3-5	

Azoospermik hastalar üç kategoride sınıflandırılmaktadır:

1.5.1.1.1. Pre-Testiküler Azoospermi

Azoospermili erkeklerin %2'sini içermektedir; hipotalamik veya hipofiz anormallikleri nedeniyle hipogonadotropik-hipogonadizm şeklinde tanımlanmaktadır (Elzanaty, 2013).

1.5.1.1.2. Post-Testiküler Tıkanıklık veya Obstrüktif Azoospermi (OA)

Azoospermili erkeklerin %60'ını oluşturmaktadır. Bu durumda spermatogenez normaldir ancak obstrüktif azoospermi veya retrograd ejakülasyon görünmektedir (Jarvi ve ark, 2010; Elzanaty, 2013).

1.5.1.1.3. Testiküler Yetmezlik veya Obstrüktif Olmayan Azoospermi (NOA)

Azoospermi prevalansı infertil erkeklerin yaklaşık %10 ila %15'ini ve toplam erkek nüfusunun yaklaşık olarak %1'ini ve azoospermili erkeklerin %40'ını oluşturmaktadır (World Health Organization, 2000). NOA testiküler yetmezlikten kaynaklanmaktadır. Bu durumda testis, olgun spermatozoadan tamamen yoksundur (Elzanaty, 2013). Testiküler yetmezlik etiyolojileri arasında seks kromozom anomalileri, translokasyonlar, Y kromozomu mikrodelesyonları, inmemiş testis, testis torsiyonu, radyasyon, toksinler ve varikosel gibi genetik bozukluklar ve çevresel faktörler yer almaktadır (Elzanaty, 2013). Tüm erkek nüfusunun %5-20'sinde, tüm infertil erkek nüfusunun %20-40'ında ve NOA ile erkeklerin %5-10'unda rastlanan varikosel, testisleri çevreleyen damarların pampiniform pleksustaki genişlemesi olarak tanımlanmaktaır (Jarow ve ark, 1989). Bu nedenle, varikosel operasyonu, infertil erkeklerde en sık yapılan operasyonlardan birisi olarak sayılmaktadır. Birçok araştırmacı, düşük sperm kalitesi olan hastalarda, varikosel onarımının, meni kalitesi ve gebelik oranınıyla ilişkili olduğunu kabul etmişlerdir

(Madgar ve ark, 1995; Uygur ve ark,1999; Zini ve ark, 1999). Ancak bir grup araştırmacı ise bu araştırmacılarla aynı fikirde değildir (Breznik ve ark, 1993; Lund ve Larsen, 1998; Elzanaty, 2013).

NOA, erkeklerde hipospermatogenez, spermatogenezin erken ya da geç aşamalarında matürasyon arresti (MA) veya spermatogenezin tamamen yokluğu ile karakterize "Sertoli cell only syndrome (SCO) " durumlarında görünmektedir (Jarvi vd., 2010).

MA karakterizasyonunda sınırlı veri mevcuttur; genetik ya da idiyopatik oluşumla primer MA ya da sonradan kazanılarak edinsel MA olabilmektedir. MA olan erkekler genel olarak serumlarında normal düzeylerde FSH, LH, testosteron ve prolaktine (Micic, 1983) sahip olmaktadırlar. Ancak Ishikawa ve arkadaşları geç MA olan erkeklerin, erken MA olan erkeklere göre daha düşük FSH ve çoğalmış seminifer tübül çaplarına sahip olduklarını bulmuşlardır (Ishikawa ve ark, 2004). MA olan erkeklerde Y kromozomu mikrodelesyonları ve/veya karyotipik anomaliler gibi daha saptanabilir genetik anomalilerin olduğu bildirilmiştir (Foresta ve ark, 2001; Gonsalves ve ark, 2004; Ferras ve ark, 2004). Yapılan bir çalışmada MA'ı daha spesifik biçimde karakterize etmek için, çoklu değişkenlerin karşılaştırma yoluya erken MA erkekler ile geç MA erkeklerin klinik olarak birbirlerinden ayırt edilebileceği hipotezi sunulmuştur (Weedin ve ark, 2011).

1.5.1.2. Azoospermik Hastaların Tedavisi

NOA'lı vaka tedavisi, infertil erkek tedavilerinin en zorlu alt kümesini temsil ederler. Bu hastalar fertil erkeklerle karşılaştırıldığında, genellikle artmış FSH düzeyi, azalmış serum testesteronu ve testis hacminde küçülmeye sahiplerdir. Biyolojik gebeliği başlatmak için bu hastalarda genellikle testis dokusundan veya nadir olarak ejakulattan alınan sperm kullanılarak, IVF ve ICSI'ye ihtiyaç duyulmaktadırlar (Schlegel ve ark, 1997). NOA veya kriptozoospermi olan erkeklerin testis biyopsilerine dayalı histopatolojik tanıları genellikle SCO, hipospermatogenezis ve MA'yı içermektedir. MA, olgunlaşması tamamlanmayan germ hücreleri olarak

tanımlanır. Uniform MA, seminifer tübüller boyunca spermatogenezin aynı aşamasında spermatogenetik arrest ile karakterize olmaktadır (Hung ve ark, 2007). MA sadece spermatogonia veya spermtosit bulunan erken MA ve spermatozoa hücreleri olmadan spermatid bulunan geç MA olarak iki alt kategoriye ayrılmaktadır (Kim ve ark, 1999; Kadioglu ve ark, 2001). Histolojik değerlendirmede spermatozoa tespit edilmemesine rağmen, bazı durumlarda MA olan erkeklerin testislerinde spermin küçük odakları olabilmektedir. Bu spermler IVF/ICSI için kullanılabilmektedir (Hung ve ark, 2007).

1.6. TEZİN AMACI

Bu tez, günümüz toplumunda büyük bir sorun olan erkek infertilite etyolojisinin açıklanmasına yönelik bir araştırmayı kapsamaktadır ve 4 başlık altında yer almaktadır.

1. Sertoli hücrelerinin, spermatogenik hücre diferansiyasyonu üzerinde etkili olmaları nedeniyle, NOA hastalarının tedavisinde bu hücrelerin in vitro çalışmalarda kullanımının yararlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca "Maturasyon aresti" görülen NOA hastaları ile "maturasyon aresti" görülmeyen OA hastaları karşılaştırıldığında, spermatogenezin gerçekleşmesinde etkili rol oynayan somatik Sertoli hücre fonksiyonları ve bu hücrelerde ifade olan faktörlerin arasında farklılık olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda yapılan bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Menge ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada OA ve NOA hastaları Sertoli hücreleri sekresyonu açısından değerlendirilmiştir ve bunun sonucunda SCF, BMP4 ve GDNF gibi faktörlerin NOA hastalarında OA hastalarına göre daha az ifade olduğu gösterilmiştir (Meng ve ark, 2013). NOA hastalarının ejakulatlarında olgun spermatozoa bulunmaması ve özellikle bir grup hastanın mikroskobik değerlendirmelerinde ejakulatta olgunlaşmamış yuvarlak spermatid benzeri hücrelerin tespit edilmesi, bizi bu hücrelerin olgunlaşmadan önce ejakulata döküldüğü düşüncesine yönlendirdi. Bu olayda özellikle sitokinlerin rol oynayabileceği, yaptığımız literatür araştırmalarına dayanmaktadır (Yao ve ark, 2010). Bu da sitokinlerin spematogenez sürecinde önemli role sahip olduklarını

göstermektedir. Örneğin Foster ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada rekombinant FSH'nın dişi fare folikülogenez modelinde sitokin profillerini değiştirerek etki etmesi gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler rFSH'nın *in vitro* ortamında folikül medyumunda bulunan sitokin profillerini önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir. Özellikle de, oosit kalitesi, erken dönemde embriyo hayatta kalma ve implantasyon ile ilişkili olan bazı sitokinlerin FSH uygulanması sonrasında yüksek ifade edildiği gösterilmiştir (Foster ve ark, 2010).

Kadın infertilitesi tedavisinde FSH uygulanması etkin bir tedavi yöntemi olarak klinikte kullanılmaktadır. NOA tanısı alan infertil erkeklerin tedavisinde de FSH uygulanması sonucunda sperm üretiminin (Bartoov ve ark, 1994; Foresta ve ark, 2000; Attia ve ark, 2007; Foresta ve ark, 2002) ve gebelik oranının (Foresta ve ark, 2005) önemli ölçüde arttırılabileceği değişik araştırmalarda, tartışmalı bile olsa da gösterilmiştir.

NOA hastaların tedavisinde FSH'nın kullanılabiliyor olmasının yanı sıra FSH'nın testisin yapısında Sertoli destek hücrelerinde ifade edilen sitokin profillerini değiştirerek etki etmesi düşüncesi bu tez çalışmasının temelini oluşturmaktadır. Önceki çalışmalara dayanarak, FSH'nın erkeklerde böyle bir mekanizma üzerinden etki edebileceği düşünülebilir (Foster ve ark, 2010).

FSH'nın immatür ve matür evredeki Sertoli hücreleri üzerine farklı etkiler gösteriyor olması, FSH resptörlerinin ve genlerin farklı ifade edilmelerinden kaynaklanıyor olabilir. FSH'nın Sertoli hücreleri üzerine etkisi hakkında önemli bilgiler mevcut olmasına rağmen bu hormonun Sertoli hücresi üzerindeki diferansiyasyon etkisinin nedeni henüz araştırılmaktadır (Dahia ve ark, 2006)

Bu tez çalışmasında erkek infertilitesinin nedenlerini araştırmak üzere NOA tanısı almış olan hataların TESE örneklerinden Sertoli hücreleri izole edilerek kontrol grubuna göre sitokin gen ifade profillerindeki farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. NOA hastaları ve kontrol grubundan izole edilen Sertoli hücrelerine FSH uygulandıktan sonra sitokin gen ifade değişikliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. FSH bazal konsantrasyonları yüksek olan NOA erkeklerde FSH tedavisinde olumlu yanıt alınamamıştır (Foresta ve ark, 2009). Selice ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada FSH hormonunun neden etkisiz kaldığını FSH'nın Sertoli hücreleri üzerindeki reseptörlerin eksikliğinden kaynaklandığını göstermişlerdir (Selice ve ark, 2011). Bu olgularda FSH reseptörlerinin düşük ifade edildiklerini belirleyen yüksek plasma FSH düzeyleri, tubular fonksiyonunda bir değişikliğine yol açabilmektedir (Foresta ve ark, 2009). Bu nedenle çalışmamızda FSH hormonuna yanıt alınamamasının nedeni olarak FSHR'nin Sertoli hücrelerinde eksikliğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

4. Bazı çalışmalarda Androjen Bağlayıcı Protein (ABP)'in FSH'ya yanıt olarak ifade edilmesi primer insan Sertoli hücre kültüründe gösterilmiştir. FSH hormonu, reseptörüne bağlandıktan sonra hücrelerde ABP miktarında artış görülmesi bu hücrelerin FSHR'ünün fonksiyonel olduğunun göstergesi şeklinde düşünülmektedir. Bu çalışmada FSHR'nin fonksiyonel olup olmadığının saptanması amacıyla ABP'in hasta ve kontrol grubu arasındaki ifade farklılıklarının incelenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda OA hastaları spermatogenik süreci tamamlamaları ve bu sürecin sonunda olgun sperm üretebilmeleri nedeniyle literatürde de benzeri araştırmalarda olduğu gibi kontrol grubumuzu oluşturacak olup, NOA hastaları ise hasta grubu olarak araştırmamızda yer almıştır.

Bu çalışmadan elde edilen verilerin spermatogenez mekanizmasının daha iyi anlaşılmasında ve NOA hastaları için tedavi stratejilerinin oluşturulmasına yeni ufuklar açacağı düşünülmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KIMYASAL MALZEME VE SOLÜSYONLAR

2.1.1. Hasta Materyali

Kısırlık nedeniyle Ankara üniversitesi Üreme Sağlığı Teşhis, Tedavi, Eğitim, Araştırma ve Uygulama merkezine (USAUM) ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji polikliniğine başvuran non-obstrüktif azoospermi (NOA) ve obstrüktif azoospermi (OA) olarak tanımlanan hastalardan rutin tetkik yapıldıktan sonra mikrocerrahi TESE yöntemi ile testis dokusu alındı. Bu hastalarda Spermatogenez sürecinin normal olduğu kabul edilen OA tanısı almış doku örnekleri kontrol grubu olarak kullanıldı. İki gruptan (10 NOA ve 6 OA) alınan dokuların sertoli hücrelerinden primer kültür yapıldı. Çalışılan hastaların ve kontrol grupların özellikleri çizelge 2.1, çizelge 2.2 ve çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.1. Normal FSH'lı NOA hasta grubunun özellikleri

HASTA NO	TANI	TEDAVİ	SERUM FSH DÜZEYİ	SERUM TESTOSTERON DÜZEYİ
1.	NOA	ALMADI	2	3
2.	NOA	ALMADI	11	3
3.	NOA	ALMADI	2	310
4.	NOA	ALMADI	10	200
5.	NOA	ALMADI	11	205
6	NOA	ALMADI	3.1	314

Çizelge 2.2. Yüksek FSH'lı NOA hasta grubunun özellikleri

HASTA NO	TANI	TEDAVİ	SERUM FSH DÜZEYİ	SERUM TESTOSTERON DÜZEYİ
1.	**NOA**	**ALMADI**	**29**	**3**
2.	**NOA**	**ALMADI**	**32**	**2**
3.	**NOA**	**ALMADI**	**36**	**160**
4.	**NOA**	**ALMADI**	**25**	**1.6**

Çizelge 2.3. Kontrol grubunun özellikleri

KONTROL NO	TANI	TEDAVİ	SERUM FSH DÜZEYİ	SERUM TESTOSTERON DÜZEYİ
1.	**OA**	**ALMADI**	3	2.8
2.	**OA**	**ALMADI**	1.9	4.3
3.	**OA**	**ALMADI**	2	3.7
4.	**OA**	**ALMADI**	5	5.5
5.	**OA**	**ALMADI**	3	5.1
6.	**OA**	**ALMADI**	1.8	633.6

2.1.2. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Dondurulmasında Kullanılan Malzemeler

PBS (%1 Penisilin/Streptomisin içeren): (Lonza marka, No: BE17-516F). Doku yıkama amaçlı kullanıldı.

Enzimler: 5 ml Tripsin/EDTA (Gibco marka, No: R-001-100), 50 µl Kollajenaz 4 (INVITROGEN marka No: 17104-019), 0.5 µl HYASE-10X™ (Vitrolife marka, No: 10017). Doku parçalama amaçlı kullanıldılar.

Besiyeri: HEPES, L-Glutamine, %10 FBS, %1 Penisilin / Streptomisin, ve 1% Amfotrisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM:F12 1:1Mixture, 500ml, Lonza marka, No: BE12-719F). Hücre kültüründe kullanıldı.

Fötal Dana Serumu (FBS, South America) 500ml: (BIOWEST marka, No: S1810-500)

Penisilin/Streptomisin, 10.000units/ml: (Lonza marka, No: DE17-602E)

PBS (Fosfat Tuz Tamponu, pH: 7,4 Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen).

140mM NaCl (Gerbu marka, Lot No: 210307).

3 mM KCl (Carlo Erba marka, No: 7447-40-7).

3 mM KH_2PO_4 (Carlo Erba marka, No: 7778-77-0).

6.4mM $NaHPO_4$ (Carlo Erba marka, No: 10028-24-7).

EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit): (Applichem marka, No: 6381-92-6)

Tripsin- EDTA karışımı (%0.25 Tripsin + %0.1 EDTA): (Gibco marka, no: R-001-100)

%10 Dimetilsülfoksit (DMSO) solüsyonu: (Applichem marka, No: 67-68-5+). Hücreleri dondurmak için kullanıldı.

Folikül Uyarıcı Hormon (FSH): (Puregon Sc Kartuş 600 Iu 0.72 Ml 1x0.72 Ml'lik Kartuş; Etken Maddesi: Follitropin Beta). Etken madde olarak kullanıldı.

Tranfer Pipeti: Citotest marka, 155 mm, Lot No: 090036

Serolojik Pipet: Greiner bio-one, 5 ve 10 ml'lik

Petri kutusu: Isotherm marka, 90 mm çap, steril

Bistüri: AE marka, karbon çelik, 11 numara

Etil Alkol (%75'lik): (Riedel-de Haen, No: 64-17-5). Sterilizasyon amaçlı kullanıldı.

15 ve 50 ml'lik steril tüpler: (Sarstedt marka, No: 62.554.502, 62.547.254)

Hücre Dondurma Tüpleri: (Greiner bio- one marka, 2 ml)

Hücre kültürü için kullanılan flasklar:

- TC Flask T-75 Vent.Cap Red (SARSTEDT marka, No: 83.1813.002-100).
- TC Flask T-25 Vent.Cap Red (SARSTEDT marka, No: 83.1810.002-300).

Hücre kültür işleminde kullanılan cihazlar:

Steril kabin (Holten S-20100), CO_2'li Etüv (Sanyo MCO-20 AIC), Ters bakışlı mikroskop (Nikon TS 100), Su banyosu (Wisd Wase Bath), CO2 inkübatör (Heraeus), Derin dondurucu -20 °C (Sanyo), Derin dondurucu -80 °C (Sanyo), Sıvı Azot Tankı, Ph Metre (Sartorius), Isıtmalı manyetik karıştırıcılar (CLP) ve santrifüj cihazı (Nüve NF 400).

2.1.3. Sertoli Hücrelerinin Karakterizasyonunda Kullanılan Malzemeler

Sertoli hücrelerine özgü proteinlerin floresan işaretlenmesi için kullanılan antikorlar: Vimentin (D21H3) XP® Rabbit mAb, CST-E PRODUCT, no: 5741S, Anti-GATA4 antibody, ABCAM marka, no: ab134057, FİTC-goat anti-rabbit sekonder antibody, invitrogen marka, no: 656111

ACCURİ C6 Flow Cytometry Cihazı

Vorteks cihazı: (Labnet)

Floresan mikroskop: (Olumpus BX51)

Soğutmalı Mikrosantrifüj: (Eppendorf marka)

%4 paraformaldehid: Hücrelerin fiksasyonu için kullanıldı.

PBS (Fosfat Tuz Tamponu, pH: 7,4): (Lonza marka)

%0.1 triton-x100: (GERBU Biotechnik, GmbH). Permabilizasyon amaçlı kullanıldı.

%3 Bovine Serum Albumin içeren 1X PBS: Blocking buffer olarak kullanıldı.

24 kuyucuklu plaka: (TC Plate 24Well F, SARSTEDT marka no: 83.1836-50)

2.1.4. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonunda Kullanılan Malzemeler

Trizol-Reagent RT: (Molecular Research Center Marka, No: RT 111).

BAM (4-Bromoanisole): (Molecular Research Center marka, No: BN 191).

İzopropanol: (Merk marka, No: K37727334).

Etil Alkol (%75'lik, Soğuk): (Riedel-de Haen, No: 64-17-5).

Diethylpyrocarbonate (DEPC): (Applichem marka, No: 1609-47-8).

Kit saklama dolabı: (Sanyo, +4 °C)

Eppendorf 5415R soğutmalı satrifüj: RNA izolasyonunda kullanıldı.

Spektrofotometre: RNA miktarının ölçümünde kullanıldı.

2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinde Kullanılan Malzemeler

cDNA sentezi için 170-8841 iScirpt Reverse Transcription Supermix biorad marka Kiti kullanıldı.

Bu izolasyon için kit dışında sarf malzeme olarak 200 µl'lik ependorf tüpler ve steril dH_2O kullanıldı.

cDNA) Sentezinde Corbett Research PCR cihazı kullanıldı.

2.1.6. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler

Agaroz, normal erime sıcaklığına sahip: (Pronase marka, Lot No: 084518PR).

TBE solüsyonu (pH: 7.5): Tris baz (Biobasic marka, No: 77-86-1).

Yükleme tamponu: 1XTBE solüsyonu, 100 ml

Etidyum Bromür, 10 mg/ml: (İnvitrogen marka, No: 15585-011).

DNA marker: (Jena Bioscience marka, No: M-213, 50bp).

%1'lik agaroz jel: (1 gr toz Agaroz, 100 cc 1X-TBE (Tris Borik Asit EDTA), 2.5 µl Etidyum bromür içerir).

Hassas terazi: (Sartorius marka).

2.1.7. Sitokin Pcr Array Ve Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitive RT-PCR) Yönteminde Kullanılan Malzemeler

Sitokin Pcr Array, Roche Applied Science LightCycler®480 Real-Time PCR sistemi kullanılarak yapıldı.

172-5274 SsoAdvancedUniversal SYBR Green Bio-Rad marka

1 Plate HCA-I Human Cytokine Primer Library I: Bu primerlerin listesi çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. İnsan primer sitokin kütüphanesi I (Human Cytokine Primer Library I)

Kuyu	Sembol	İsim	Kuyu	Sembol	İsim
A1	**IL2**	Interleukin 2	E1	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
A2	**IL7**	Interleukin 7	E2	FLT3LG	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
A3	**IL9**	Interleukin 9	E3	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
A4	**IL15**	Interleukin 15	E4	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
A5	**IL21**	Interleukin 21	E5	FGF4	Fibroblast growth factor 4
A6	**TSLP**	Thymic stromal lymphopoietin	E6	FGF5	Fibroblast growth factor 5
A7	**IL3**	Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)	E7	FGF6	Fibroblast growth factor 6
A8	**IL5**	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)	E8	FGF7	Galactokinase 2
A9	**CSF2**	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	E9	FGF8	Fibroblast growth factor 8 (androgen-induced)
A10	**IL6**	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	E10	FGF9	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)
A11	**IL11**	Interleukin 11	E11	FGF10	Fibroblast growth factor 10
A12	**IL12A**	Interleukin 12A	E12	FGF11	Fibroblast growth factor 11
B1	**IL12B**	Interleukin 12B	F1	FGF12	Fibroblast growth factor 12
B2	**IL23A**	Interleukin 23, alpha subunit p19	F2	FGF13	Fibroblast growth factor 13
B3	**LIF**	Leukemia inhibitory factor	F3	FGF14	Fibroblast growth factor 14
B4	**ZFP91**	Zinc finger protein 91 homolog (mouse)	F4	FGF16	Fibroblast growth factor 16
B5	**CLC**	Cardiotrophin-like cytokine factor 1	F5	FGF18	Fibroblast growth factor 18
B6	**CTF1**	Cardiotrophin 1	F6	FGF19	Fibroblast growth factor 19
B7	**CSF3**	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	F7	FGF20	Fibroblast growth factor 20
B8	**LEP**	Leptin (obesity homolog, mouse)	F8	FGF23	Fibroblast growth factor 23
B9	**EPO**	Erythropoietin	F9	NRG1	Neuregulin 1
B10	**GH1**	Growth hormone 1	F10	NRG2	Neuregulin 2
B11	**GH2**	Growth hormone 2	F11	NRG3	Neuregulin 3
B12	**PRL**	Prolactin	F12	NRG4	Neuregulin 4
C1	**TPO**	Thyroid peroxidase	G1	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
C2	**IFNA1**	Interferon, alpha 1	G2	HGF	Hepatocyte growth factor
C3	**IFNB1**	Interferon, beta 1, fibroblast	G3	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)
C4	**IFNW1**	Interferon, omega 1	G4	KITLG	KIT ligand
C5	**IFNK**	Interferon, kappa	G5	EFNA1	Ephrin-A1
C6	**IFNE1**	Interferon epsilon 1	G6	EFNA2	Ephrin-A2
C7	**IL28A**	Interleukin 28A (interferon, lambda 2)	G7	EFNA3	Ephrin-A3
C8	**IL29**	Interleukin 29 (interferon, lambda 1)	G8	EFNA4	Ephrin-A4
C9	**IFNG**	Interferon, gamma	G9	EFNA5	Ephrin-A5
C10	**IL10**	Interleukin 10	G10	EFNB1	Ephrin-B1
C11	**IL20**	Interleukin 20	G11	EFNB2	Ephrin-B2
C12	**IL24**	Interleukin 24	G12	EFNB3	Ephrin-B3
D1	**IL22**	Interleukin 22	H1	GAS6	Growth arrest-specific 6
D2	**IL26**	Interleukin 26	H2	ANGPT1	Angiopoietin 1
D3	**VEGFA**	Vascular endothelial growth factor	H3	ANGPT2	Angiopoietin 2
D4	**VEGFB**	Vascular endothelial growth factor B	H4	ANGPT4	Angiopoietin 4
D5	**VEGFC**	Vascular endothelial growth factor C	H5	ACTB	Actin, beta
D6	**PDGFC**	Platelet derived growth factor C	H6	B2M	Beta-2-microglobulin
D7	**PDGFD**	DNA-damage inducible protein 1	H7	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
D8	**NGFB**	Nerve growth factor, beta polypeptide	H8	GUSB	Glucuronidase, beta
D9	**NTF3**	Neurotrophin 3	H9	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
D10	**NTF5**	Neurotrophin 5 (neurotrophin 4/5)	H10	PGK	Phosphoglycerate kinase 1
D11	**BDNF**	Brain-derived neurotrophic factor	H11	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
D12	**GDNF**	Glial cell derived neurotrophic factor	H12	RPL13A	Ribosomal protein L13a

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Primer Sertoli Hücre Kültürü

NOA ve OA hastalarından TESE yöntemiyle alınan doku örneklerinden primer sertoli hücre kültürü yapıldı.

İzlenen protokol:

1. Testis dokusunundan alınan doku örneği %1'lik Penisilin/Streptomisin içeren PBS ile üç defa yıkandı.
2. Daha sonra bir diğer falkon tüpte üç enzimden (5 ml Tripsin/EDTA, 50 µl kollajenaz-4 ve 5 µl hiyalüronidaz) oluşan enzim karışımı hazırlandı.
3. Hazırlanan enzim karışımı doku örneğinin üzerine eklendi ve 37 derecede 45 dakika boyunca çalkalandı.
4. 45 dakika sonra örnek inkübatörden alındı ve proteinaz enzimlerinin inaktivasyonu için üzerine 1ml enzim inhibitörü (FBS) eklendi.
5. Örnek içerisinde istenmeyen hücre parçacıkları bulunduğundan, bu parçacıkların çökmesi için bu aşamada örnek biraz bekletildi.
6. Daha sonra üst sıvı kısım başka bir falkon tüpe aktarılarak 800 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası pelet %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM/F12 besiyeri ile yeniden süspanse edildi.
6. süspanse haldeki hücleler flasklara aktarıldı.
7. 48 saat boyunca 37 derecede ve %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyon yapıldı.
8. 48 saat sonunda örnek, Penisilin/Streptomisin içeren PBS ile yıkandı ve besiyeri değiştirildi. Sertoli hücreleri içeren flasklar 37 derecede ve %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi.
9. besiyeri her iki günde bir değiştirilip yapışmayan, ölü hücreler ve hücre atıkları ortamdan uzaklaştırıldı.

2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

- Kültür flaskı %70 oranında hücre ile kaplanınca pasaj işlemi yapıldı. Bunun için hücrelerin üzerindeki besiyeri atılarak steril PBS (Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen) ile hücreler yıkandı.
- Daha sonra PBS uzaklaştırıldı ve 25 cm^2'lik flaska 0.4 ml, 75 cm^2'lik flaska 1 ml Tripsin/EDTA eklendi ve 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
- 5 dakika sonar tripsinin etkisini durdurmak için hücrelerin üzerine Tripsin/EDTA miktarı kadar besiyeri eklendi.
- Hücreler 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santifüj sonrası süpernatan kısım atıldı. Hücrelerin bir kısmı dondurmak üzere ayrıldı. Geri kalan kısmın üzerine serolojik pipet yardımıyla pasaj yapılacak flask sayısına yetecek kadar besiyeri eklendi ve flasklara dağıtıldıktan sonar etüve kaldırıldı.

**Dondurulacak hücrelerin üzerine dondurma solüsyonu eklenerek karıştırıldı ve özel dondurma tüplerine aktarıldı. Bu tüpler, buz içerisinde -20 °C'de 1 saat ve -80 °C'de 24 saat tutulduktan sonra sıvı azot bulunan tanklara kaldırıldı.

- 37°C etüvden çıkarılan flask biyogüvenlik kabini içerisine aktarılarak flasktaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- 75'lik flaska 2.5 ml tripsin eklenerek 5 dakika süre boyunca 37°C etüvde inkübe edildi. Bu süre içerisinde tripsin enzimi etkisi ile hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı.
- 5 dakika sonra flask tekrar biyogüvenlik kabinine getirilerek tripsinin etkisinin durdurulması için 5 ml besiyeri eklendi. Besiyeri içerisinde yüzer konuma gelen hücreler besiyeriyle birlikte alınarak 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı ve 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Üstteki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Falkon tüpe 4 ml taze besiyeri eklenerek hücreler yeniden süspanse edildi ve yeni flasklara ekim yapıldı.

2.2.3. Hücrelerin Dondurulması

Kullanılan hücreler, deney aşamasında olası kontaminasyona karşı ve ilerde tekrar kullanılmak üzere dondurularak saklandı. Hücrelerin dondurularak saklanması işlemi dikkat gerektiren bir işlemdir. Öncelikle hücre besi ortamı ve serum su banyosunda 37 °C'ye ısıtıldı. Hücre dondurulmasında kullanılan DMSO ve besiyeri karışımı (10% DMSO ve %90 DMEM/F12 besiyeri) her tüpe 1,5 ml olacak şekilde hazırlandı ve +4 °C'de soğutuldu. Kültürü yapılan ve flask yüzeyini kaplamış olan hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve flasklar PBS ile yıkandı. Her flaska 2 ml tripsin/EDTA eklendi ve hücreler 2 dakika süresince etüvde tutularak tripsinin hücreleri birbirinden ve flask tabanından ayırması sağlandı. Daha sonra flasklara 2ml besiyeri eklenerek tripsinin etkisi inhibe edildi. Hücreler falkon tüpe aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra kalan pelet üzerine daha önce hazırlanmış soğuk dondurma solüsyonu eklendi.pelet yavaşça resüspanse edildi ve 1,5 ml'lik dondurma tüplerine (vial) aktarıldı. (Her tüpte ortalama 2-4 $x10^6$ hücre/ml var). Hazırlanan tüpler 1 saat boyunca – 20 ºC'de ve daha sonra 1 gece boyunca - 80ºC'de bekletildi. Ertesi gün tüpler -80 ºC'den alındı ve sıvı azot tankına kaldırıldı.

2.2.4. Hücrelerin Sıvı Azottan Çıkarılıp Çözdürülmesi

Azottan çıkarılan hücre tüpleri 37°C su banyosunda gezdirilerek çözdürüldü ve biyogüvenlik kabini içerisine alındı. Dondurma tüplerindeki hücreler pipetle çekilerek falkon tüpe aktarıldı. Daha sonra her falkon tüpe 8 ml besiyeri eklendi ve 1000 rmp'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst besiyeri faz uzaklaştırıldı ve tüpe 8 ml taze besiyeri eklenerek hücreler yeniden süspense edildi. Hücreler yeni flasklara ekilerek etüve kaldırıldı ve konflent olma durumlarına gore pasajlandı.

2.2.5. Primer Sertoli Hücrelerin Karakterizasyonu

Sertoli hücrelerin karakterizasyonu akim sitometri ve immünositokimyasal yöntemlerle yapıldı.

2.2.5.1. Akim Sitometri (İntraselüler Protein Boyama)

İntraselüler protein boyamada üç aşama çok önemlidir.

Fiksasyon, permabilizasyon (geçirgenlik) ve Bloklama

Deney aşağıdaki protokole uygun yapıldı:

1. Öncelikle yapışkan Sertoli hücrelerini flasktan ayırmak için Tripdin/EDTA karışımı kullanıldı.
2. Tripsinize edilen hücreler 10ml 1X PBS ile tamamlandı ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Pelet üzerine tekrar PBS eklendi ve santrifüj edildikten sonra supernatant kısım uzaklaştırıldı.
4. Fiksasyon aşamasında hücrelere 1ml % 4 PFA eklendi ve 20 dakika karanlıkta oda ısısında inkübasyon edildikten sonra iki kez PBS ile tekrar yıkandı.
5. Permabilizasyon aşamasında pelet üzerine 1 ml % 0.1'lik triton X- 100 eklendi ve 15 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası pelet tekrar PBS ile iki kez yıkandı.
7. Bloklama aşamasında hücreler % 3 BSA içeren PBS içerisinde oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve supernatant kısım uzaklaştırıldı.
8. Pelet, Blocking buffer içerisinde çözülüp 4 tüpe bölündü.
9. Birinci tüp Unstain, ikinci tüp İzotip, üçüncü tüp Vimentin ve dördüncü tüp Gata4 için ayrıldı.
10. Primer antikorlar kendilerine ait tüplere eklendi ve her dört tüp 30-45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında inkübe edildikten sonra iki kez PBS ile yıkandı.

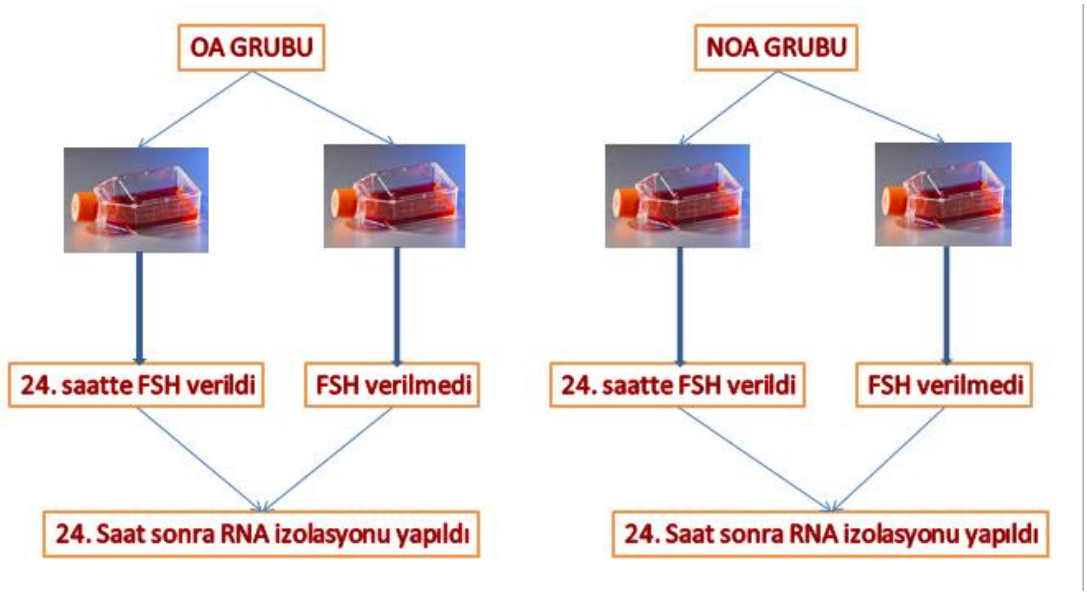
11. İzotip olarak kullanılan sekonder antikor (FITC) ikinci, üçüncü ve dördüncü tüplere eklendi.
12. 30 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edildikten sonra iki kez PBS ile yıkandı.
13. Pelet PBS içerisinde resüspanse edilerek ACCURİ C6 akım sitometre (flowcytometry) cihazında analiz edildi ve sonuçlar yüzde olarak kaydedildi.

2.2.5.2. İmmünositokimyasal Yöntem

1. 24 kuyucuklu pleyte "cover slip" denilen cam lameller konuldu ve her hasta ve kontrol Sertoli hücrelerinden kuyucuk başına bir milyon hücre ekildi.
2. 24 saat sonra kuyucuk tabanında konflent hale gelen hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilip atıldı ve hücreler iki kez PBS ile yıkandı.
3. Bu aşamada her kuyucuğa % 3.5 PFA eklendi ve 20 dakika bekletildikten sonra tekrar iki kez PBS ile yıkandı.
4. Bir petri içerisine parafilm serildi ve bu petrinin üzerine kullanılacak olan antikorların numaraları yazıldı. 1 ve 2 numaraları vimentin için, 3 ve 4 numaraları gata4 antikoru için kullanıldı.
5. Parafilm üzerinde antikorlardan kendilerine ait olan yerlere 10 mikrolitre konuldu.
6. 24 kuyucuklu pleytteki lameller bir pens yardımıyla alınıp PBs ile yıkandıktan sonra antikoların üzerine kapatıldı.
7. Primer antikorların bağlanması için 45 dakika boyunca etüvde bekletildi.
8. Bu aşamada başka bir petri içerisinde sekonde antikorlar hazırlandı.
9. 45 dakika sonra lameller tekrar pens yardımıyla alınıp PBS ile yıkanarak sekonder antikorların üzerine kapatıldı ve 45 dakika etüvde inkübe edildi.
10. Daha sonra cover slip'ler pens yardımıyla alındı PBS ile yıkanarak önceden haırlanmış lam üzerine kapatıldı. Bu lamların kenarları oje ile kapatıldı ve kuruması için karanlıkta bekletildi.
11. Lamlar floresan mikroskopta incelendi.

2.2.6. Primer Sertoli Hücrelerine FSH Hormonunun Uygulanması

Folikül Uyarıcı Hormon'un (FSH) Androjen bağlayıcı protein (ABP), FSH reseptörü (FSHR) ve Sitokinlerin üzerindeki etkisinin araştırılması için bu aşamada Sertoli hücrelerine programlı bir şekilde 5 mikrogam FSH uygulandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Primer sertoli hücrelerine FSH hormon uygulanması

Hücreler Flasklara ekildikten 24 saat sonra hem FSHR ve ABP ifade düzeylerini hem de sitokin profillerini incelemek amacıyla, flasktaki hücrelere ($1x10^6$ hücre için 5 ug/ml olacak şekilde) FSH uygulandı. 24.saatte hücrelere 1 ml trizol eklenerek tüplere alındı ve ileriki aşamada sitokin PCR array ve eş zamanlı PCR analizinde kullanılmak üzere RNA izolasyonu yapıldı.

2.2.7. RNA İzolasyonu

1. Hücrelerin üzerine 1 ml Trizol eklendikten sonra 5 dakika oda ısısında bekletildi.

2. Daha sonra tüplere 200 µl kloroform eklendi ve 10 dakika oda ısısında bekletildi.
3. 10 dakika sonra hücreler +4 °C 12.000 rcf'de 13 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası tüplerin üst RNA fazı pipetle çekilerek yeni tüplere aktarıldı.
5. Tüplerin üzerine 500 µl izopropanol eklenerek +4 °C 12.000 rcf'de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerin dibinde beyaz renkli RNA peleti oluştu.
6. Üstteki sıvı kısım dökülerek tüplere 1 ml % 75'lik etil alkol eklendi ve tüpler +4 °C 7400 rcf'de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Dipte oluşan RNA peletine dikkat edilerek üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
8. Tüpler kapağı açık bir şekilde oda ısısında bırakılarak alkolün buharlaşması sağlandı.
9. Daha sonra her tüpe 40 µl RNAz enzimi içermeyen steril su eklenerek RNA'ların çözülmesi sağlandı.

2.2.8. RNA Kantitasyonu

Sulandırılan RNA örneklerinden 2 µl alınarak spektrofotometre cihazında Gen5 programı yardımıyla ölçüm yapılmıştır.

2.2.9. RNA Örneklerinin % 1'lik Jelde Görüntülenmesi

Elde edilen RNA örnekleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. % 1'lik agaroz jelin hazırlanışı;

- 100 ml 1X TBE tampon bir beher içerisine alınarak üzerine 1 g toz agaroz tartılıp eklenmiştir.
- Beher mikrodalga fırında 350 °C'de 3 dk ısıtılarak agarozun erimesi ve su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.

- Beher kabin içerisine alınarak el yakmayacak kıvama gelene kadarsoğutulmuştur.
- Behere 3.5 µl etidyum bromür eklenerek karıştırılmış ve jel tankında donmaya bırakılmıştır.
- Donan jel, içerisinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına aktarılmıştır.
- RNA örneklerinden 2 µl, yükleme tamponundan 2 µl karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir.
- Örnekler 90 voltta 15 dk yürütülmüş ve daha sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenerek kaydedildmiştir.

Etidyum bromür hazırlanışı;

sdH_2O 1 ml
Etidyum Bromür 10 mg
Etidyum bromür su içerisinde vorteks yapılarak karıştırılır.
Yükleme tamponu hazırlanışı;
Ksilen Siyanol (Xylene Cyanol) 25 mg
Gliserol 5 ml
dH_2O ile 10 ml'ye tamamlanır. Vorteks yapılarak karıştırılır.
10X TBE hazırlanışı;
Tris Base 81 g
Borik Asit 41.5 g
EDTA 30 ml (Tartılan kimyasallar 500 ml dH2O içerisinde çözülür. Son hacim 750 ml'ye tammalanır. pH 8'e getirilerek kullanılır)

2.2.10. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA'lardan 1000 ng kullanılarak "Bio- Rad cDNA Synthesis Kit''yardımıyla cDNA sentezi çizelge 2.5'te gösterilen protokole uygun bir şekilde yapılmıştır

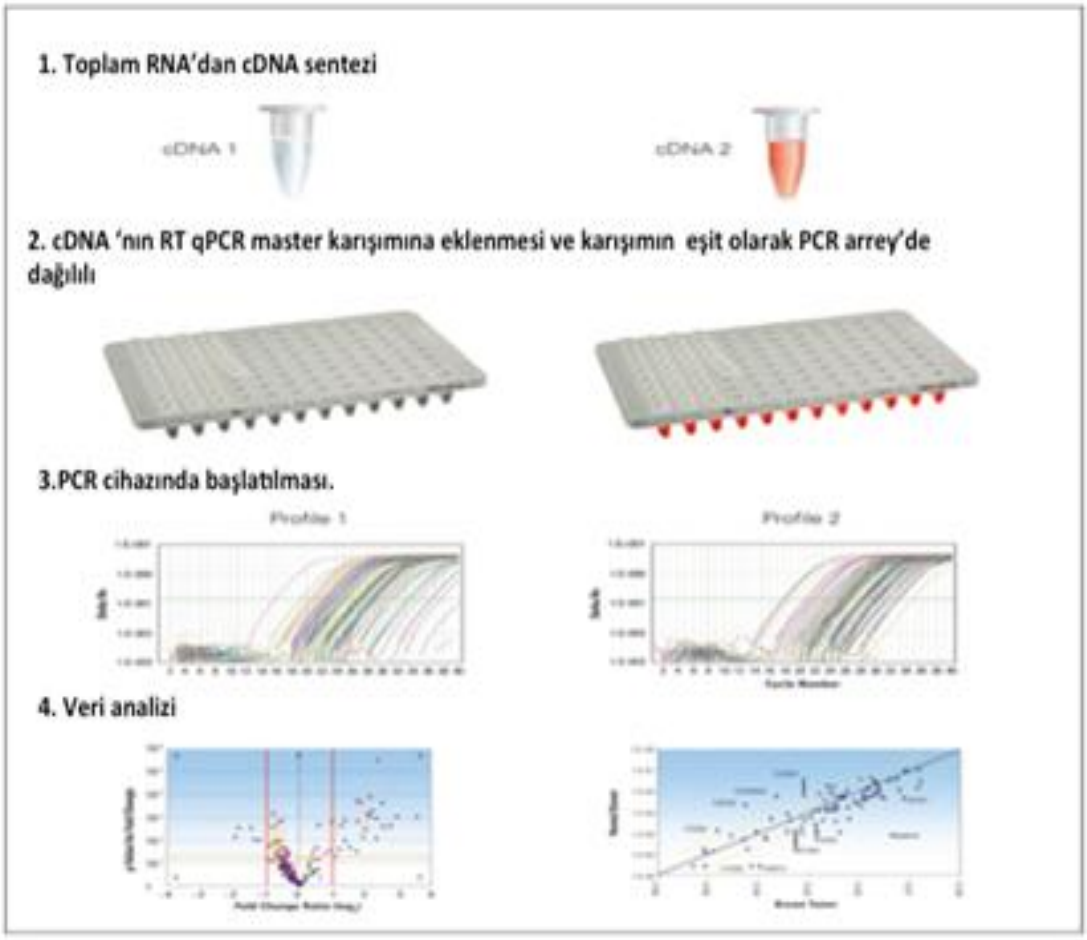
Çizelge 2.5. cDNA sentez protokolü

Master Mix Hazırlanışı:		
Bileşenler	**Hacim**	**Son Konsantrasyon**
Total RNA	Değişken	1000 ng
İscript RT supermix	4µl	60µM
Nuclease free H_2O	Değişken	Son hacim H_2O ile 16 µl'ye tamamlanır.
Toplam Hacim	**20 µl**	
Reaksiyon Protokolü		
Primer Bağlanması	25 ºC'de 5 dk	
Reverse Transkripsiyon	30 ºC'de 42 dk	
RT inaktivasyonu	85C'de 5 dk	

2.2.11. RT² Profiler'ı ™ PCR Dizi Sistemi

PCR Array, 96 kuyucuklu, 384 kuyucuklu pleytte ya da 100 kuyucuklu bir diskte hastalık odaklı genlerin ve yolakların analizinin yanı sıra, uygun bir RNA kalite kontrolü için, optimize gerçek zamanlı PCR deneyleri setidir. PCR Array, gen ekspresyon analizlerini gerçek zamanlı PCR hasasiyeti ve bir mikrodizinin çoklu gen profilleme yeteneği ile gerçekleştirir. Bu yöntemde kullanıma hazır olan master mix ve CDNA örneği ile bir karışım hazırlanır. Bu karışımdan her kuyucuğa eşit miktarda dağıtılır ve gerçek zamanlı PCR programında okutulur. Bu tez çalışmasında hastalardan RNA izole edilerek cDNA sentezi yapılmış ve 88 sitokin geni ile 8 referans genin ifadeleri analiz edilmiştir.

Protokol şekil 2.2'de net bir şekilde açıklanmıştır.



Şekil 2.2. PCR sitokin array protokolü.

PCR Array çalışma protokolü çizelge 2.6'dakini takip ederek yapılmıştır.

Çizelge 2.6. Sitokin PCR array çalışma protokolü

Master Mix Hazırlanışı:	
Bileşenler	**Hacim**
H_2O, PCR-grade	3.8µl
Primer (10xconc) (Forward ve Reverse karışımı)	1 µl
Sybr Green (2xconc)	5 µl
c-DNA	0.2µl
Toplam Hacim 10 µl	

qRT-PCR Programı:

Denatürasyon	95ºC 5 dak
Amplifikasyon	95ºC 10 sn
	58ºC 45 sn45 siklus
	72ºC 30 sn
Erime	95ºC 10 sn
	60ºC 30 sn
	95ºC continuous
Soğuma	40ºC 30 sn

2.2.12. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitive RT-PCR)

Kantitatif eş zamanlı PCR, 10 6 hücre populasyonu içindeki tek bir hücrede ifade edilen gen ifade düzeyini belirleyebilecek kadar hassas bir yöntemdir. qRT-PCR cihazları, her polimeraz zincir reaksiyonu sonunda floresanın tespit edilmesini sağlayan flurometre ve''thermal cycler''dan meydana gelmektedir. Çalışmaya ait floresan veriler qRT-PCR cihazına bağlı bir bilgisayarda toplanmakta ve analiz edilmektedir. Floresan ışıma veren boyalardan SYBR Green I boyası, gen ifadesinin miktar analizinde sıklıkla kullanılan, çift zincirli DNA'nın küçük oluğuna bağlanan floresan bir boyadır. Bu tür boyalar, primer dimerleri, ölgül olmayan PCR ürünleri gibi her çift iplikli DNA molekülüne bağlandığından dolayı özgül değildir. qRT-PCR sonucu oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green I boyası daha PCR ürününe yüksek oranda bağlanmakta ve floserans ışıma artmaktadır. Eşik değerinin üzerinde anlamlı floresan artışı gözlenen ilk döngü sayısına "Eşit Siklus" (Cycle Threshold) veya "Kesişme Noktası" (Cp, crossing point) denilmektedir. qRT-PCR yöntemiyle saptanacak genlerin primerleri''Perl Primer''programı yardımıyla tasarlanmıştır.

Primerler;

Hprt: (hipoksantin guanine fosforibozil transferaz)
Forward: 5'TGACACTGGCAAAACAATGCA
Reverse: 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
FSHR: (folikül stimüle edici hormon reseptörü)
Forward: 5'F-AATGATGTCTTGGAGGTGATAGAG
Reverse: 5'R-ACAGATATTGAAGGTTGGGAAGG
ABP: (androjen bağlayıcı protein)
Forward: 5'F-GATGACTGGTTTATGCTGGGA -3,
Reverse: 5'R-CCCTCCATCTTGACTTCCAC-3

''SYBR Green'' floresans boyası kullanılarak ABP primerinin optimize edildiği sıcaklık olan 60ºC'de ve FSHR primerinin optimize edildiği sıcaklık olan 58ºC'de kantitasyon (qRT-PCR) yapıldı (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.7. qRT-PCR protokolü

Master Mix Hazırlanışı:	
Komponentler	**Hacim**
H_2O, PCR-grade	2µl
Primer (10xconc) (Forward)	0.5 µl
Primer (10xconc) (Reverse)	0.5 µl
Sybr Green (2xconc)	5 µl
c-DNA	2µl
Toplam Hacim 10 µl	

qRT-PCR Programı:

Denatürasyon	95ºC 5 dak
Amplifikasyon	95ºC 30 sn
	60ºC 30 sn 50 siklus
	72ºC 30 sn
Erime	95ºC 10 sn
	65ºC 1 dak
	95ºC continuous
Soğuma	40ºC 10 sn

2.2.13. Sonuçların Değerlendirmesi

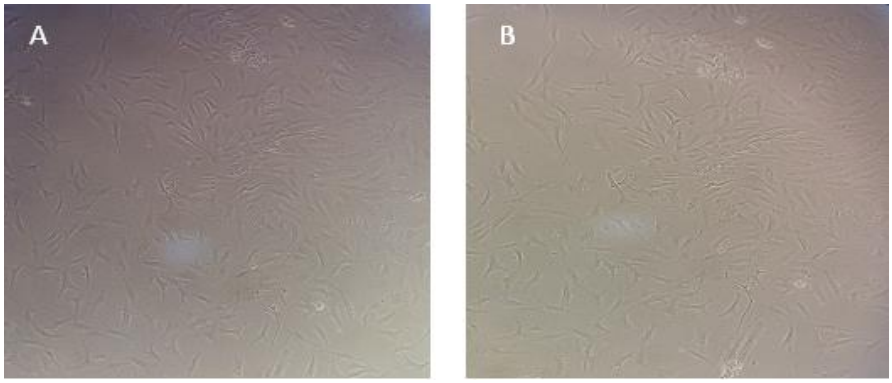
RT-PZR sonucunda bulunan genlerin ek kat artış/azalışları ortalamalarının 1'e karşı test edilmesinde tek örneklem T-testi kullanılıp sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde özetlendi. Ayrıca hastaların gruplar şeklinde toplanan verilerinin analiz

edilmesi amacıyla öncelikle her bir gene ait ölçümler Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile gruplar arasında karşılaştırılıp farklılığı yaratan grupların tespiti amacıyla *post-hoc* çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanıldı. Hasta ve kontrol gruplarına ait ölçümlerin sonuçları ortalama ± standart sapma kullanılarak özetlendi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p<0.05$ alındı.

3. BULGULAR

3.1. PRİMER SERTOLİ HÜCRELERİNİN MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ

Yüksek FSH'li NOA hastaları (YFSH), normal FSH'li NOA hastaları (NFSH) ve OA konrtol grubundan alınan testis dokusu enzimatik parçalandıktan sonra izolasyon protokolü takip edilerek Sertoli hücreleri elde edildi. Kültürü yapılan Sertoli hücrelerinin mikroskop görüntüleri ters bakışlı (inverted) mikroskop yardımıyla kaydedilmiştir. Bu hücrelerin görüntüsü şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1.A-B Primer Sertoli hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (100x)

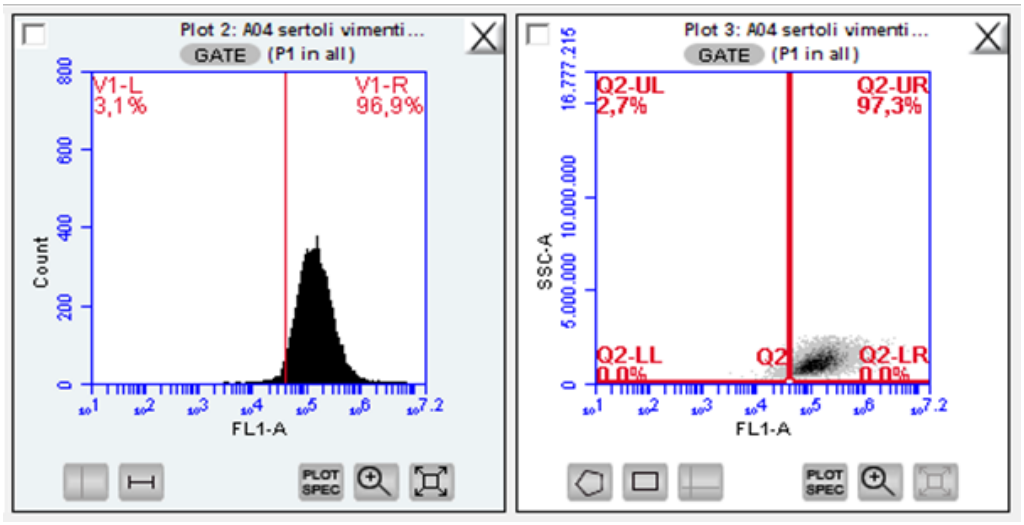
3.2. PRİMER SERTOLİ HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU

Bu iki başlık altında yer alan tüm bu sonuçlar Sertoli hücrelerinin saf bir şekilde izole edildiğini göstermektedir.

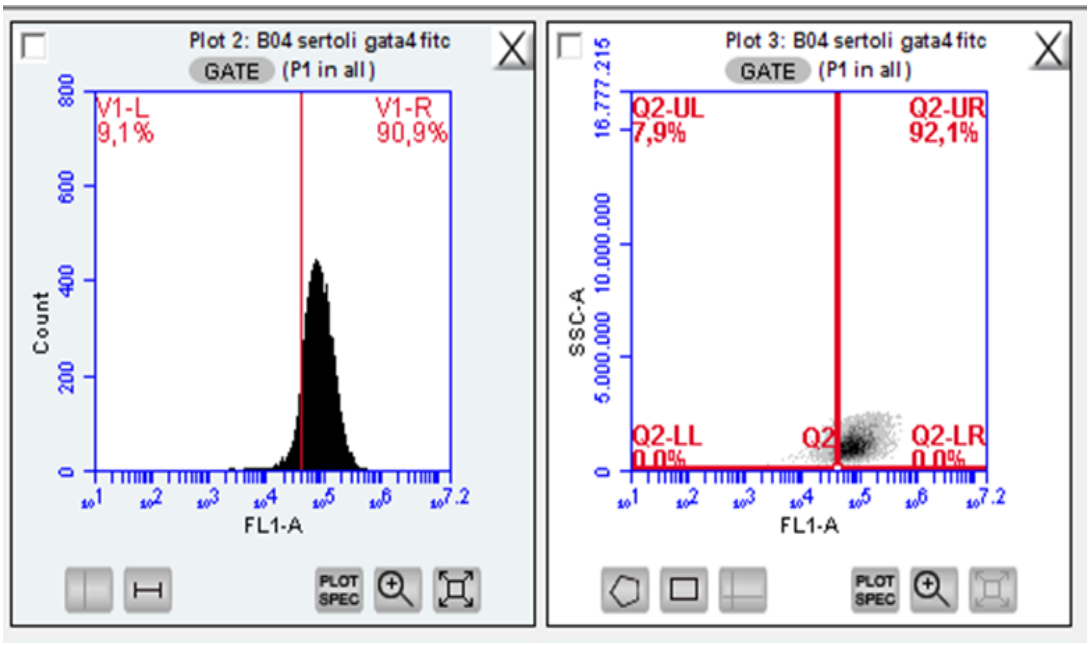
3.2.1. Primer Sertoli hücrelerinin akım sitometri yöntemiyle karakterizasyonu

OA ve NOA testis dokularından elde edilen Sertoli hücrelerinin karakterizasyonu akım sitometri yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntemde Sertoli hücreleri belirteçleri olan Vimentin ve GATA4 proteinleri yöntemiyle özgün antikorlarla boyanmış akım sitometri cihazında sonuçlar yüzde olarak elde edilmiştir. Elde edilen hücrelerin

90%'ından fazlası GATA4 ve vimentin pozitiftir. Şekil 3.2 ve 3.3'de bir hastadan elde edilen Sertoli hücreleri yüzdesi örnek olarak gösterilmiştir.



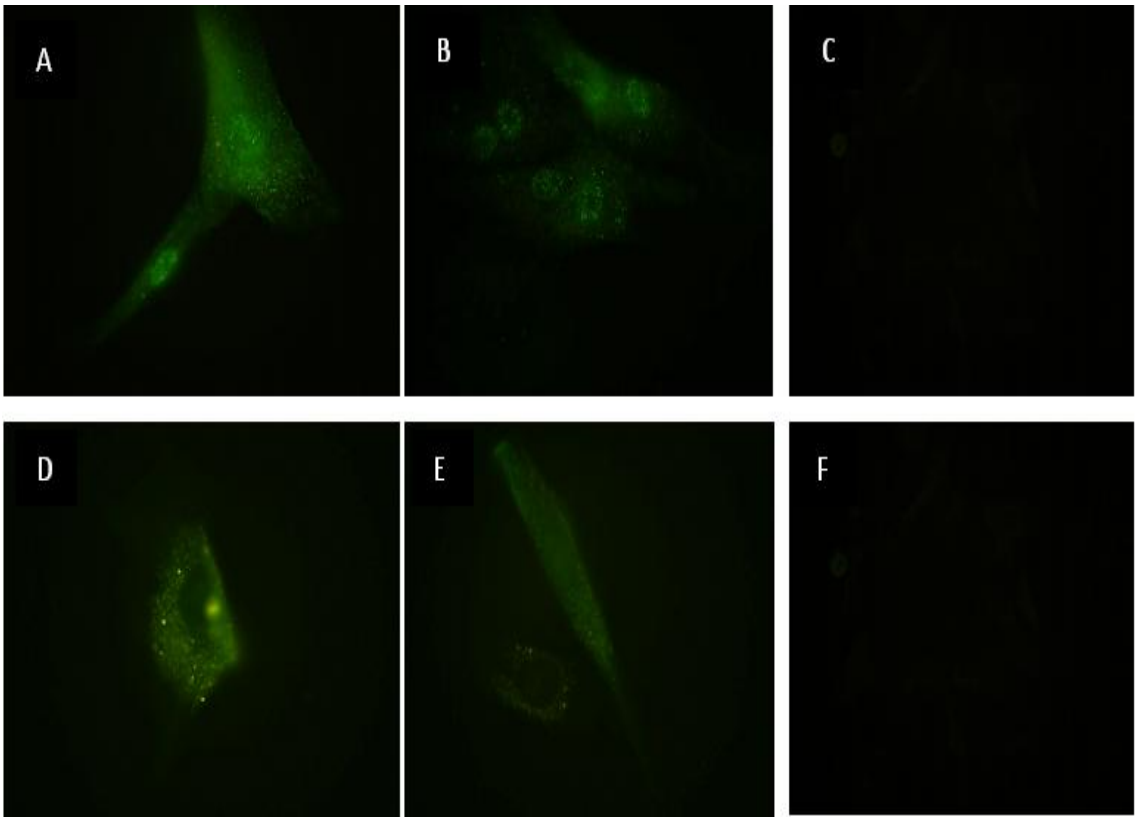
Şekil 3.2. Sertoli hücrelerinde vimentin deteksiyonu için akımsitometri analizi



Şekil 3.3. Sertoli Hücrelerinde GATA4 deteksiyonu için flowcytometry analizi

3.2.2. Primer Sertoli Hücrelerinin immünohistokimyasal yöntemiyle karakterizasyonu:

Vimentin ve GATA4 proteininin Sertoli hücrelerinde ekspresyonu immünohistokimyasal boyama yöntemi ile protein düzeyinde de tespit edilmiştir. Bu yöntemde Sertoli hücrelerinde Vimentin ve GATA4 proteinleri özgün antikorlarla boyandıktan sonra floresan mikroskobu altında incelenmiştir. Bu hücrelerin %90'ından fazlasında Sertoli hücrelerine özgü olan proteinlerin ifade edildiği tespit edilip mikroskobik görüntüsü alınmıştır. Bu görüntü şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Primer Sertoli hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (1000x)

A-B: Gata4, C: Negatif, kontrol, D-E: Vimentin, F: Negatif kontrol

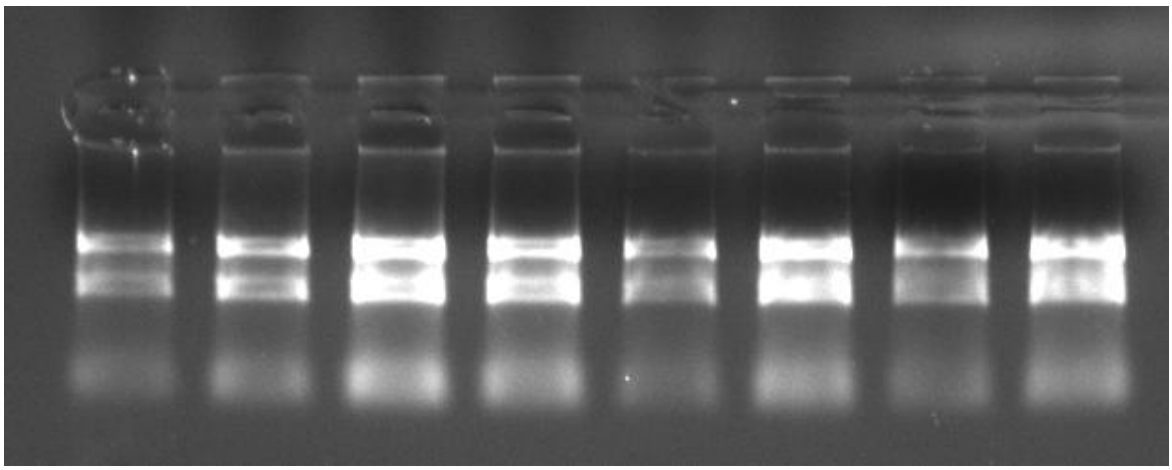
3.3. SERTOLİ HÜCRELERİNDEN RNA İZOLASYONU

Sertoli hücreleri saf bir şekilde izole edildikten sonra her hasta örneğinden izole edilen hücreler iki adet 25 $cm^{2'}$lik flaskta kültüre edilmiştir. Daha sonra FSH

hormonu uygulanmıştır. FSH hormonu uygulanan ve FSH uygulanmayan Sertoli hücrelerinden total mRNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların spektrofotomektik ölçüm sonuçlarından bir kaç örnek çizelge 3.1'de ve %1'likagaroz jel görüntülerinin bir kaç örneği şekil 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. RNA bütünlük ve miktar tayinleri

Örnek no	RNA miktarı FSH öncesi	RNA miktarı FSH sonrası	Örnek no	RNA miktarı FSH öncesi	RNA miktarı FSH sonrası
1.	240	153.507	1.	73.917	117.896
2.	93.837	77.517	2.	109.143	102.995
3.	74.642	68.524	3.	44.054	35.732
4.	104.263	70.046	4.	254.921	141.303



Şekil 3.5. İzole edilen RNA'larin elektroforez görüntüsü

3.4. SİTOKİN PCR ARRAY BULGULARI

Elde edilen NOA hastaları ve OA kontrol grubu her biri farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerinden başlangıç miktarı 1000 ng olacak şekilde cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi yapıldıktan sonra bu cDNA'larda Sitokin PCR Array kullanılarak 88 farklı sitokinlerin ve 8 referans geninin qRT-PCR analizi sonucunda her bir örnek için Cp (Crossing point) değeri oluşturulup bu değerler kat artışları şeklinde kaydedilmiş ve anlamlı ifade edilen genlerin kat artış değerleri grafiğe dökülmüştür.

Gen ifade oranlarının hesaplanmasında;

$$R = \frac{(E_{Hedef})^{\Delta CP_{Hedef}(Kontrol - Örnek)}}{(E_{Ref})^{\Delta CP_{Ref}(Kontrol - Örnek)}}$$

formülü kullanılmıştır. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları log2 tabanına çevrilmiştir (R: Oran, E: Ekspresyon, Ref: Referans, CP: Kesişme Noktası) (Pfaffl 2001).

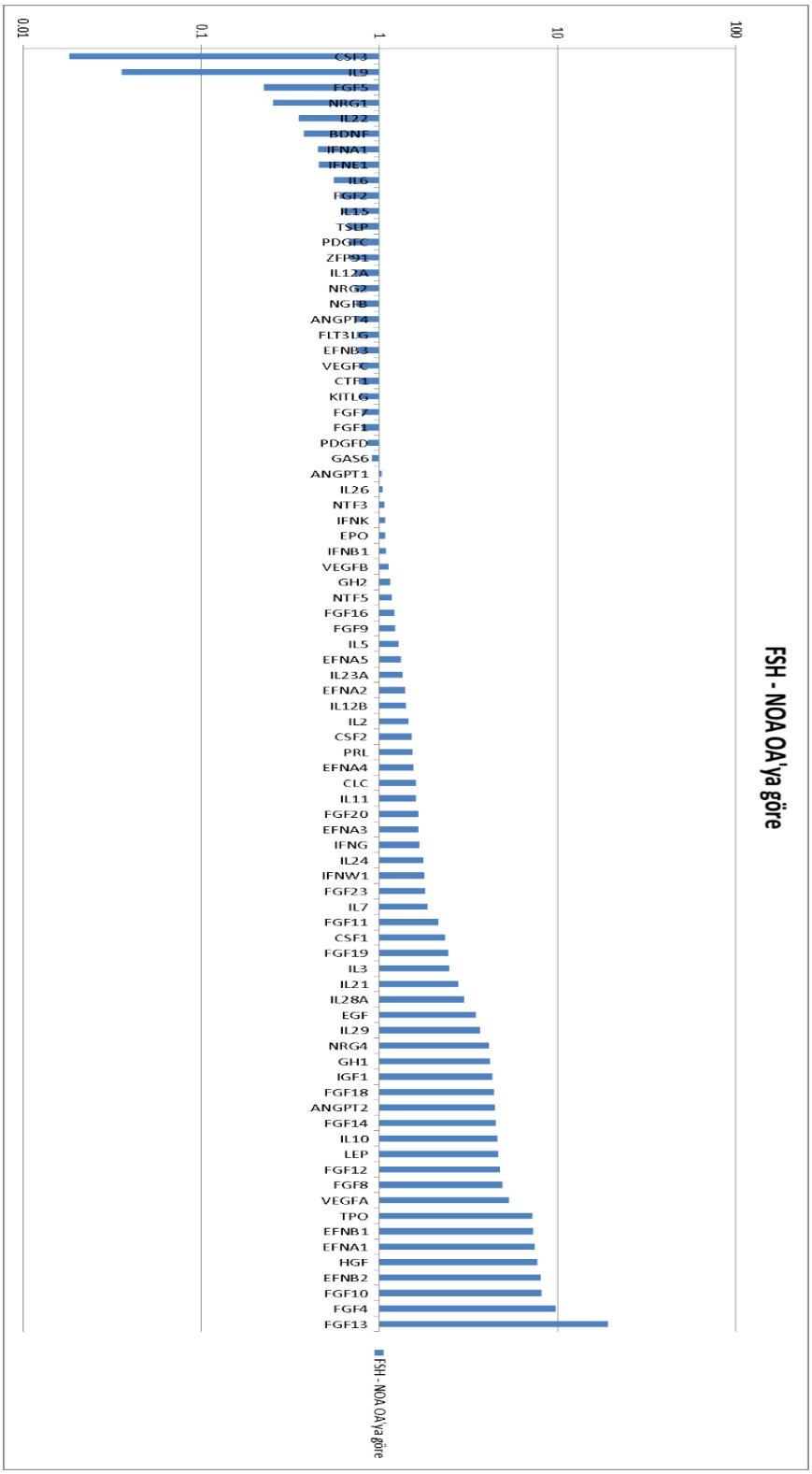
3.4.1. FSH Uygulanmadan Önce (FSH-) ve Sonra (FSH+) Sitokin PCR Array Bulguları

FSH uygulanmadan önce ve sonra sitokin ifade seviyeleri hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmış olup bunun sonucunda iki grup arasında gen ifade farklılıkları ortaya çıkmıştır.

3.4.1.1. FSH- NOA hastaların OA kontrol grubuna göre genlerindeki kat değişimleri

İki grup NOA hastası birleştirilerek (Serum FSH düzeyi yüksek olan NOA hastalarları ve serum FSH düzeyi normal olan NOA hastalar), OA kontrol grubuna göre sitokin gen ifade seviyesi açısından karşılaştırılmıştır. Çizelge 3.2'de 88 farklı sitokine ait olan gen ifade seviyesi hasta grubunda kontrol grubuna göre gösterilmiştir.

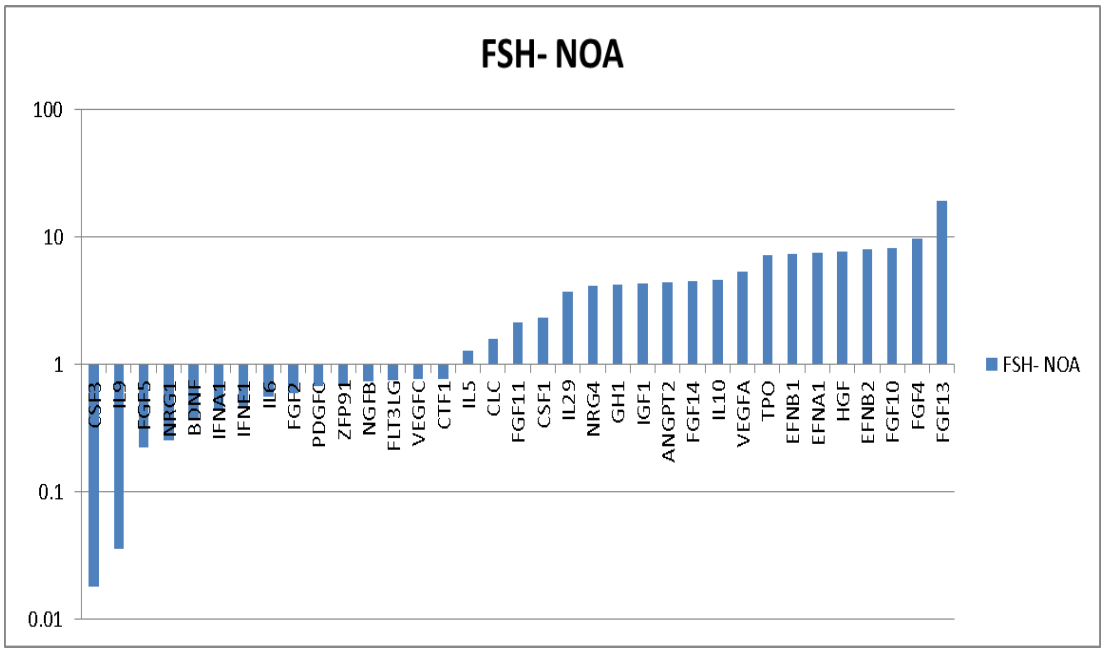
Çizelge 3.2. FSH- NOA hastaların OA kontrol grubuna göre genlerindeki kat değişimleri -



3.4.1.2. FSH- NOA hastaların kontrol grubuna göreanlamlıdeğişiklik gösteren genlerindeki kat değişimleri

NOA hastalarıyla kontrol grubunu gen ifade seviyesi açısından kıyasladığımızda bazı genlerin NOA hastasında kontrol grubuna göre ifade seviyesi istatistik olarak anlamlı değişmiştir ($p<0.05$). Ancak bazı diğer genlerin ifadesi de hasta grubunda kontrol grubuna göre 5 kattan fazla değişiklik göstermiştir. Hasta grubunda kontrol grubuna göre bazı genlerin ifadesinde artış ve bazı genlerin ifade seviyelerinde azalış gözlenmiştir. Bu genler çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. FSH- NOA hastaların kontrol grubuna göreanlamlıdeğişiklik gösteren genlerindeki kat değişimleri

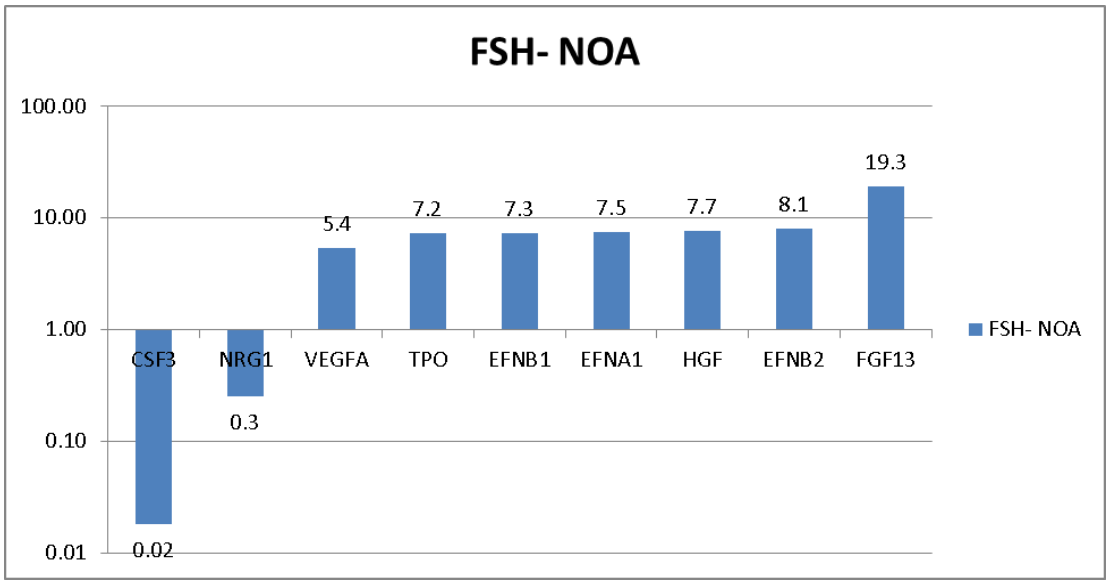


3.4.1.3. FSH- NOA hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerindeki kat değişimleri

Hasta grubunda kontrol grubuna göre bazı anlamlı değişiklik gösteren genler arasından özellikle spermatogenezde ve infertilitede önemlirol oynayan FGF13 (19.3 kat, $p<0.05$), EFNB2 (8.1), EFNA1 (7.5; $p<0.05$), HGF (7.7; $p<0.05$), EFNB1 (7.3), TPO (7.2), VEGFA (5.4), NRG1 (0.3; $p<0.05$) ve CSF3 (0.2; $p<0.05$) genleri çizelge

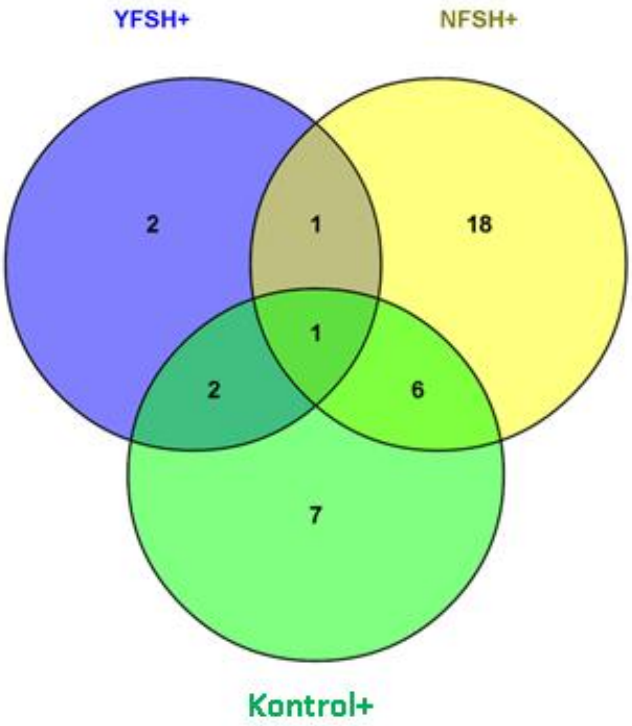
3.4'te gösterilmiştir. Bu genlerin hastalarda kontrol grubuna göre farklı ifade seviyesinden dolayı infertiliteye yol açabilmeleri düşünülmektedir ($p<0.05$).

Çizelge 3.4. FSH- NOA hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerin kat değişimleri



3.4.1.4. FSH uyguladıktan sonra grupların gen ifade profilleri

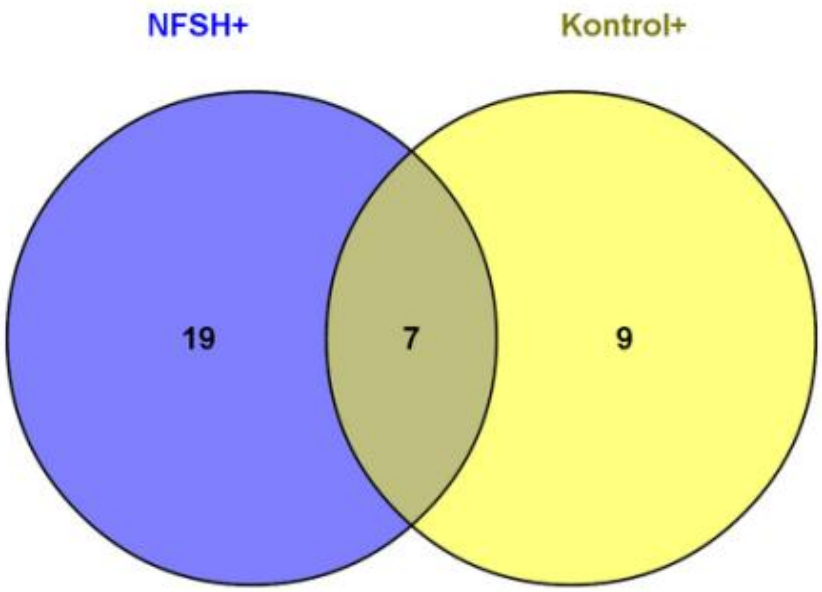
Her üç gruba (YFSH, NFSH ve kontrol grubu) FSH uygulandı ve FSH uygulandıktan sonra gen ifade profilleri FSH öncesine göre kıyaslandı. Sonuçlara göre kontrol grubu ve normal FSH'li hasta grubunda FSH uygulandıktan sonra fazla sayıda genlerin ifade seviyesi değişirken yüksek FSH'li hasta grubunda çok az sayıda genin ifade seviyesinde anlamlı değişiklik bulunmuştur. Bu da yüksek FSH'li hastaların FSH'ye yanıt vermediklerini göstermektedir. Şekil 3.6'da her üç gruptaki ifade değişikliği FSH uygulandıktan sonra Venn diagramında göstermiştir. Bu şekilde artan ve azalan genlerin sayısı her gruba ait bir alanda ve ortak artan ve azalan genler de ortak bir alanda gösterilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 3.6. FSH uyguladıktan sonra grupların gen ifade profilleri

3.4.1.5. Normal FSH'li hasta grubu ve kontrol grubunun ifade profilleri

Normal FSH'li hastaların gen ekspresyon profilindeki imza kontrollerle aynı olduğu için normal FSH'li hastalar kontrol grubuyla anlamlı değişiklik gösteren genler açısından karşılaştırılması amacıyla çalışmaya yalnız normal FSH'li hastalar dahil edilerek devam edilmiştir. Şekil 3.7'de normal FSH'li hasta grubu ve kontrol grubununda artış veya azalış gösteren genlerin sayısı gösterilmiştir. Bu şekilde göründüğü gibi her iki grupta fazla sayıda genin ifade seviyesinde değişiklik saptanmıştır ($p<0.05$).

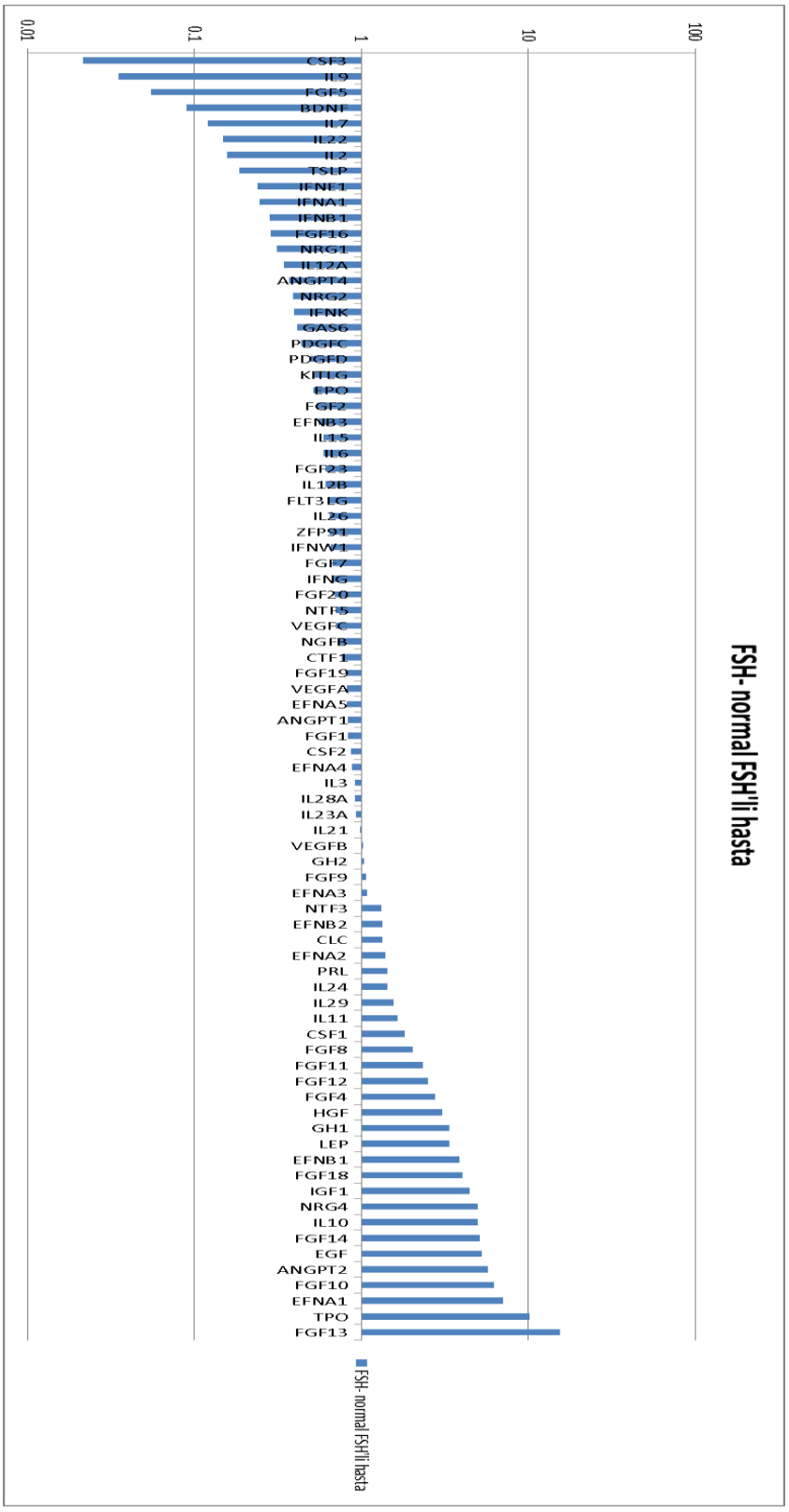


Şekil 3.7. Normal FSH'li hasta grubu ve kontrol grubunun ifade profilleri

3.4.1.6. FSH - normal FSH'li hasta grubunun kontrol grubuna göre gen ifade profilleri

Normal FSH'li hastaların gen ekspresyon profilindeki imza kontrollerle aynı olduğu için normal FSH'li hastalar kontrol grubuyla ifade değişikliği gösteren genler açısından karşılaştırılmıştır. Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi her iki grup FSH uygulanmadan önce sitokin genlerin ifade seviyesi açısından karşılaştırıldığında, bu genlerin ifadesi iki grup arasında farklılık göstermiştir.

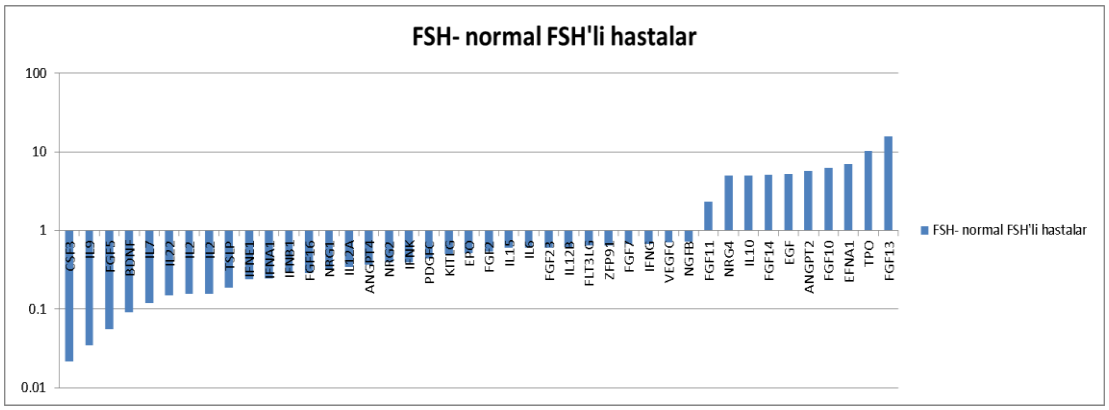
Çizelge 3.5. FSH - normal FSH'li hasta grubunun kontrol grubuna göre gen ifade profilleri



3.4.1.7. FSH- normal FSH'li hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren genlerindeki kat değişimleri

Normal FSH'li hastalarıyla kontrol grubunu gen ifade seviyesi açısından kıyasladığımızda bazı genlerin hasta grubunda kontrol grubuna göre ifade seviyesi istatistik olarak anlamlı değişmiştir ($p<0.05$). Ancak bazı diğer genlerin ifadesi de hasta grubunda kontrol grubuna göre 5 kattan fazla değişiklik göstermiştir. Hasta grubunda kontrol grubuna göre bazı genlerin ifadesinde artış ve bazı genlerin ifade seviyelerinde azalış gözlenmiştir. Bu genler çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

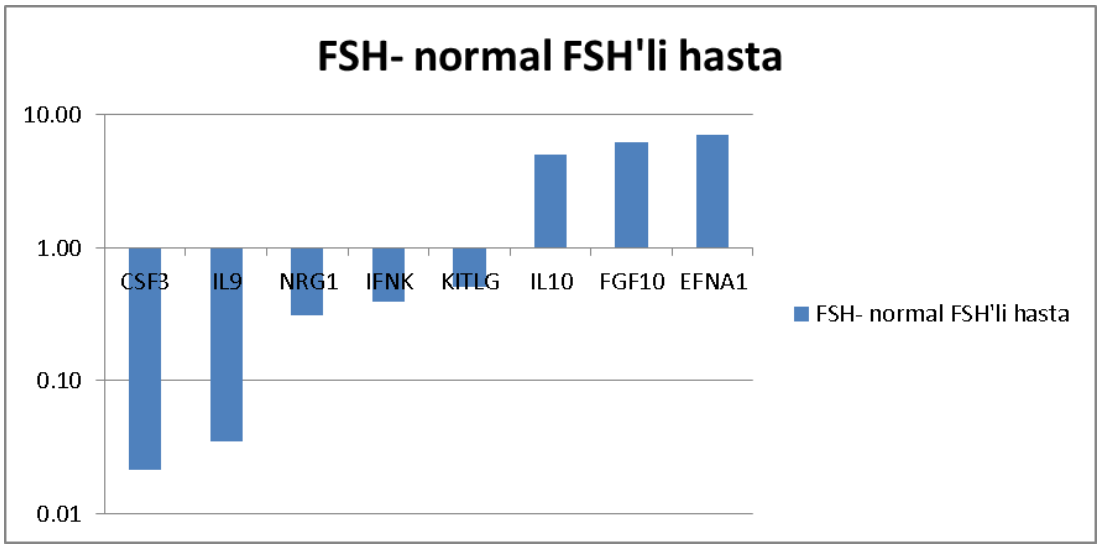
Çizelge 3.6. FSH- NFSH hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren genlerindeki kat değişimleri



3.4.1.8. FSH- normal FSH'li hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerindeki kat değişimleri

Normal FSH'li hasta grubunda kontrol grubuna göre bazı anlamlı değişiklik gösteren genler arasından, özellikle spermatogenezde ve infertilitede önemlirol oynayan EFNA1 (7 kat; $p<0.05$), KİTLG (0.5 kat; $p<0.05$), NRG1 (0.3 kat; $p<0.05$), İFNK (0.4 kat; $p<0.05$), FGF10 (6.2 kat; $p<0.05$), CSF3 (0.02 kat; $p<0.05$), İL10 (5 kat) ve İL9 (0.03 kat; $p<0.05$) genleri çizelge 3.7'de gösterilmiştir. Bu genlerin hastalarda kontrol grubuna göre farklı ifade seviyesindn dolayı infertiliteye yol açabilmeleri düşünülmektedir ($p<0.05$).

Çizelge 3.7. FSH- NFSH hastaların kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerindeki kat değişimleri



3.4.1.9. FSH- ve FSH+ normal FSH'li hastaların gen ifade profilleri

Hücrelere FSH uygulandıktan sonra normal FSH'li hastaların sitokin ifadelerinde kontrol grubuna göre değişiklikler görülmüştür. Bazı genlerin ifadesinde artış ve bazı diğer genlerin ifade seviyesinde azalma gözlenmiştir. Bu genlerin ifade değişikliklerini FSH tedavisinin etkili olup olmadığı açısından incelemek için FSH- ve FSH+ normal FSH'lı hastaların gen ifade seviyeleri kontrol grubuna göre çizelge 3.8'de grafiğe dökülmüştür.

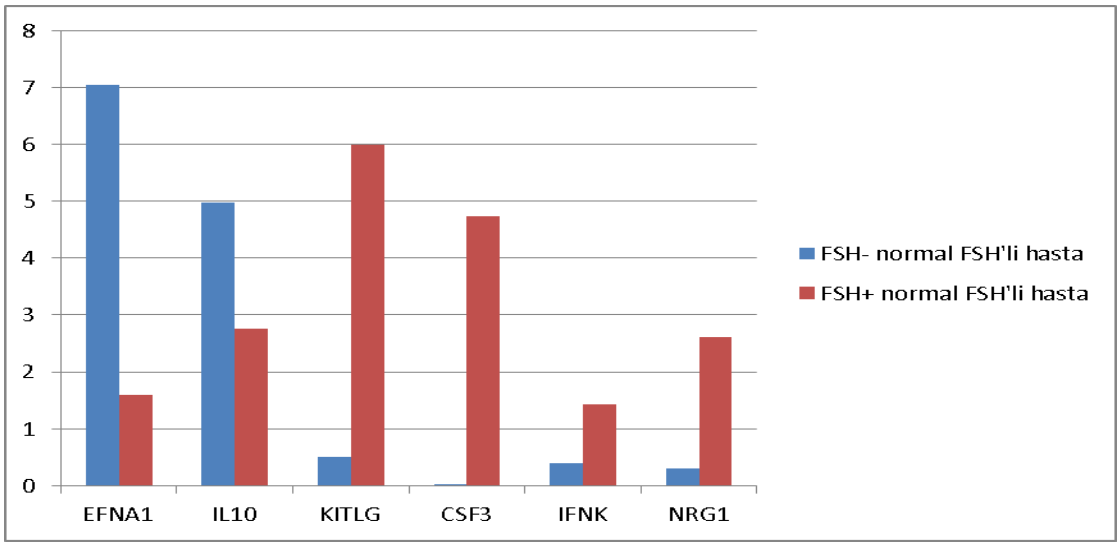
Çizelge 3.8. FSH- ve FSH+ normal FSH'li hastaların gen ifade profilleri



3.4.1.10. FSH- ve FSH+ NFSH hastaların anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerin kat değişimi

Normal FSH'li hastaların FSH uygulanmadan önce kontrol grubuna göre bazı genlerinde anlamlı değişiklikler daha önce gösterilmiştir. Bu değişiklikler çizelge 3.9'da mavi çubuklarla gösterilmektedir. Ancak FSH uygulandıktan sonraki genlerin kat değişimleri kırmızı çubuklarla gösterilmiştir. Bu çizelgeyi incelediğimizde FSH uygulanmadan önce anlamlı artış gösteren EFNA1 ve İL10 genlerinde FSH uygulandıktan sonra azalma saptanmıştır. Ayrıca FSH uygulanmadan önce anlamlı azalış gösteren KİTLG, CSF3, İFNK ve NRG1 genlerinde FSH uygulandıktan sonra anlamlı artış saptanmıştır.

Çizelge 3.9. FSH- ve FSH+ NFSH hastaların anlamlı değişiklik gösteren önemli genlerin kat değişimi

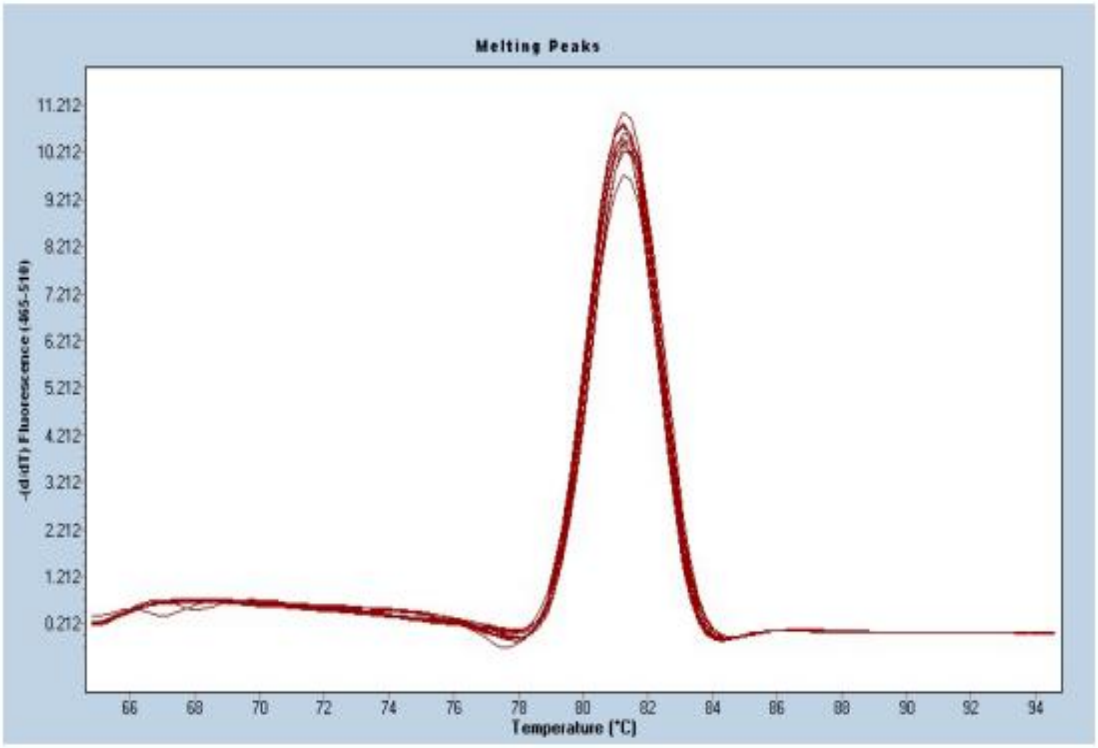


3.5. EŞ ZAMANLI PCR (REAL TİME PCR, QRT-PCR) BULGULARI

Her biri farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerden başlangıç miktarı 1000 ng olacak şekilde cDNA sentezi yapılmıştır.

Hprt geni (Gardiyan gen) ve FSHR ve ABP genlerin (hedef genler)optimizasyonu için yapılan PCR'ların ardından, eldeedilen cDNA'lar ile qRT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.qRT-PCR analizi sonucundaherbirörnekiçinüçadetCp (Crossing point) değeri oluşturulup bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

HerqRT-PCR analizinin ardından, çoğaltılan bölgenin istenilen hedef bölge olupolmadığınıanlayabilmekiçinerimeeğrisianalizleriyapılmıştır. Şekil 3.8'de Hprt genine ait erime eğrisi grafikleri görülmektedir.



Şekil 3.8. HPRT geni erime eğrisi

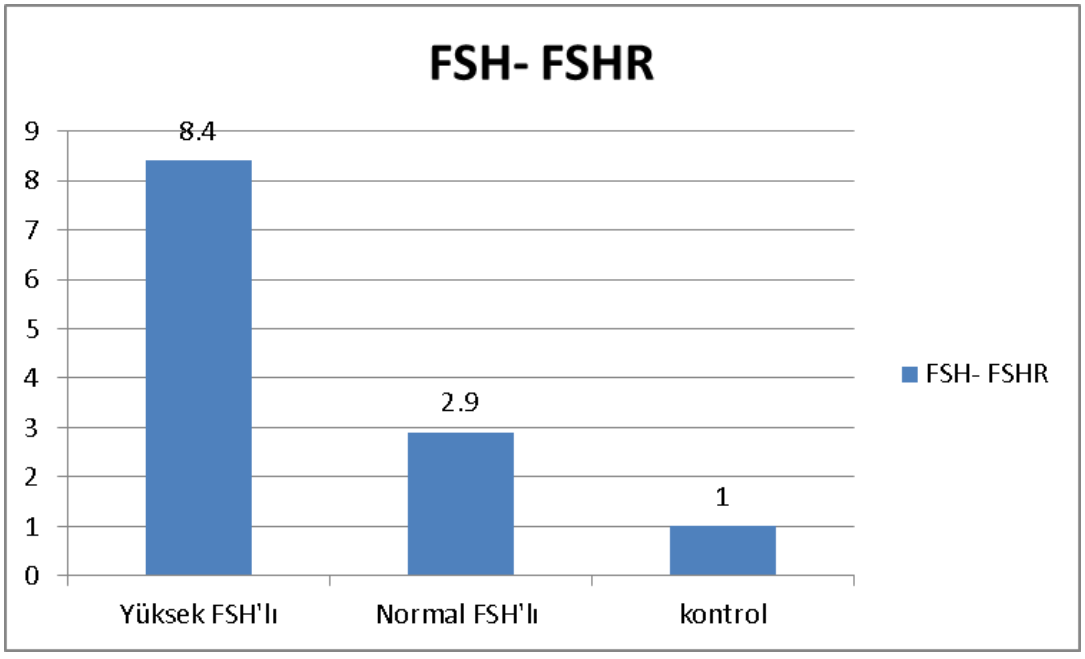
FSH etkisini YFSH, NFSH ve kontrol grubunda incelemek için bu gruplarda, FSHR ve ABP ifade seviyeleri uygulanmadan önce (FSH-) ve sonra (FSH+) gerçek zamanlı pcr ile tespit edilmiştir.

3.5.1. FSH- YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının FSHR geninde ifade farklılıkları

FSH uygulanmadan önce her üç grup FSHR gen ifade seviyesi açısından karşılaştırılmıştır.

FSHR'nin bazal seviyesi yüksek FSH'li hastalarda kontrol grubuna göre 8.4 kat ve normal FSH'li hastalarda kontrol grubuna göre 2.9 kat yüksektir. Bu dabu hastaların FSHR geninde kontrol grubuna göre daha fazla ifade edildiğini göstermektedir. Bu genin her üç grup arasında ifade farklılıkları çizelge 3.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. FSH- YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının FSHR geninde ifade farklılıkları

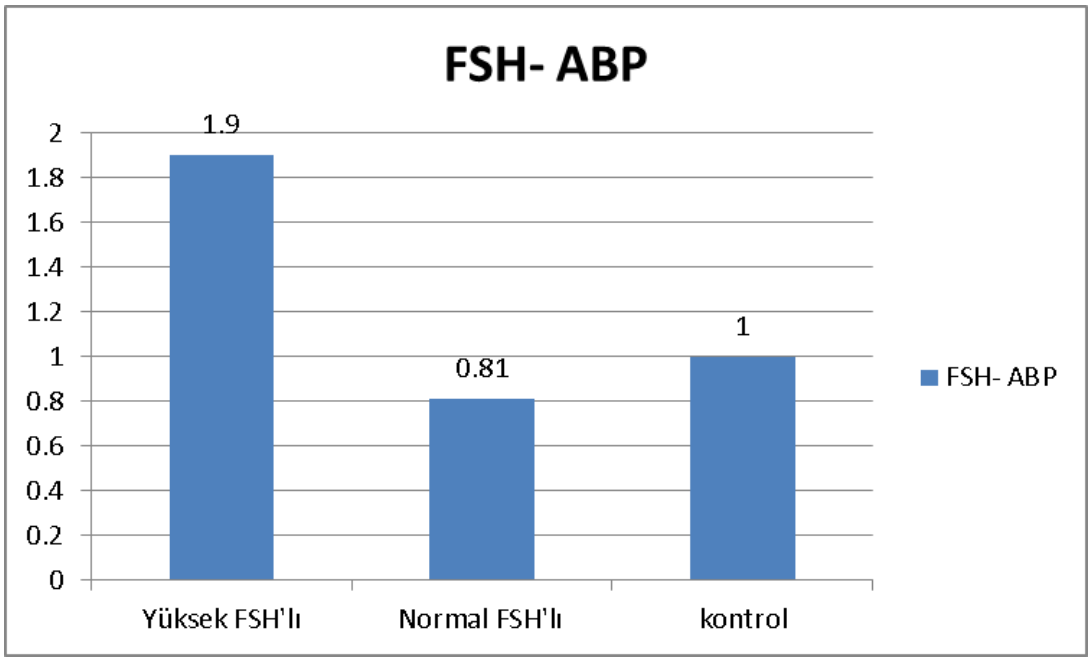


3.5.2. FSH- YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının ABP geninde ifade farklılıkları

FSH uygulanmadan önce her üç grup ABP gen ifade seviyesi açısından karşılaştırılmıştır.

ABP'in bazal seviyesi yüksek FSH'li hastalarda kontrol grubuna göre 1.9 kat ve normal FSH'li hastalarda kontrol grubuna göre 0.81 kat değişiklik göstermektedir. Bu genin her üç grup arasında ifade farklılıkları çizelge 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. FSH- YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının ABP geninde ifade farklılıkları

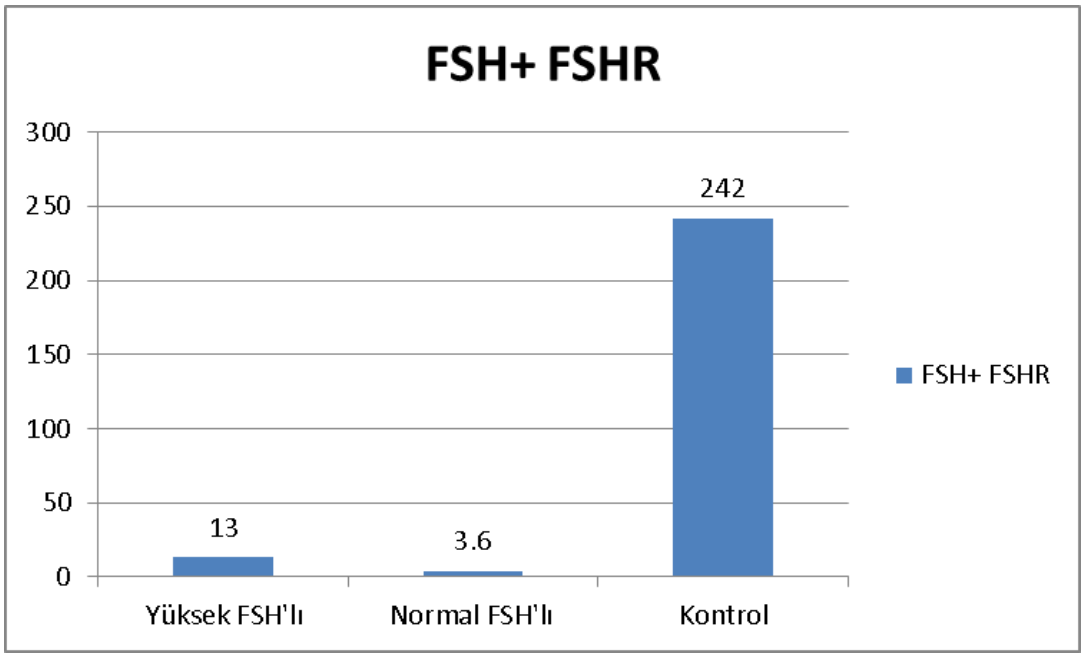


3.5.3. FSH + YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının FSHR geninde ifade değişimleri

FSH uygulandıktan sonra her üç grup FSHR gen ifade seviyesi açısından karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuna FSH uygulandıktan sonra FSHR'ün ifade seviyesi 242 kat artmışken, bu artış yüksek FSH'li hastalarda 13 kat olarak ve normal FSH'li hastalarda 3.6 kat olarak saptanmıştır. Bu da kontrol grubunun FSH'ya yanıt olarak FSHR ifadesinde bir sorun olmadığını göstermektedir. ancak FSHR diğer iki grupta kontrol grubuna göre daha az seviyede ifade edilmektedir. Bu genin FSH uygulandıktan sonra her üç grupta ifade değişiklikleri çizelge 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. FSH + YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının FSHR geninde ifade değişimleri

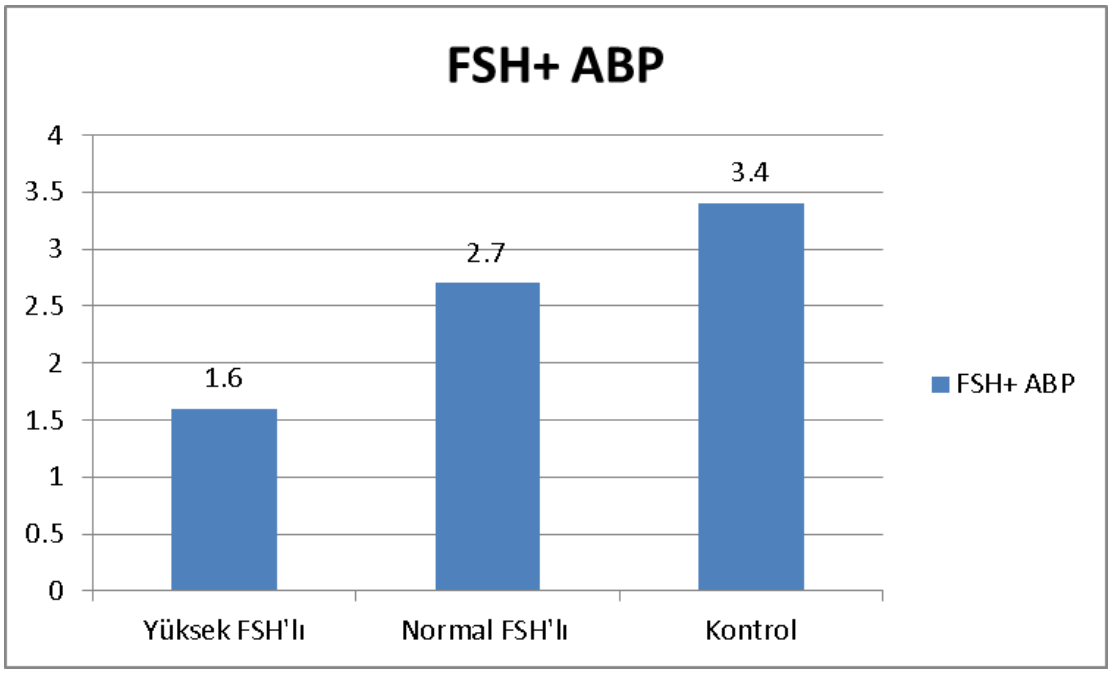


3.5.4. FSH + YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının ABP geninde ifade değişimleri

FSH uygulandıktan sonra her üç grup ABP gen ifade seviyesi açısından karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuna FSH uygulandıktan sonra ABP'in ifade seviyesi 3.4 kat artmışken, bu artış normal FSH'li hastalarda 2.7 kat olarak ve yüksek FSH'li hastalarda 1.6 kat olarak saptanmıştır. Bu da kontrol grubu ve normal FSH'li hasta grubunun FSH'ya yanıt olarak ABP ifadesinde bir sorun olmadığını göstermektedir. Ancak ABP yüksek FSH'li hasta grubunda diğer iki gruba göre daha az seviyede ifade edilmektedir. Bu da yüksek FSH'li hastalarında FSH'ya yanıt olarak üretilen FSHR'ün fonksiyonel olmadığını göstermektedir. Bu genin FSH uygulandıktan sonra her üç grupta ifade değişiklikleri çizelge 3.13'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.13. FSH + YFSH, NFSH ve kontrol gruplarının ABP geninde ifade değişimleri



TARTIŞMA

FSH tedavisinin kadın infertilitesindeki gibi rutin uygulaması kabul edilmemiş olmasına karşın, bazı erkek infertilite tanısı konmuş hastalarda başarılı olduğu ile ilgili çok sayıda çalışma ve çok sayıda bunu savunan ve uygulayan androlog vardır (Foresta ve ark, 2005; Özgök ve ark, 2011). Erkek infertilite tedavisinde FSH uygulaması tartışmalı bir konudur, yararını savunanlar olduğu gibi yararsız olduğunu savunan görüş ve çalışmalar da literatürde mevcuttur. Bu tez çalışmasında hipotezimiz; NOA'ye bağlı erkek infertilitesi tedavisinde kullanılan FSH hormonunun Sertoli hücrelerinde sitokin profillerini değiştirerek etki ettiği, FSH hormonuna bağlı FSHR'ünün bazı NOA hastalarında kontrol grubuna göre eksik ifade edildiği ve bu nedenle FSH'nın bu hastalarda tedaviye olumlu katkısının olmadığıdır.

Normal spermatogenez somatik hücreler ve somatik hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörleri ve sitokinlerden oluşan bir mikro çevre gerektirir (Meng ve ark, 2013). Seminifer epitelin bazal membranından lümene doğru uzayan ve seminifer tübülde bulunan tek somatik hücre olarak tanımlanan Sertoli hücreleri, spermatogenezin düzenlemesinde ve spermatogenez oranlarının değiştirmesinde temel bir rol oynamaktadır (de Rooij, 2009). Bu hücreler FSH ve testosteron gibi faktörler tarafından gelen endokrin ve parakrin uyarıya yanıt olarak, büyüme faktörleri ve sitokinleri üreterek parakrin regülasyonunu ve germ hücrelerin diferansiyasyonu için yapısal destek sağlamaktadırlar (Griswold, 1998; de Rooij, 2009). Aynı zamanda bu hücreler geçirimsiz ve immünolojik bir bariyer oluşturarak spermatogenez sırasında germ hücrelerini korurlar (Jegou, 1992).

Erkek faktörü infertilitesi etyolojisinin ve tedavi yöntemlerinin araştırılması için Sertoli hücreleri birçok çalışmada hayvan modellerinde ve insan testis dokusundan alınarak *in vitro* ortamda çalışılmıştır.

Meng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Sertoli hücreleri NOA ve OA hastaların testis dokularından elde edilip bu hücrelerin morfolojileri, yapıları ve biyokimyasal fenotipleri karşılaştırılmıştır ve bunun sonucunda NOA erkek infertilite etyolojisinin daha iyi anlaşılması ve yeni tedavilerin geliştirilmesi için yeni bakış açıları sunulmuştur (Meng ve ark, 2013). Ayrıca, spermatogoniumlarda mayoz bölünmesini indüklemek ve bunun sonucunda haploid hücreler elde etmek için NOA hastalarının TESE örneklerinden elde edilen öncü germ hücrelerinin Sertoli hücreleri ile birlikte kültüre edildiği çalışmalarda, Sertoli hücrelerinin NOA hastaları tedavisinde kullanılmasının yararlı olabileceği ortaya konulmuştur (Riboldi ve ark, 2012).

Bu tez çalışmasında da erkek infertilite etyolojisinin ve tedavi yöntemlerinin araştırılması için Sertoli hücreleri NOA ve OA hastaların TESE örneklerinden izole edilmiştir. Ancak Sertoli hücrelerin saf populasyonunun elde edilmesinin tespiti için bu hücrelerin izole edildikten sonra karakterizasyonu gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda Sertoli hücrelerin karakterizasyonu bu hücreler izole edildikten sonra özgün belirteçlerle gerçekleşmiştir. Riboldi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Sertoli hücreleri NOA hastaların TESE örneklerinden izole edildikten sonra imünsitokimyasal boyama ile vimentin ve GATA4 proteinlerin ekspresyonu bu hücrelerde gösterilmiştir (Riboldi ve ark, 2012). Benzer şekilde, diğer *in vitro* matürasyon çalışmasında da Sertoli hücreleri bir hayvan modelinden elde edilip bu hücrelerde vimentinin ifadesinin tespiti, Sertoli hücrelerine özgü olan vimentin antikoru ve primeri kullanılarak, imünsitokimyasal ve kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemiyle yapılmıştır (Pramod ve ark, 2014). Başka çalışmalarda da vimentin Sertoli hücre belirteci olarak kullanılmıştır (E Guizabal ve ark, 2011; Kato ve ark, 2014). Yaptığımız bu tez çalışmasında Sertoli hücreleri NOA ve OA hastaların TESE örneklerinden izole edildikten sonra bu hücrelerde vimentin ve GATA4 proteini floresan işaretlenerek boyanıp akım sitometri ve immünsitokimyasal yöntemiyle tespit edilmiştir.

Post-testiküler tıkanıklık veya OA hastalarda spermatogenez normaldir ancak seminal kanallarda tıkanıklığa bağlı azoospermi veya retrograd ejakülasyon söz

konusudur (Jarvi ve ark, 2010; Elzanaty, 2013). Spermatogenez yokluğu veya NOA ise testiküler yetmezlikten kaynaklanmaktadır. Bu durumda testis, olgun spermatozoadan tamamen yoksundur (Elzanaty, 2013). Bu nedenle NOA'lı vaka tedavisi, infertil erkek tedavilerinin en zorlu alt kümesini oluşturur. Bu hastalar fertil erkeklerle karşılaştırıldığında, genellikle artmış FSH düzeyi, azalmış serum testesteronu ve testis hacminde küçülmeye sahiplerdir. Biyolojik gebeliği başlatmak için bu hastalarda genellikle testis dokusundan veya nadir olarak ejakulattan alınan sperm kullanılarak, IVF ve ICSI'ye ihtiyaç duyulmaktadır (Schlegel ve ark, 1997).

Kadın infertilitesi tedavisinde FSH uygulanması etkin bir tedavi yöntemi olarak klinikte kullanılmaktadır. NOA infertil erkeklerin tedavisinde de FSH uygulanması sonucunda sperm üretiminin ve gebelik oranının önemli ölçüde arttırılabilirliği son yapılan araştırmalarda, tartışmalı olsa bile gösterilmiştir. Bartoov ve arkadaşları, rekombinant FSH (rFSH) ve insan koryonik gonadotropin (hCG) tedavisini şiddetli testiküler yetmezliği bulunan hastalarda kullanmış, neticede yüksek FSH plazma konsantrasyonları bastırıldıktan sonra seminal parametreler ve gebelik oranı üzerinden değerlendirmişlerdir. Bu kontrollü, randomize klinik çalışma sonuçlarının gösterdiği gibi şiddetli erkek faktörü infertilitesinde doğal FSH hormonu bastırıldıktan sonra dışarıdan verilen sağlıklı rFSH hormonu ile sperm parametreleri düzelebilmektedir. Ağır bozukluk taşıyan testis durumlarında erkek infertilitesinin rasyonel tedavisinde sıklıkla başvurulan yardımcı üreme tekniklerinin yanı sıra bu çalışmamedikal tedavilerin de geliştirilmesi bakımından yol gösterici nitelikte görülmüştür (Bartoov ve ark, 1994).

Foresta ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada FSH tedavisinin oligozoospermik hastalarda sperm üretiminin gelişmesinde faydalı olacağı gösterilmiştir. Ancak germ hücre popülasyonu azalmasının nedeni sadece spermatogenetik değişiklikler olduğu durumda ve FSH'nın plasmada normal düzeyde bulunduğu taktirde, bu tedavi yöntemi sperm üretiminde etkili rol oynayabilmektedir. Çünkü yüksek FSH plazma seviyelerinin varlığı Sertoli hücrelerinin FSH uyarısına duyarsızlığını net bir indeks gibi gösterebilmektedir. Ancak testiste matürite bozuklukları olduğu zaman FSH tedavisi etki etmemektedir.

Dolayısıyla, bozukluk nedeni belirlenmediği zaman bu hormonal parametreler prediktif değer taşımazlar (Foresta ve ark, 2000). Başka bir çalışmada da tedavi olan infertil erkekler tedavi olmayan infertil erkeklerle karşılaştırıldığında üç ay boyunca gonadotropin tedavisi sonucunda anlamlı olarak yüksek gebelik oranları gösterilmiştir (Attia ve ark, 2007). Benzer çalışmalarda da normal plazma FSH ve inhibin B seviyesi bulunan infertil erkeklerde rFSH hormonu uyguladıktan sonra spermatosit ve spermatogonyumların yüzdesinde ve bunun sonucunda sperm üretiminde bir artış saptanmıştır (Foresta ve ark, 2002; Foresta ve ark, 2005). FSH Sertoli hücrelerinde sitokin profillerini değiştirerek etki etmektedir. Gerçekten de,dişi farelerde yapılan folikülogenez modelinde rFSH'nın sitokin profillerini değiştirerek etki ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler rFSH'nın *in vitro* ortamda follikül medyumunda bulunan sitokin profillerini önemli ölçüde değiştirdiğini ortaya koymuştur. Özellikle de oosit kalitesi, erken dönemde embriyo canlılığı ve implantasyon ile ilişkili olan bazı sitokinlerin FSH uygulanması sonrasında yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (Foster ve ark, 2010).

NOA hastaların tedavisinde FSH'nın kullanılabiliyor olmasının yanı sıra FSH'nın testisin yapısında Sertoli destek hücrelerinde ifade edilen sitokin profillerini değiştirerek etki etmesi düşüncesi bu tez çalışmasının temelini oluşturmaktadır. Önceki çalışmalara dayanarak, FSH'nın erkeklerde böyle bir mekanizma üzerinden etki edebileceği düşünülebilir (Foster ve ark, 2010).

Maturasyon aresti görülen NOA hastaları ile maturasyon aresti görülmeyen OA hastaları karşılaştırıldığında, spermiyogenezin gerçekleşmesinde etkili rol oynayan somatik Sertoli hücre fonksiyonları ve bu hücrelerde ifade olan faktörlerin arasında farklılık olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda yapılan bazı çalışmalar da bulunmaktadır. OA ve NOA hastaları Sertoli hücreleri sekresyonu açısından değerlendirilmiş ve bunun sonucunda SCF, BMP4 ve GDNF gibi faktörlerin NOA hastalarında OA hastalarına göre daha az ifade olduğu gösterilmiştir (Meng ve ark, 2013). NOA hastalarının ejakulatlarında olgun spermatozoa bulunmaması ve özellikle bir grup hastanın mikroskobik değerlendirmelerinde ejakulatta olgunlaşmamış yuvarlak spermatid benzeri hücrelerin tespit edilmesi, bizi bu

hücrelerin olgunlaşmadan önce ejakulata döküldüğü düşüncesine yönlendirdi. Bu olayda özellikle sitokinlerin rol oynayabileceği, yaptığımız literatür araştırmalarına dayanmaktadır (Yao ve ark, 2010). Bu da sitokinlerin spematogenez sürecinde önemli role sahip olduklarını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında NOA ve OA hastalarından izole edilen Sertoli hücreleri arasında FSH uygulanmadan önce ve sonra 88 farklı sitokin geni ifadesi sitokin pcr array yöntemiyle kıyaslanmıştır. Çalışmaya dahil olan infertil hastalar üç gruba ayrılmıştır. Plazma FSH'ları yüksek olan NOA hastalar, plazma FSH'ları normal olan NOA hastalar ve kontrol grubu olarak kabul edilen OA hastalarda FSH uygulanmadan önce gen ifade seviyelerinde farklı profiller ortaya çıkmıştır.

FSH uygulamadan önce hasta genel grubunu kontrol grubu ile gen ifade seviyeleri açısından kıyasladığımızda, ifadesi 5 kattan fazla değişen ya da istatistik olarak anlamlı değişen genler arasında FGF13 gen ifade seviyesi hasta grubunda kontrol grubuna göre 19.3 kat artmıştır bu artış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Hasta gruplarında kontrol grubuna göre gen ifadelerinde artış gösteren genlerden özellikle FGF13 veya fibroblast büyüme faktörü homolog faktor 2 (Fhf2) olarak ta adlandırılan bu genin beyin ve kas içinde eksprese edildiği bilinmektedir (Gecz ve ark., 1999). İnsanlarda FGF13'ün bozukluğu hipogonadizm, ağır mental bozukluklar, epilepsi ve hipometabolizmaya neden olmaktadır (Borjeson ve ark 1962). FGF13 bir kofaktör olarak IB2 skafold proteinini, mitojenle aktive olan protein kinaz'a (MAPK) bağlamakta görev almaktadır (Schoorlemmer and Goldfarb, 2001). FGF'ler (Kouhara ve ark., 1997), nörotropinler (Sawada et al., 2000; Patapoutian andReichardt, 2001), HGF (Stuart ve ark., 2000) ve PDGF gibi ekstrasellüler sinyaller, MAPK aktivasyonunda rol oynayan birkaç hücresel yanıtta görev almaktadırlar. Bu sinyal yolağı proliferasyon, diferansiyasyon, migrasyon ve mitozda görev almaktadır (Tibbles ve Woodgett, 1999). Cory ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da FGF13'ün ifadesi erkek genital bölgelerinin testis kordlarında pre-Sertoli hücrelerinde gösterilmiştir. FGF13 gelişmekte olan erkek genital bölgelerinin pre-Sertoli hücrelerinde sinyal trandüksiyonunda rol almaktadır (Cory ve ark, 2007).

Bizim çalışmamızda FGF'13 hasta ve kontrollerden elde edilen Sertoli hücrelerinde ifade edilmektedir. Ancak FGF13'ünNOA tanısı alanerkeklerde kontrol grubuna göre 19.3 kat daha fazla ifade edildiği **ilk kez** bu çalışmada saptanmıştır. Bu hastaların Sertoli hücrelerinde pre-Sertoli hücrelerine benzer gelişim dönemiyle uyumlu, pre-Sertoli hücrelerindeki ifadeye benzer bir artış gözlenmiştir. Bunun infertilite için önemli bir belirteç olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızdan elde ettiğmiz sonuçlara göre, VEGFA (Vascular endotel büyüme faktörü A) hasta grubunda kontrol grubuna göre 5 kat artmış olan diğer bir sitokindir. VEGF A bir parakrin büyüme faktörü olarakhem endotelyal hücre migrasyonunda ve hemkan damarlarının gelişiminden sorumludur (Caires ve ark, 2012). Bu genin proanjiyojenik izoformları damar gelişimini düzenlemektedir (Harper ve ark, 2008; Artacve ark, 2009).

VEGFA salgılayan Sertoli hücrelerinin, endotelyal veya öncül endotelyal hücrelerinin farklılaşan testise doğru göç etmesini indükleyerekyeni damarlanma ve kordon oluşumuna neden olabileceği gösterilmiştir.

VEGFA'nın aşırı ekpresyonunun aynı zamanda transgenik fare modellerinde, embriyonik canlılığa ve spermatogenezde bozukluk oluşturarak erkek fertilitesine zarar verdiği Huminieckive arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir. Bu durum erkeklerde maturasyon arresti ya da spermatogenezde azalma ile sonuçlanmaktadır. Spermatogenik hücreler arasında adezyon kaybı ve infertil erkeklerde minor veya orta derecede tübüler disorganizasyon görülmüştür. Bu durumda epididimde olgun spermatozoalarla birlikte immatür prekürsür spermler, hücre atıkları ve ölü hücreler tespit edilmiştir (Huminiecki ve ark, 2001; Miquerol ve ark, 2000).

VEGFA'nın NOA infertil erkeklerde kontrol grubuna göre aşırı ekspresyonu **ilk kez** bu tez çalışmasına tespit edilmiştir. Vasküler permabilite aktivitesi olan ve damarlanmayı indükleyen bu genin aşırı ekspresyonunun spermatogenik hücreler arasında adezyon kaybına ve tübüler disorganizasyonuna neden olabileceği

düşünülmektedir. Ayrıca bu genin aşırı ekspresyonu testis yapısında kan-testis bariyerinin bozulmasıyla sonuçlanabilmektedir. Bu durumda germ hücreleri immün sistemden korunamazlar ve bunun sonucunda da infertilite ortaya çıkabilir.

Hasta grubunda kontrol grubun göre ifade seviyelerinde anlamlı artan diğer genlerden EFNB2 (8.1;), EFNB1(7.3 kat) ve EFNA1(7.5 kat) genleridir ($p<0.05$). Ephrinler ve bu ligandların reseptörleri olan Eph reseptörleri hücre adezyonu, hareketi, hayyata kalımı, endositoz, metastaz, hücre farklılaşması ve çoğu morfogenetik olaylarda önemli rol oynamaktadırlar (Fletcher ve ark, 1995; Cho ve ark, 2014; Cejalvo ve ark, 2011). EFNB1 ve EFNB2 geninin ürünü tip 1 membran proteini ve Eph ilişkili reseptör tirozin kinazlara bağlanan bir ligandır (Cho ve ark, 2014). EFNB1 gelişmekte olan korteksin yapısal bütünlüğünde rol oynamakta aynı zamanda nörepitel gelişimi için Apikal Ektrasellüler Matriks (Apikal-ECM) adezyonunu sıkı bir şekilde kontrol etmektedir (Arvantis ve ark, 2013). Eph reseptörünün ve ephrin ligandının artmış ekspresyonunun rolü angiogenez ve tümör ilerlemesinde gösterilmiştir (Berardi ve ark, 2008). Ancak EFNB2 hem fizyolojik ve hem patolojik angiyogenezde önemli rol oynamaktadır (Luxey ve ark, 2011). Bu literatür araştırmalarına dayanarak **ilk kez** bizim çalışmamızda erkek infertilitesinde çalışılmış olan EFNB1 ve EFNB2'nin hasta grubunda artmış gen ifadelerinin damarlanmayı tetikleyerek spermatogenik hücreler arasında adezyon kaybına ve spermatogenezde azalmaya neden olabileceğini düşünmekteyiz.

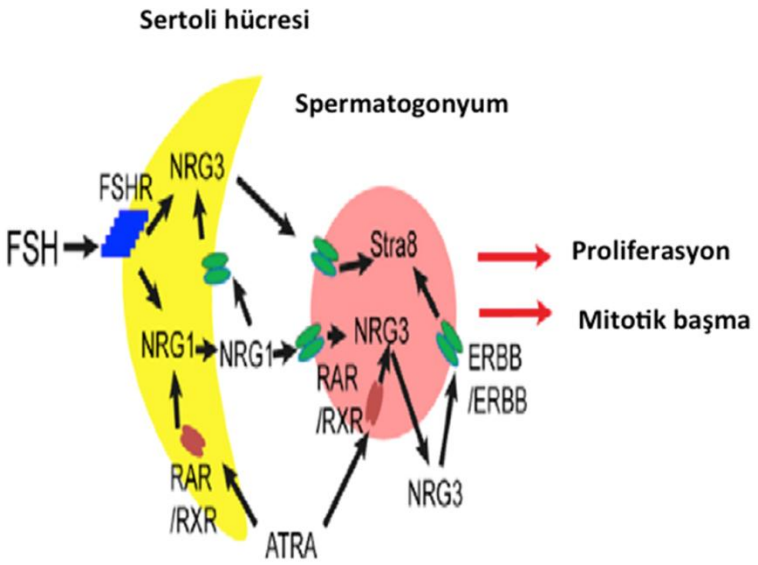
EFNA1 hipoksi ile aşırı derecede indüklenmekte aynı zamanda bir angiogenez faktörü olarak tanımlanmaktadir. EFNA1 ekspresyonu tümor endotel hücrelerde ve tümor hücrelerinde görüldüğü için bu genin hücre migrasyonunda rol oynadığıtespit edilmiştir (Yamamoto ve ark, 2013). EFNA1 ligandı ile aktive edilen EphA2, Ras / ERK ve PI3K / Akt yolaklarını inhibe ederek hücre proliferasyonunu önler ve apoptoza yol açar (Miao ve ark, 2014). Bu tez çalışmasında **ilk kez** infertil erkek hasta grubunda saptanmış olan artmış EFNA1 ifadesinin, spermatogenik hücrelerinin apoptoza indüklenmelerini sağladığını düşünmekteyiz. Ayrıca bu gen damarlanmayı tetiklediği için spermatogenik ve Sertoli hücreler arasında adezyon kaybına, Kan testis bariyeri (KTB)'inin bozulmasına, spermatogenik hücrelerin immün hücreler ile

direk temasına ve bunun sonucunda infertiliteye neden olabileceği kanısı vermektedir.

Hasta grubunda kontrol grubuna göre ifade seviyesinde istatistik olarak anlamlı artış gösteren (7.7 kat; $p<0.05$) Hepatosit büyüme faktörü (HGF) geni testiste hücre sıkı bağlantılarını etkileyen bir sitokindir. HGF testiküler okludin seviyesini düşürür ve sıkı bağlantılarda bulunan proteinlerin pozisyonlarını değiştirir. Yapılan çalışmalarda testiste HGF'nin okludin miktarını azaltarak ve değiştirerek Sertoli-Sertoli sıkı bağlantılarını düzenlediği gösterilmiştir. (Catizone ve ark, 2008). Ancak bu tez çalışmasında erkek infertilitesinde ilk kez saptanan HGF geninin hasta grubunda kontrol grubuna göre aşırı ifadesinin okludin miktarını düşürerek, mayoz bölünmesi sırasında korunması gereken sıkı bağlantıların bozulmasına ve böylece spermatogenez hücrelerinin mayozu bitirmeden ve daha olgunlaşmadan lümene atılmalarına ayrıca spermatogenik hücrelerin immün hücrelerine maruz kaldığına yol açabileceğini düşündürmektedir.

KTB spermatogenez sürecini zararlı endojen veya eksojen maddelerin kontaminasyonuna karşı korumaktadır. p38, JNK ve ERK gibi mitojenle aktif olan protein kinazlararın (MAPK) aktivasyonu sonucunda MAPK sinyal yolağı aktive edilip kan testis bariyerinin sıkı bağlantılarında bulunan proteinlerin seviyesinde değişikliğe neden olmaktadır (lui ve ark, 2003). Özellikle Lu ve arkadaşlarının yaptığı bir *in vivo* çalışmada bu yolak aktivasyonu sonucunda KTB'inde bulunan claudin-11, connexin-43, N-cadherin ve β-catenin gibi proteinlerin ifade seviyesinde bir düşüş, Sertoli hücrelerinin ve testis yapısının bozulmasına neden olmuştur. KTB'nin bozulması da reprudüktivitede bozulma ile sonuçlanmıştır (Lu ve ark, 2015). MAPK sinyal yolağı TPO gibi bazı sitokinler tarafından aktive edilebilir. Bizim çalışmamızda NOA hastalarının Sertoli hücrelerinde ifade edilen Thyroid peroxidase (TPO) geninin ifadesi kontrol grubunun gen seviyesi ile karşılaştırıldığında 7.2 kat artış gözlenmiştir. **İlk kez** infertile erkeklerde bizim çalışmamızda saptananbu artışın KTB'in bozulmasına neden olabileceği ve testisin yapısındaki bozulmayla disspermatogeneze yol açabileceği düşünülmektedir.

Hasta grubunda kontrol grubun göre ifade seviyesinde istatistik olarak anlamlı düşüş gösteren (3.2 kat; $p<0.05$) Neuregulin 1'in (NRG1) spermatogonia proliferasyonu ve mayozun başlatılabilmesi için gerekli olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Testiste retinoik asit (RA) ve FSH, mayozu indirekt olarak, NGR1 ve NRG3 ifadesini arttırarak Sertoli hücreleri aracılığı ile indüklemektedir (Şekil.4.1) (Zhang ve ark., 2011).



Şekil 4.1. RA ve FSH'nın Sertoli hücrelerinde NRG1 aktivasyonu ve NRG3 yoluyla mayozu uyarma mekanizması

Bu tez çalışmasında da hastaların NRG1 gen ifade seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı düşüşü, bu hastalarda spermatogenez sırasında bozukluk oluştuğunu ve bunun sonucunda infertiliteye neden olduğunu düşündürmektedir.

Colony stimüle edici faktörün (CSF3) hücre replikasyonunu ve farklılaşmasını indüklemesinin yanısıra, hücre hayatta kalımını sağlamaktadır (Akagawa ve ark., 2006). CSF1-3'ler kendi reseptörlerine bağlandıkları zaman hücre içi PI3K (fosfatidil-inozitol 3 kinaz) yolağını aktifleştirmekle hücre hayatta kalımı ve faklılaşması dahil bir çok fizyoloji olayını kontrol etmektedirler (Ruse and Knaus, 2006). Buna ilaveten, bunlarJak/Stat and Ras/Raf/Mapk yolaklarına aracılık

etmektedirler, bu yolaklar hücre büyümesinde ve apoptoz inhibisyonunda önemli rol oynamaktadırlar. (Bhanu ve ark., 2004). Bu sitokinin testis ve Sertoli hücrelerinde ifade edilmesi **ilk defa** bu tez çalışmasında tespit edilmiştir ve hasta grubunda kontrol grubuna göre bu genin ifade seviyesi 54 kat anlamlı düşüş göstermiştir ($p<0.05$). Bu genin ifadesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre 54 kat azalması muhtemelen normal koşullarda CSF3'ün testis dokusunda spermatogenik hücrelerin apoptozdan korunmasında ve bu hücrelerin hayatta kalımında görevli olduğunu ve spermatogenezde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Her üç gruba (yüksek FSH'li hasta grubu, normal FSH'li hasta grubu ve kontrol grubu) FSH uygulandıktan sonra bu grupların FSH'ya karşı gen ifade seviyesinde değişiklikleri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre normal FSH'li hastalar ve kontrol grubunun FSH uygulandıtan sonra gen ifade seviyelerinde değişim görünürken yüksek FSH'li hastaların gen ifade seviyelerinde çok az sayıdaki gende ifade değişikliği saptandı. Bu da bu hastaların FSH'ya yanıt vermediklerini düşündürmüştür. Normal FSH'li hastaların gen ekspresyon profilindeki imza kontrollerle aynı olduğu içinsadece normal FSH'li hastalar kontrol grubuyla anlamlı değişiklik gösteren genler açısından karşılaştırıldı.

NOA hastaların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında göterilen gen ifade profili normal FSH'li hastalar için de anlamlı bulunmuştur. Bu hastalarda kontrol grubuna göre ifadesi değişen genler arasında EFNA1, NRG1 ve CSF3 yer almaktadır. Bu genlerin spermatogenezde çok önemli rol oynadığı ve ifade değişimlerinin infertiliteye yol açabileceği literatür araştırmalarına dayanarak **ilk kez** bu tez çalışmasında tespit edildi. Bunlara ilaveten normal FSH'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı azalış gösteren genler arasında kit ligand (KİTLG) geni (2 kat; $p<0.05$) testiste spermatogenezde önemli rol oynamaktadır. Bu gen spermatogonyum hücrelerinin mayozun sonuna kadar indükleyebilmektedir. Sato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KİTLG null farelerin testis dokularının in vitro kültüründe KİTLG ilave etikten sonra mayozun indüklediğini ve spermatid hücrelerin elde edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca CSF spermatogenezi indükleyen KİTLG geninin etkisini çoğaltarak sperm üretimini arttırabilmektedirler (Sato ve ark, 2012). Bizim çalışmamızda bu genlerin ifadesi ilk kez insanda çalışılmış olup, her iki gen anlamlı

seviyede düşüş göstermiştir. Bu da bu genlerin ifade düşüklüğünün hastalarda infertilite etyolojileri arasında yer alabileceğini göstermektedir.

Normal FSH'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı azalış gösteren genler arasında IFNk geni (2.5 kat; $p<0.05$) tip 1 interferon reseptörleri, immün hücre populasyonunun ve interferonla stimüle edilen respons elemanlarının aktivasyonunda ve hücreleri virüsten korumakta rol oynamaktadır. Araştırmalar Sertoli hücrelerinin ve germ hücrelerinin interfronlar (IFN'ler), interlökinler (IL'ler) ve sitokinlerin üretimi sayesinde eşsiz bir anti-virüs savunma sistemine sahip olduklarını göstermiştir (Dejucq ve ark, 1998). Yapılan bu tez çalışmasında normal FSH'li infertil hasta grubunda bu genin ifadesinde düşüklük olduğu saptanmış olup Sertoli ve germ hücrelerinin kontaminasyona karşı yeterli derecede bir savunma sistemine sahip olmadıklarını ve bunun sonucunda infertiliteye neden olan ekzojen elemanlara maruz kalabileceğini düşündürmüştür.

Lang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada transgenik fare modelinde İL-10'un makrofajlarda aşırı ekspresyonunu sağlamışlardır. Bu farelerde İL-10'ün yüksek ifade seviyesi seminifer tübülün dejenerasyonuna neden olarak spermatonezde bozukluk oluşturmuş ve bunun sonucunda infertiliteye neden olmuştur (Lang ve ark, 2002). Bizim yaptığımız çalışmada da İL10'un normal FSH'li hasta grubunda kontrol grubuna göre ifadesinin 5 kat arttığı saptandı. Biz de fare modelinde olduğu gibi bu genin aşırı ifade etkisinde testis yapısının bozulmasına neden olduğunu düşünmekteyiz.

Normal FSH'li hasta grubuna FSH uygulandıktan sonra ilginç bir şekilde bazı genlerin ifade seviyesinde değişiklik gözlenmiştir. Özellikle de NRG1, KİTLG, İFNK, CSF3 ve bazı interlökinlerin ifade seviyesinde anlamlı artış ve EFNA1 ve İL10 ifade seviyesinde düşüş görülmüştür. Bu da FSH tedavisinin normal FSH'li hastalarda başarılı olduğunugöstermektedir.

FSH'nın testisin yapısında bulunan destek hücreleri olarak görev yapan Sertoli hücrelerinde FSHR ifadesini sağlayarak etki ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Griswold ve ark, 2001). FSH'nın immatür ve matür evredeki Sertoli hücreleri

üzerine farklı etkiler gösteriyor olması, FSH reseptörlerinin ve genlerinin farklı ifade edilmelerinden kaynaklanıyor olabilir (Dahia ve ark, 2006). Ancak, şiddetli testis yetmezliği olan erkeklerde FSH bazal konsantrasyonlarının yüksek olması nedeniyle FSH tedavisinden bir netice alınamamaktadır (Foresta ve ark, 2009). Diğer yandan, FSH hormonunun etkisiz kalmasının nedeni olarak FSH'nın Sertoli hücreleri üzerindeki reseptörlerinin eksikliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Selice ve ark, 2011). Bu durumlarda FSH reseptörlerinin (FSHR) düşük ifade edildiklerini belirleyen yüksek plazma FSH düzeyleri, tubular fonksiyonda bir değişikliğe yol açabilmektedir (Foresta ve ark, 2009). Bu nedenle çalışmamızda Sertoli hücrelerinde FSH uygulaması sonrasında FSHR proteininin ifade düzeyi NOA ve OA hastalarında karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Önceki çalışmalarda primer insan Sertoli hücre kültüründe FSHR ve androjen bağlayıcı protein (ABP)'nin FSH'ya yanıt olarak ifade edildikleri gösterildiği için (Lampa ve ark, 1999) bu çalışmada da bu hücrelerin başta FSH'ya yanıt olarak salgıladıkları FSHR ve ABP'in ekpresyon ifade seviyeleri tespit edilerek bu hücrelerin *in vitro* şartlarda FSH'ya gösterdiği yanıtlar ortaya konmuştur. Böylece NOA ve OA hastalarında karşılaştırılmalı olarak Sertoli hücre fonksiyonları test edilerek FSH uygulaması sonrasında FSHR geninin ifade düzeyleri araştırılmıştır.

Geçici transfeksiyon analizi ile FSHR promotörünün karakterizasyonu, bazal promotör fonksiyonundan önemli bakış açısı sağlamıştır ancak hücreye özgül ifadesinden sorumlu mekanizmalar açısından çok az bilgi ortaya çıkarmıştır (Heckert ve ark., 1998). Sertoli hücrelerinin primer kültüründe endojen reseptörler aktif bir şekilde ifade edilmekte olup, bu hücrelerin FSHR geninin promotörü bazı diğer hücre tiplerine göre yüksektir (Heckert ve ark, 2002). Bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda yüksek FSH'li, normal FSH'li ve kontrol grubundan elde edilen primer Sertoli hücrelerinin FSH uygulanmadan önce FSHR ifade seviyeleri karşılaştırıldığında, her üç grupta FSHR ekspresyonu gösterilmiştir. Yüksek FSH'li hastaların Sertoli hücrelerinde saptanan FSHR ekspresyon seviyesi diğer iki gruba göre yüksek bulunmuştur ancak bu grubun plazmalarındaki FSH hormonu yüksek olması nedeniyle FSHR'ünün fonksiyonel olmadığını düşünmekteyiz. Benzer şekilde ABP her üç grupta da ifade edilmektedir. ABP ekzojen hormonların yokluğunda da

Sertoli hücreleri tarafından belirli bir zamana kadar sentezlenebilmektedir. Ancak bu proteinin ifadesi FSH hormonu etkisinde artmaktadır (Sanborn ve ark, 1998). Grupların ifade seviyeleri karşılaştırıldığında, ABP bazal seviyesi yüksek FSH'li hastalarda kontrol ve normal gruba göre fazladır. Ancak her üç grupta ABP'in aktif şekilde kullanılması için FSH hormonuna yanıt olarak fazla miktarda sentezlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle FSH hormonunun etkisinin her üç grupta değerlendirilebilmesi için gruplara FSH hormonu uygulandı ve bu hormonun etkisi FSHR ve ABP ifade seviyesi üzerinden araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunda FSH uygulanması sonrası FSH reseptör ekspresyon seviyesi aşırı derecede artarken (242 kat), Yüksek FSH'lı (13 kat) ve normal FSH'li (3.7 kat) hastalarda kontrol grubuna göre daha az miktarda artış saptandı. Bu da hasta grupların kontrol grubuna göre FSH hormonuna yanıt olarak FSHR ekspresyonlarında ifade düşüklüğü olduğunu gösterdi. Ancak yüksek FSH'li hastalarda ifade edilen FSHR'ün ifade seviyesi yüksek olmasına rağmen muhtemelen fonksiyonel proteine dönüşememekte ve bu hastalar FSH kullanamadıkları için plazmalarında FSH hormonu yüksek düzeyde olmaktadır görüşündeyiz. Bu reseptörün fonksiyonlarını değerlendirmek için FSH uygulanması sonrası ABP ifade seviyeleri de her üç grupta karşılaştırıldı. FSH, Sertoli hücreleri üzerinden ABP üretilmesini sağlamaktadır. ABP testislerde testosteron konsantrasyonu için gerekli olup, spermatogenezin etkili biçimde ilerlemesine aracılık eder. ABP miktarının ortamda az bulunması spermatogenez için gerekli olan fonksiyonel testosteron miktarının yetersiz kalmasına neden olup neticede spermatogenezde bozukluk ortaya çıkarmaktadır (Mathur ve ark., 2011). Sonuçlara göre kontrol grubunda ve normal FSH'li hasta grubunda FSH'ya yanıt olarak ABP ifade seviyesi 3.4 kat artmasına rağmen yüksek FSH'li hasta grubunda bu ABP ifade seviyesi 1.5 kat artış göstermiştir. Ancak kontrol grubu ve normal FSH'li hasta grubuyla karşılaştırıldığında 2 kat azalış gösterilmektedir. Bu sonuçlar yüksek FSH'li hastalarda FSH hormonuna karşı FSHR üretilmesinde bir sorun olduğunu, hem de bu reseptörün fonksiyonel olmadığını gösterdi. Ancak, normal FSH'lı hastalarda ABP miktarı kontrole yakın miktarda üretildiği için FSH tedavisi sonrasında FSH'a yanıt olarak üretilen FSHR, ABP üretimi için yeterli olup, üretilen ABP spermatogenez için yeterli miktarda testosteron sağlayabilmektedir.

Bu tez çalışması, yüksek FSH'li hastaların FSH'ya yanıt olarak muhtemelen fonksiyonel reseptörler üretemedikleri için FSH tedavisine başarılı yanıt veremeyeceklerini, ancak normal FSH'li hastaların üretilen FSHR'lerinde bir sorun olmadığı için bu hastalarda FSH tedavisinin başarılı olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmadan elde edilen verilerin spermatogenez mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağı ve NOA hastalarının tedavisinde yeni stratejilerinin oluşturulmasına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması, günümüz toplumunda büyük bir sorun olan erkek infertilite etyolojisi ve tedavisinin açıklanmasına yönelik bir araştırmayı kapsamaktadır.

Çalışmamızda plasma FSH'si normal olan hasta grubu, plasma FSH'si yüksek olan hasta grubu ve OA kontrol grubundan primer Sertoli hücre kültürü yapılmış olup elde edilen hücrelerin karakterizsyonu Sertoli hücrelerine özgü olan vimentin ve GATA4 antikoru ile yapıldıktan sonra hücrelerin %90'ından fazlasında bu belirteçlerin ekspresyonu başarılı bir şekilde gösterildi.

Bu tez çalışmasında sitokin pcr array yöntemiyle, Sertoli hücrelerinde ifade olan ve infertiliteye neden olması muhtemel aday sitokin faktörlerin ekspresyon farklılıkları mRNA düzeyinde tespit edildi ve böylece hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırmalı geniş kapsamlı bir sitokin taraması yapıldıktan sonra bu iki grup arasında sitokin ifade seviyesi açısından farklılıklar ortaya kondu. Özellikle EFNA1, EFNB1, İL10, KİTLG, CSF3, İFNK, NRG1 ve HGF genlerinin iki grup arasında ifade seviyelerinin farklılıkları ortaya çıktı.

NOA tanısı almış infertil erkeklerin tedavisinde FSH uygulanması sonucunda sperm ve gebelik oranının önemli ölçüde arttırılabileceği değişik araştırmalarda, tartışmalı bir konudur. Hasta ve kontrol gruplarına FSH uygulandıktan sonra normal FSH'li hasta grubunun sitokin ifade profilleinde değişiklikler ortaya çıktığı ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Böylece FSH tedavisinin erkek infertilitesinde etkisinin sitokin profillerini değiştirmek suretiyle gerçekleştiği ilk kez bu çalışmada gösterildi.

Çalışmamızda Sertoli hücrelerinin başta folikül uyarıcı hormona (FSH) yanıt olarak salgıladıkları FSHR ve ABP'in ekpresyon seviyesi RT-PCRyöntemiyle plazma FSH'si normal olan hasta grubu, plazma FSH'si yüksek olan hasta grubu ve OA kontrol grubunda karşılaştırıldı ve bunun sonucunda yüksek FSH'li hasta grubunda FSHR'nin muhtemelen fonksiyonel olmaması nedeniyle ABP miktarında diğer iki gruba göre daha az artış saptandı. Böylelikle gruplar arasında hücrelerin in vitro

şartlarda FSH'a gösterdiği yanıt farklılıları ilk kez bu çalışmada ortaya konarak NOA ve OA hastalarında karşılaştırılmalı olarak Sertoli hücre fonksiyonları test edildi.

Bu çalışmadan elde edilecek verilerin spermatogenez mekanizmasının daha iyi anlaşılmasında ve NOA hastaları için tedavi stratejilerinin oluşturulmasına yeni ufuklar açacağı düşünülmektedir.

5.1. ÖNERİLER

FSHR ve ABP seviyelerinde hasta grupları ve kontrol grubu arasında ifade değişikliliğinin protein düzeyinde doğrulanması için bu ifade seviyelerini protein düzeyinde western blot analiziyle araştırılması önerilmektedir.

FSH düzeyi düşük olan hastalarda özellikle de hipogonadotropik hipogonadizm testis yetmezliği olan infertil hastalara FSH uygululanması gerektiği, FSH yüksek olanlarda reseptör disfonksiyon olma olasılığı nedeniyle yeterli etkinlik gösteremeyeceği düşünülmektedir.

ÖZET

Erkek infertilitesi üzerinde Sertoli hücrelerinin etkisinin araştırılması

Spermatogenez, testis dokusunda Sertoli hücrelerinin salgıladığı faktörler etkisinde gerçekleşmektedir. Spermatogenez sırasında meydana gelen herhangi bir bozukluk genellikle spermatogenezde duraksamaya (maturasyon arrest; MA) ve infertiliteye neden olmaktadır. Bu durum obstrükstif olmayan azoospermi (NOA) olarak adlandırılmaktadır. Testis yapısında bulunan kan testis bariyerinin (KTB) korunması spermatogenez için çok önemlidir. Bu olayda sitokinlerin önemli rolü vardır. Sitokinlerin ifadesinde bir değişiklik infertiliteye neden olabilmektedir. Bu tez çalışmasında "Maturasyon aresti" görülen NOA hastaları ile "maturasyon aresti" görülmeyen ve kontrol grubu olarak kabul edilen Obstrüktif azoospermi (OA) hastalarından izole edilen Sertoli hücreleri Vimentin ve GATA4 antikorları ile karakterizasyonu yapıldıktan sonra bu hücreler sitokin array kullanılarak kılaştırıldığında EFNA1, EFNB1, İL10, KİTLG, CSF3, İFNK, NRG1 ve HGF genlerinin anlamlı düzeyde korelasyon gösterdiği tespit edildi. NOA tanısı almış olan infertil erkeklerin tedavisinde Folikül stimüle edici hormon **(**FSH) uygulanması sonucunda sperm üretiminin ve gebelik oranının önemli ölçüde arttırılabileceği değişik araştırmalarda gösterilmiş olmasına karşın, tartışmalı bir konudur. NOA hastalarının tedavisinde FSH'nın kullanılabiliyor olmasının yanı sıra FSH'nın testisin yapısında Sertoli destek hücrelerinde ifade edilen sitokin profillerini değiştirerek etki ettiği ilk kez bu tez çalışmasında tespit edildi. Ancak, plazma FSH düzeyi yüksek olan erkeklerde sitokin ifadelerinde FSH düzeyi normal olan erkeklere göre daha az değişiklik saptandı. Bu çalışma, yüksek FSH'li hastalarda FSH hormonunun etkisiz kalmasının, Sertoli hücreleri üzerindeki FSH reseptörlerinin (FSHR) fonksiyonel olmamasından kaynaklanabileceğini ve bunun göstergesi olan Androjen Bağlayıcı Protein (ABP**)** ifadesinin eksikliğini gösterdi. Sonuç olarak elde edilen veriler NOA ve OA grupları arasında sitokin ifadesi açısından farklılıklar olduğunu, FSH hormonun, FSH düzeyi normal olan NOA'li erkeklerde, sitokinler üzerinden etki ettiğini, ancak plazma FSH düzeyi yüksek olan erkeklerin Sertoli hücrelerinde FSHR bozukluğundan dolayı FSH'nın etkisiz kalabileceğini düşündürdü.

Anahtar kelimeler: Obstrükstif olmayan azoospermi (NOA), Sertoli hücreleri, Folikül stimüle edici hormon (FSH), FSH reseptörü (FSHR), Androjen Bağlayıcı Protein (ABP)

SUMMARY

Investigation of the effect of the Sertoli cell on male infertility

Spermatogenesis takes places in testis tissue influence of various paracrine and autocrine substances as well as secreted factors from somatic Sertoli cells. Any disorder occurred during the spermatogenesis often lead to spermatogenesis arrest (maturation arrest, MA) and infertility. This is called non-obstructive azoospermia (NOA). Blood testis barrier (BTB) that located in the testis is very important to protect spermatogenesis. Cytokines has important role in this event. A change in the expression of cytokines can lead to infertility. Sertoli cells izolated from both NOA patient and OA control groups and this cells characterized by immunocytokimyasal staining of vimentin and GATA4 proteins. These cells were compared for cytokine expression levels between two groups and appeared the differences in gene expression level of EFNA1, EFNB1, İL10, KİTLG, CSF3, İFNK, NRG1 ve HGF genes genlerinin ifade seviyelerinin farklılıkları ortaya çıktı.

Although this is controversial using of Folicule Stimulating Hormone (FSH) intreatment of NOA infertile men, sperm production and pregnancy rate can be substantially increased and is shown in various researchs. FSH can be used in the treatment of patients with NOA and in the testicular structure FSH affect this cells with modifying cytokine profiles that expressed in the Sertoli cell and It was detected for the first time in this thesis. However, no significant changes in thecytokine expression of men with elevated plasma FSH levels.

This thesis showed ineffectiveness of FSH in men with high plasma FSH levels due to the lack of functionnal FSH receptor (FSHR) on Sertoli cells ofthis patient. ABP is also designated as a indicator of non-functional FSHR. As a result, obtained data showeddifferences in the level of cytokine between NOA and OA groups. İn the NOA patient with normal plasma FSH level, FSH hormone therapy effect via change of cytokines expression in this patient but in men with high plasma FSH levels FSH is ineffective because ofFSHR dysfunction on Sertoli cell from this patient.

Key words: non-obstructive azoospermia (NOA)**,** Sertoli cell**,** Folicule Stimulating Hormone (FSH)**,** FSH receptor (FSHR)**,** Androjen Binding Protein (ABP)

KAYNAKLAR

ABID, S., MAITRA, A., MEHERJI, P., PATEL, Z., KADAM, S., SHAH, J. (2008). Clinical and laboratory evaluation of idiopathic male infertility in a secondary referral center in India. *J Clin Lab Anal*; 22(1):29-38.

AGARWAL, A., MAKKER, K., SHARMA, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am J Reprod Immunol; 59: 2-11.

AKAGAWA, KS, KOMURO, I., KANAZAWA, H., YAMAZAKI, T., et al. (2006). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor- induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* (Suppl 11): S32-S36.

ALVES, M.G., RATO, L., CARVALHO, R.A., MOREIRA, P.I., SOCORRO, S., OLIVEIRA, P.F. (2013). Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis", *Cell, Mol, Life Sci*, 70:777–793.

ANONYMOUS. (1996a). Infertility revisited: the state of theart today and tomorrow. *Hum. Reprod.*, 11, 1779-1807.

ARTAC,RA., MCFEE, RM., SMITH,RA.,BALTES-BREITWISCH, MM., CLOPTON,DT., CUPP AS. (2009). Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms is more effective than treatment with proangiogenic isoforms in stimulating vascular development and follicle progression in the perinatal rat ovary. Biol Reprod; 81(5):978–988.

ARULDHAS, MM., VALIVULLAH, H, M., SRINIVASAN, N.,GOVINDARAJUL, U. (1986).Role of thyroid on testicular lipids in prepubertal, pubertal and adult rats. I.Hyperthyroidism. Biochim BiophysActa; 881:462–469.

ARVANITIS, D., BÉHAR, A., TRYOEN-TÓTH, P., O. BUSH, J., JUNGAS., T., VITALE, N., DAVY, A.(2013). Ephrin B1 maintains apical adhesion of neural progenitors. Development; 140, 2082-2092.

ATTIA, AM., AL-INANY, HG., FARQUHAR, C., PROCTOR, M. (2007) Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*; 17.CD005071.

AUGER, J., EUSTACHE, F., ANDERSEN, A.G., IRVINE, D.S., JØR-GENSEN, N., SKAKKEBAEK, N.E., SUOMINEN, J., TOPPARI, J., VIERULA, M., JOUANNET, P. (2001). Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod*; 16: 2710-7.

BARDIN, C.W, CHENG, C.Y., MUSTO, N.A., GUNSALUS, G.L. (1988). The Sertoli cell. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, eds. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; 933–974.

BARDIN, CW., CHENG, CY., MUSTOW, NA., GUNSALUS, GL. (1994). The Sertoli cell. The physiology of reproduction. NewYork: Raven Press; p. 1291–332.

BARTOOV, B., ELTES, F., LUNENFELD, E. (1994) Sperm quality of subfertile males before and after treatment with human follicle-stimulating hormone. *FertilSteril*; 61:727–34.

BEAGLEY, K.W., WU, Z.L., POMERING, M., JONES, R.C. (1998). Immune responses in the epididymis: implications for immunocontraception. *J Reprod Fertil* (Suppl) 53:235–245.

BEARDSLEY, A., ROBERTSON, DM., O'DONNELL, L. (2006). A complex containing alpha6beta1-integrin and phosphorylated focal adhesion kinase between Sertoli cells and elongated spermatids during spermatid release from the Seminiferous epithelium. J. Endocrinol.; 190:759–770.

BENAHMED, M. (1996). Growth factors and cytokines in the testis. In:Comhaire FH, ed. Male İnfertility. London: Chapman and Hall Medical; 324–336.

BERARDI, AC., MARSILIO, S., ROFANI, C., SALVUCCI, O., ALTAVISTA, P., PERLA, FM., DIOMEDI-CAMASSEI, F., UCCINI, S., KOKAI, G., LANDUZZI, L., MCDOWELL, HP., DOMINICI, C. (2008). Up-regulation of EphB and Ephrin-BExpression in Rhabdomyosarcoma. *ANTICANCER RESEARCH*; 28: 763-770.

BHANU NV, TRICE TA, LEE YT AND MILLER JL (2004). A signaling mechanism for growth-related expression of fetal hemoglobin. *Blood* 103: 1929-1933.

BOEKELHEIDE, K., FLEMING, S.L., JOHNSON, K.J., PATEL, S.R., SCHOENFELD, H.A. (2000). Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med,* 225:105–115.

BOXMEER, J.C., SMIT, M., UTOMO, E., ROMIJN, J.C., EIJKEMANS, M.J., LINDEMANS, J., LAVEN, J.S., MACKLON, N.S., STEEGERS, E.A., STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. (2009). Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril*; 92: 548-56.

BRACKETT, N.L., IBRAHIM, E., GROTAS, J.A., ABALLA, T.C., LYNNE, C.M. (2008). Higher sperm DNA damage in semen from men with spinal cord injuries compared to controls. *J Androl*; 29(1):93-9.

BREZNIK, R., VLAISAVLJEVI, V., BORKO, E. (1993). Treatment ofvaricocele and male fertility. *Arch Androl*, 30:157–160.

CAIRES, KC., DE AVILA, JM., CUPP, AS., MCLEAN, DJ. (2012). VEGFA family isoforms regulate spermatogonial stem cell homeostasis in vivo. Endocrinology; 153(2):887–900).

CATIZONE, A., RICCI, G., GALDIERI, M. (2008). Hepatocyte growth factor modulates Sertoli-Sertoli tight junction dynamics. J Cell Physiol; 216(1):253-60. doi: 10.1002/jcp.21400.

CAVICCHIA, J.C., SACERDOTE, F.L. (1988). Topography of the rat blood-testis barrier after intratubular administration of intercellular tracers. *Tissue Cell*, 20:577–586.

CEJALVO, J., MUNOZ, J., TOBAJAS, E., FANLO, L., ALFARO, D., GARCI´A-CECA, J., ZAPATA, A.(2013). Ephrin-B–Dependent Thymic Epithelial Cell–ThymocyteInteractions Are Necessary for Correct T Cell Differentiationand Thymus Histology Organization: Relevance for ThymicCortex Development. Immunol; 190:2670-2681A.

CHANG, C., CHEN, YT., YEH, SD., XU, Q., WANG, RS., GUILLOU,F., LARDY, H., YEH, S. (2003). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells., doi, 10.1073, pnas, 0307306101.

CHENG, CY, MRUK, DD. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli–germ cell interactions and male contraceptive development. Physiol Rev;82:825–74.

CHENG, CY., MRUK, DD. (2010). A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. Nat Rev Endocrinol; 6(7): 380–395.

CHO, H., HWANG, Y., MOOD, K., JI, Y., LIM, J., MORRISON., DAAR, I.(2011). EphrinB1 Interacts with CNK1 and Promotes Cell Migration through c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Activation· J Biol Chem;.30;286(52):44976-87.

CHUNG, NP., Cheng, CY. (2001). is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? Endocrinology; 142:1878–1888.

COOKE, P., PORCELLI, J. AND HESS, R. (1992) Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biol Reprod;* 46(1):146–154.

CORTES, D., MÜLLER, J. AND SKAKKEBAEK, N. (1987) Proliferation of Sertolicells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl* 10(4):589–596.

CORY, BOYER, A., PILON, N., JACQUES G., LUSSIER., DAVID, W. (2007). Presumptive Pre-Sertoli Cells ExpressGenes Involved in Cell Proliferation andCell Signalling During a Critical Window inEarly Testis Differentiation ARON T. SILVERSIDES* MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 74:1491–1504.

DADA, R., KUMAR, M., JESUDASAN, R., FERNÁNDEZ, J.L., GOSÁLVEZ, J., AGARWAL, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility, *J Assist Reprod Genet*. 29:213 – 223.

DAİ, R.X., DJAKİEW, D., DYM, M. (1987). Endocytic activity of Sertoli cells grown in bicameral culture chambers. *Anat Rec*, 218:306–312.

DE KRETSER, D.M., KERR, J.B. (1988). The cytology of the testis. In: Knobil, E., Neill, J.B., Ewing, L.L., Greenwald, G.S., Markert, C.L, Pfaff, D.W., eds. The Physiology Of Reproduction. New York: Raven Press; 837–932.

DE KRETSER, DM., KERR, JB. (1994). The cytology of the testis. In: Knobil E,Neill JD, editors. The physiology of reproduction. New York: Raven Press; p. 1177–300.

DE ROOIJ DG. (2009) The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech*; 72:580–585.

DE ROOIJ, D.G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*; 121: 347-54.

DEJUCQ, N., LİENARD, M.O., JEGOU, B. (1998). Interferons and interferon-induced antiviral proteins in the testis. *J Reprod Immunol,* 41:291–300.

DÍEZ-SÁNCHEZ, C., RUİZ-PESINI, E., LAPEÑA, A.C., et al. (2003). Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod*; 68:180-5.

DOHLE, G.R., VEEZE, H.J., OVERBEEK, S.E. et al. (1999). The complex relationships between cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical, electrophysiological and genetic data. *Hum Reprod*; 14:371-4.

DORRINGTON, J.H., KAHN, S.A. (1993). Steroid production, metabolism, and release by Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD, eds. The Sertoli Cell. Clearwater, FL: Cache River Press; 537–549.

DU PLESSIS, SS., KASHOU, AH., BENJAMIN, DJ.,YADAV, SP., AGARWAL, A., DU PLESSIS et al. (2011). Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. Reproductive Biology and Endocrinology, 9:36.

DYM, M. (1994). Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev,* 15:102–115.

EDWARDS, R.G., BISHOP, C.E. (1997). On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for male infertility. *Mol Hum Reprod*; 3:549-54.

EGOZCUE, S., BLANCO, J., VENDRELL, J.M., GARCIA, F., VEIGA, A., ARAN, B., et al. (2000). Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*; 6(1):93-105.

ELZANATY, S. (2013). Non-obstructive azoospermia and clinical varicocele:therapeutic options. *Int Urol Nephrol*, 45:669–67.

ESLIE,L., L.,ECKERT, H., M ICHAEL D. RISWOLD, G.(2002).The Expression of the Follicle-stimulating Hormone Receptorin Spermatogenesis. by The Endocrine Society

ESTEVES, S.C., AGARWAL, A. (2011). Novel Concepts in Male Infertility, *Int Braz J Urol*; 37: 5-15.

FERRAS, C., FERNANDES, S., MARQUES, C.J., et al. (2004). AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis inmaturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod*; 10:755.

FLETCHER, FA.,HUEBNER,K., SHAFFER,LG., FAIRWEATHER,ND., MONACO, AP., MULLER, U., DRUCK, T., SIMONEAUX,DK., CHELLY,J. (1995).Assignment of the gene (EPLG2) encoding a high-affinity binding protein for the receptor tyrosine kinase elk to a 200-kilobasepair region in human chromosome Xq12.*Genomics;*25 (1): 334–5.

FORESTA, C., BETTELLA, A., GAROLLA, A., AMBROSINI, G., FERLIN, A. (2005) Treatment of male idiopathic infertility with recombinant human follicle-stimulating hormone: a prospective, controlled, randomized clinical study. *FertilSteril;* 84:654–61.

FORESTA, C., BETTELLA, A., MERICO, M., GAROLLA, A., FERLIN, A., ROSSATO, M. (2002) Use of recombinant human follicle-stimulating hormone in the treatment of male factor infertility. *Fertil Steril;* 77:238–44.

FORESTA, C., BETTELLA, A., MERICO, M., GAROLLA, A., PLEBANI, M., FERLIN, A. ET AL. (2003) FSH in the treatment of oligozoospermia. *Mol Cell Endocrinol;* 161:89–97.

FORESTA, C., BETTELLA, A., SPOLAORE, D., MERICO, M., ROSSATO, M., FERLIN, A. (2004) Suppression of the high endogenous levels of plasma FSH in infertile men are associated with improved Sertoli cell function as reflected by elevated levels of plasma inhibin B. *Hum Reprod.;* 19:1431-7.

FORESTA, C., MORO, E., FERLIN, A. (2001). Y chromosome microdeletions and alteration of spermatogenesis. *Endocr Rev*; 22:226.

FORESTA, C., SELICE, R., MORETTI, A., PATI, MA., CARRARO, M., ENGL, B., AND GAROLLA, A., (2009) Gonadotropin administration after gonadotropin-releasing-hormone agonist: a therapeutic option in severe testiculopathies. *Fertil Steril.;* 2009;92:1326–32.

FOSTER, R., SEGERS, I., SMART, D., ADRIAENSSENS, T., SMITZ, J., ARCE, JC., AND PRINCIVALLE, M., (2010) A differential cytokine expression profile is induced by highly purified human menopausal gonadotropin and recombinant follicle-stimulating hormone in a pre- and postovulatory mouse follicle culture model. *Fertil Steril;* 93:1464–76.

FRACZEK, M., SANOCKA, D., KAMIENICZNA, M., KURPISZ, M. (2008). Proinflammatory cytokines as anintermediate factor enhancing lipid sperm membrane peroxidation in in vitro conditions. *J Androl*; 29(1):85-92.

FRITZ, I.B., ROMMERTS, F.G., LOUIS, B.G., JENNIFER, H. DORRINGTON, J.H. (1976). Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP ofthe formation ofandrogen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *J, Reprod, Fert,*46, 17-24.

GNESSI, L., FABBRI, A., SPERA, G. (1997). Gonadal peptides as mediators ofdevelopment and functional control of the testis: an integratedsystem with hormones and local environment. Endocr Rev; 18:541–609.

GONSALVES, J., SUN, F., SCHLEGEL, P.N., et al. (2004). Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet*; 13:2875.

GONZALEZ-FLECHA, B. (2004). Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Mol Aspects Med*; 25: 169-82.

GRECO, E., ROMANO, S., IACOBELLI, M., FERRERO, S., BARONI, E., MINASI, M.G., UBALDI, F., RİENZI, L., TESARIK, J. (2005). ICSI in cases of sperm DNA damage: Beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum. Reprod*; 20: 2590-4.

GRISWOLD, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 9:411–416.

GRISWOLD, MD., KIM,J., TRIBLEY, WA. (2001). Mechanisms involved in the homologous down-regulation of transcription of the follicle-stimulating hormone receptor gene in Sertoli cells. Mol Cell Endocrinol; 173(1-2):95–107.

GUIZABAL, CE., ONTSERRAT, NM., ASSENA, RV., ARRAGAN, MB., ARRETA, EG., ARCIA, LG., UEVEDO, Q., IDAL, FV., IORGETTI, AG., EIGA, AV., ZPISUA, C.I., ELMONTEA, EB. (2011) Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells stem cells. 29:1186–1195.

GUTMANN, J.A., KIMEL, G.H., VOGL, A.W. (2000). Dynein and plus-end microtubule-dependent motors are associated with specialized Sertoli cell junction plaques (ectoplasmic specializations). *J Cell Sci*, 113:2167–2176.

HAMADA, A., ESTEVES, S.C., AGARWAL, A. (2011). The Role of Contemporary Andrology in Unraveling the Mystery of Unexplained Male Infertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 3, 27-41.

HARPER, SJ., BATES, DO.(2008).VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics.Nat Rev Cancer; 8(11):880–887.

HECKERT, LL., DAGGETT, MA., CHEN, J.(1998). Multiple promoter elements contribute to activity of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene in testicular Sertoli cells. Mol Endocrinol; 12(10):1499–1512.

HESS, R.A., FRANCA, L.R. (2009). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Advances in Experiental Medicine and Biology, Volume 636, pp 1-15.

HIRAI,O., SASAKI, H.,YAMAMOTO,H., SAKAMOTO, H., KUBOTA, Y., KAKIZOE, T.,TERADA, M., OCHIYA,T. (2004), HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition

HİRSCH, M.B., MOSHER, W.D. (1987). Characteristics of infertile women in the United States and their use of infertility services. *Fertil. Steril*., 47, 618-625.

HUMINIECKI, L., CHAN, H.,LUI, S.,POULSOM, R.,STAMP,G.,HARRIS, A.BICKNELL, R. (2001). Vascular endothelial growth factor transgenic mice exhibit reduced male fertility and placental rejection. Mol Hum Reprod;7:255–264.

HUNG, A.J., KING, P., SCHLEGEL, P.N. (2007). Uniform testicular maturation arrest: a unique subset of men withnonobstructive azoospermia. *J Urol*; 178:608.

HUNTER, D., ANAND-IVELL, A., DANNER, S., IVELL, R. (2012). Models of in vitro spermatogenesis.. *Landes Bioscience*, 2:1, 1 – 12.

HUYNH, T., MOLLARD, R., TROUNSON, A. (2002). Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update*; 8(2):183-98.

IRVINE, DS. (1998). Epidemiology and aetiology of male infertility. Human Reproduction,Volume 13 Supplement 1.

ISHIKAWA, T., FUJIOKA, H., FUJISAWA, M. (2004). Clinical and hormonal findings in testicular maturation arrest. *BJU International*; 94:1314.

ISHIKAWA,T., FUJIOKA,H., ISHIMURA, T., TAKENAKA, A., FUJISAWA, M.(2014).Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. Exp Anim; 63(4):447-57.

JANECKI, A., JAKUBOWIAK, A., STEINBERGER, A. (1992). Effect of cadmium chloride on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayers in two-compartment cultures—a new model for toxicological investigations of the “blood–testis” barrier in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol.; 112:51–57.

JAROW, J.P., ESPELAND, M.A., LIPSHULTZ, L.I. (1989). Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol*, 142:62–65.

JARVI, K., LO,K., FİSCHER, A., GRANTMYRE, J., ZINI, A., CHOW, V., MAK, V. (2010). CUA Guideline: The workup of azoospermic *males. Can Urol Assoc J*; 4(3):163-7.

JEGOU, B. (1992). The Sertoli cell. *Baillieres Clin Endocrinol Metab,* 6:273–311.

JONES, H.W., TONER, J.P. (1993). The infertile couple. *N Eng J Med.* 1993; 29: 710-15.

KADIOGLU, A., TEFEKLI, A., CAYAN, S., et al. (2001). microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men.*Urology*; 57:328.

KATO, Y., SHIRAISHI, K., MATSUYAMA, H. (2014) Expression of testicular androgen receptor in non-obstructive azoospermia and its change after hormonal therapy. *Andrology*: 2, 734–740.

KAUSHANSKY K. (2006). Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders. Cytokine. *Growth Factor Rev*. 17: 423-430.

KETKAR, AA AND REDDY, KVR. (2013). Differential Expression of Genes Involved in Early Events of Spermatogenesis in Mice. J Cell Sci Ther, 4:1.

KIERSZENBAUM, AL. (1994). Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro:a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. Endocr Rev;15:116–34.

KIM, ED., LEIBMAN, B.B., GRİNBLAT, D.M., et al. (2001). Varicocele repair improves semen parameters inazoospermic men with spermatogenic failure. *J Urol*; 162:737.

KIRSCHNER, N., et al. (2009). Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: Putative involvement of proinflammatory cytokines. Am. J. Pathol; 175:1095–1106.

KOCH, S., NUSRAT, A. (2009). Dynamic regulation of epithelial cell fate and barrier function by intercellular junctions. Ann. NY Acad. Sci.; 1165:220–227.

KRASSAS, G., POPPE, K., GLINOER, D. (2010). Thyroid Function and Human Reproductive Health Endocr. Rev; 31:702-755.

KRASSAS,GE., BRAVERMAN, LE., UTIGER, RD., WERNER, E.,INGBAR'S.(2005). The male and female reproductive systemin thyrotoxicosis. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 621– 628.

KUMAR, PRAMOD, R. AND MITRA, A. (2014) In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (Capra hircus). *J Assist Reprod Genet;* 31:993 – 1001

LAU, A.S.N., MRUK, D.D. (2003). Rab8B GTPase and junction dynamics in the testis. *Endocrinology,* 144:1549–1563.

LEE, N.P.Y., WONG, E.W.P., MRUK,D.D., YAN CHENG, C. (2009). Testicular Cell Junction: A Novel Target for Male Contraception. *Curr Med Chem*, 16(7): 906–915.

LEKHA C., DAHİA, A,. JAGANNADHA, R. (2006) Regulation of FSH receptor, PKI, IL-6 and calcium mobilization: Possible mediators of differential action of FSH. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 247 73–81

LEND AK., BELOUSOVA, A., HALLER-KİKKATALO, K., PUNAB, M., POOLAMETS, O., PETERS, M., AND SALUMETS A. (2010) Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Haplotypes and Male Infertility in Estonian Population and Meta-Analysis. *Systems Biology in Reproductive Medicine*; 56:84–90.

LI, C., ZHENG, L., WANG, C., ZHOU, X. (2010) Absence of nerve growth factor and comparison of tyrosine kinase receptor A levels in mature spermatozoa from oligoasthenozoospermic, asthenozoospermic and fertile men.*Clin Chim Acta*.; 411(19-20):1482-6.

LI, MW., et al. (2006). TNFalpha reversibly disrupts the blood–testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. J. Endocrinol.; 190:313–329.

LI, MW., MRUK, DD. CHENG, CY. (2009). Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. Trends Mol. Med.; 15:159–168.

LI, MW., MRUK, DD., CHENG, CY. (2008). "Unlocking" the blood–testis barrier and the ectoplasmic specialization by cytokines during spermatogenesis: Emerging targets for male contraception. Immun. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.; 8:20–27.

LI, MW., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2009). Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood–testis barrier dynamics. Proc. Natl Acad. Sci. USA; 106:10213–10218.

LI, MW., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2009). Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: An emerging concept of regulation. Cytokine Growth Factor Rev; 20:329–338.

LIE, PP., CHENG, CY., MRUK, DD. (2010). Crosstalk between desmoglein-2/desmocollin-2/Src kinase and coxsackie and adenovirus receptor/ ZO-1 protein complexes, regulates blood–testis barrier dynamics. Int. J. Biochem. Cell Biol; 42:975–986.

LOVELAND, KL., DIAS, V., MEACHEM, S., RAJPERT-DE MEYTS, E. (2007). The transforming growth factor-beta superfamily in early spermatogenesis: potential relevance to testicular dysgenesis. Int. J. Androl; 30:377–384.

LUI, W.Y., LEE, W.M., CHENG, C.Y. (2002). Rho GTPases and spermato- genesis. *Biochim Biophys Acta*, 1593:121–129.

LUI, WY., CHENG, CY. (2007). Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis—a molecular and biochemical perspective. Cytokine Growth Factor Rev.; 18:299–311.

LUI, WY., LEE, WM., CHENG, CY. (2001). Transforming growth factor-b3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. Endocrinology; 142:1865–1877.

LUI, WY., LEE, WM., CHENG, CY. (2003). TGF-betas: their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics. Int. J. Androl.; 26:147–160.

LUI, WY., LEE, WM., CHENG, CY. (2003). Transforming growth factor-beta3 regulates the dynamics of Sertoli cell tight junctions via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. Biol. Reprod; 68:1597–1612.

LUI, WY., WONG, CH., MRUK, DD,. CHENG, CY. (2003). TGF-B3 regulates the blood-testis barrier Dynamics via the p38 mitogen activated protein (MAP) kinase pathway: an in vivo study, *endochrinology* 144(4):1139-1142.

LUI, WY., WONG, CH., MRUK, DD., CHENG, CY. (2003).TGF-beta3 regulates the blood–testis barrier dynamics via the p38 mitogen activated protein (MAP) kinase pathway: an in vivo study. Endocrinology; 144:1139–1142.

LUND, L., LARSEN, S.B. (1998). A follow-up study of semenquality and fertility in men with varicocele testis and incontrol subjects. *Br J Urol*, 82:682–686.

LUO, H., WU, Z., QI, S., JIN, W., HAN, B., WU, J.(2005). Ephrinb1 and Ephrinb2 Are Associated with Interleukin-7 Receptor α and Retard Its Internalization from the Cell Surface. BIOLOGY OF REPRODUCTION;73, 1135–1146.

LUXEY, M., LAUSSU, J., JUNGAS, T., DAVY, A. (2011). Generation of Transgenic Mice Overexpressing EfnB2 inEndothelial Cells. *Genesis;* 49:811–820.

LYNNE, L., ROBINSON, L., TOWNSEND, J., RICHARD A. (2003).The Human Fetal Testis Is a Site of Expression ofNeurotrophins and Their Receptors: Regulation of theGerm Cell and Peritubular Cell Population. ANDERSONThe Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism; 3943–3951 2003.

MA, M., YANG, S., ZHANG, Z., LI, P., GONG, Y., LIU, L., ZHU, Y., TIAN, R., LIU, Y., WANG, X., LIU, F., HE, L., LIU, Y., YANG, H., LI, Z., HE Z. (2013) Sertoli cells from non-obstructive azoospermia and obstructive azoospermia patients show distinct morphology, Raman spectrum and biochemical phenotype. *Human Reproduction;* Vol.28, No.7 pp. 1863–1873.

MA, M., YANG, S., ZHANG, Z., LI, P., GONG, Y., LIU, L., ZHU, Y., TIAN, R., LIU, Y., WANG, X., LIU, F., HE, L., LIU. Y., YANG, H., LI, Z., HE, Z. (2013). Sertoli cells from non-obstructive azoospermia and obstructive azoospermia patients show distinct morphology, Raman spectrum and biochemical phenotype. Human Reproduction, Vol.28, No.7 pp. 1863–1873.

MADARA, J,L. (1998). Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol*, 60:143–159.

MADGAR, I., WEISSENBERG, R., LUNENFELD, B., KARASIK, A., GOLD-WASSER, B. (1995). Controlled trial of high spermatic veinligation for varicocele in infertile men. *Fertil Steril*, 63:120–1245.

MAHANTA, R., GOGOI, A., ROY, A., BHATTACHARYYA, I.K., SHARMA, P. (2011). Prevalence of azoospermia factor (AZF) deletions in idiopathic infertile males in North-East India. *Int J Hum Genet*; 11(2):99-104.

MANEESH, M., DUTTA, S., CHAKRABARTI, A., VASUDEVAN, D.M. (2006). Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Ind J Physiol Pharmacol*; 50(3):291-96.

MANNA, I., JANA, K., SAMANTA, P.K. (2004). Effect of different intensities of swimming exercise on testicular oxidative stress and reproductive dysfunction in mature male albino Wistar rats. *Ind J Exp Biol*; 42(8):816-22.

MATHUR, P.P., FRANCISPILLAI, M., VAITHINATHAN, S., AGARWAL, A. (2011). NF-κB in Male Reproduction: A Boon or a Bane? *The Open Reproductive Science Journal*, 3, 85-91.

MCLACHLAN, R.I., MALLIDIS, C., MA, K., BHASN, S., DE KRETSER, D.M. (1998). Genetic disorders and spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev*; 10:97-104.

MEANS, A.R., DEDMAN, J.R., TASH, T.S., TINDALL, M.J, VAN SICKLE, M., WELSH, M.J. (1980). Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulating hormone. *Annu Rev Physiol*, 42:59–70.

MENG, J., HOLDCRAFT, RW., SHİMA, JE., GRISWOLD, MD., BRAUN, RE. (2005). Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. Proc. Natl Acad. Sci. USA; 102:16696–16670.

MIAO, H., GALE, NW., GUO, H., QIAN, J., PETTY, A., KASPAR, J., MURPHY, AJ., VALENZUELA, DM., YANCOPOULOS, G., HAMBARDZUMYAN, D., LATHIA, JD., RICH, JN., LEE, J., WANG, B. (2015). EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivothrough cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene;* 34, 558–567.

MICHELLE W M, LI., WEILIANG, XIA., DOLORES D, MRUK., CLAIRE Q F, WANG., HELEN H N,YAN., MICHELLE K Y, SIU.,WING-YEE, LUI., WILL M, LEE., C YAN, CHENG. (2006). Tumor necrosis factor a reversibly disrupts the blood–testis barrier andimpairs Sertoli–germ cell dhesion in the seminiferous epithelium ofadult rat testes. *Journal of Endocrinology*; 190, 313–329.

MICUIC, S. (1983). The effect of the gametogenesis on serum FSH, LH and prolactin levels in infertile men. *Acta Eur Fertil*; 14:337.

MIQUEROL,L.,LANGILLE,BL., NAGY,A. (2000).Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. Development;127:3941–3946.

MORALES, C., CLERMONT, Y. (1993). Structural changes of the Sertoli cellduring the cycle of the seminiferous epithelium. In: Russell LD,Griswold MD, eds. The Sertoli Cell. Clearwater, FL: Cache RiverPress; 305–329.

MORALES, C.R., CLERMONT, Y. (1991). Phagocytosis and endocytosis in Sertoli cells of the rat. *Bull Assoc Anat* (Nancy) 75:157–162.

MORI, T.,MAEDA, M., INOUE, M., SEKIMOTO,R., TSUSHIMA,Y., ATSUDA,K., YAMAOKA,M., SUGANAMI,T., NISHIZAWA, H., OGAWA, Y., FUNAHASHI, T., SHIMOMURA, L. (2013).Novel Role for Adipose Ephrin-B1 in Inflammatory Response. PLOS ONE.

MRS. J. VIJAYALAKSHMI, M.SC., M.PHIL. (2005). Genetic Studies of Male Infertility. Ph.D/99-P.T./V/2005.

MRUK, D.D., CHENG, C. Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 25(5):747–806.

MRUK, DD., CHENG, CY. (2000). Sertoli cell proteins in testicular paracriny. Testis, epididymis and technologies in the year 2000. Berlin: Springer–Verlag; p. 197–228.

MRUK, DD., CHENG, CY. (2004). Cell–cell interactions at the ectoplasmicspecialization in the testis. Trends Endocr Metab;15:439–47.

MRUK, DD., CHENG, CY. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. Endocrine Reviews 25(5): 747–806

MRUK, DD., CHENG, CY. (2004). Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ cell interactions and their significance in germ cell movement in theseminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocr Rev; 25:747–806.

MRUK, DD., CHENG, CY. (2004). SERTOLİ–SERTOLİ AND SERTOLİ–GERM CELL İNTER-ACTİONS and their significance in germ cell movement in theseminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocr Rev; 25:747–806.

Mruk, DD., SILVESTRINI, B., CHENG, CY. (2008). ANCHORİNG JUNCTİONS AS DRUG TARGETS: role in contraceptive development. Pharmacol. Rev; 60:146–180.

MUNELL, F., SUÁREZ-QUIAN, CA., SELVA, DM., TIRADO, OM., REVENTÓS, J. (2002). Androgen-binding protein and reproduction: where do we stand? J Androl. Sep-Oct;23(5):598-609.

NATHANSON, K.L., KANETSKY, P.A, HAWES, R., VAUGHN, D.J., LETRERO, R., TUCKER, K. et al. (2005). The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet*. 77(6): 1034–1043.

O'BRYAN, MK., Hedger, MP. (2008). Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Austin, TX: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media; p. 92-114.

O'DONNELL, L., NICHOLLS,P.K., O'BRYAN, M.K., MCLACHLAN,R.İ., STANTON, P.G. (2011). Spermiation The process of sperm release. *Landes Bioscience*, 1:1, 14-35.

OKADA, T. *et al.(2001).*Mononuclear platinum(II) complex with 2-phenylpyridine ligands showing high cytotoxicity against mouse sarcoma 180 cells acquiring high cisplatin resistance. *J. Med. Chem;* **44**, 661–4667.

ÖZGÖK, Y., KİLCİLER, M., DURMUŞ, M., TAHMAZ, L., SOYDAN, H., ERDURAN, D. (2011). Oligospermik hastalarda yardimci üreme teknikleriöncesinde sperm fonksiyonlarinin düzenlenmesi. *Türk Üroloji Dergisi*: 27 (3): 300-307, 2001

PARVINEN, M. (1982). Regulation of the seminiferous epithelium. Endocr Rev; 3:404–17.

PARVINEN, M. (1982). Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev,* 3:404–417.

PARVINEN, M., PELTO-HUIKKO, M., WER, O., SCHULTZ, R., KAIPIA, A., MALI, P., TOPPARI, J., HAKOVIRTA, H., LÖNNERBERG, P., RITZÉN, EM., EBENDAL, T., OLSON, L., HDKFELT, T. AND PERSSON, H. (1992).Expression of ß-Nerve Growth Factor and Its Receptor in Rat Seminiferous Epithelium: Specific Function at the Onset of Meiosis. *The Journal of Cell Biology;* 117; 3;629-641.

PENTIKAINEN, V., et al. (2001). TNF-alpha down-regulated the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. J. Clin. Endocrinol. Metab.; 86:4480–4488.

PÉREZ-CRESPO, M., PINTADO, B., GUTIÉRREZ-ADÁN,A. (2007). Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev*; 75(1): 40-47.

PITETTI, J., CALVEL, P., ZIMMERMANN.C., CONNE, B.,MARILENA, D.,PAPAIOANNOU, AUBRY, F., CHRISTOPHER, R., CEDERROTH., URNER, F., FUMEL, B., CRAUSAZ, M., DOCQUIER, M., HERRERA, P., PRALONG, F., GERMOND, M., GUILLOU, F., JÉGOU,B., SERGE, NE. (2013). An Essential Role for Insulin and IGF1 Receptors inRegulating Sertoli Cell Proliferation, Testis Size, and FSH Action in Mice. Molecular Endocrinology;27: 814 – 827.

POCCIA, D. (1986). Remodeling of nucleoproteins during game- togenesis, fertilization and early development. *Int. Rev. Cytol*. 105: 1–65.

POONGOTHA.J., GOPENATH, T.S., MANONAYAKİ S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*; 50(4): 336.

POTTS, J.M., SHARMA, R., PASQUALOTTO, F., NELSON, D., HALL, G., AGARWAL, A. (2000). Association of ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol*; 163(6):1775-78.

REBECCA C, BOTT., RYANN M, MCFEE., DEBRA T, CLOPTON., CANDICE, TOOMBS., ANDREA S, CUPP.(2006). Vascular Endothelial Growth Factor and Kinase Domain Region Receptor Are Involved in Both Seminiferous Cord Formation and Vascular Development During Testis Morphogenesis in the Rat. *Biol Reprod*; 75(1): 56–67.

REPPİNG, S, SKALETSKY, H, LANGE, J, SILBER, S., VAN DER VEEN, F., OATES, R.D, PAGE, D.C., ROZEN, S. (2002). Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chro-mosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet*; 71: 906-22.

RIBOLDI, M., RUBIO, C., PELLICER, A., GIL-SALOM, M., AND SIMON, C. (2012) In vitro production of haploid cells after coculture of CD49f D with Sertoli cells from testicular sperm extraction in non obstructive azoospermic patients. *Fertil Steril*; 98:580 – 90.

RICE, AD., PATTERSON, K., WAKEFIELD, LB., REED, ED., BREDER, KP., WURN, BF., KING, III R., WURN, LJ. (2015). Ten-year Retrospective Study on the Efficacy of a Manual Physical Therapy to Treat Female Infertility. *Altern Ther Health Med.* 2015 May-Jun;21(3):36-44**.**

RICHENS, J. (2004). Main presentations of sexually transmitted infections in men. *BMJ*; 328:1251-3.

ROSEMARY, A., BAYNE, L., SHARON, L., EDDIE., CRAIG, S., COLLINS., ANDREW, J., CHILDS., HENRY, N., JABBOUR., RICHARD,A., ANDERSON, J., CLIN. (2009). Prostaglandin E 2 as a Regulator of Germ Cells during Ovarian Development. Endocrinol Metab; 94: 4053–4060.

RUF, J., CARAYON, P. (2006). Structural and functional aspects of thyroid peroxidase *Arch. Biochem Biophys;* **445** (2): 269–77.

RUSE M AND KNAUS UG. (2006). New players in TLR-mediated innate immunity: PI3K and small Rho GTPases. *Immunol. Res*. 34: 33-48.

RUSSELL, L. (1977). Observations on rat Sertoli ectoplasmic (‘junctional’) specializations in their association with germ cells of the rat testis. Tissue Cell, 1977; 9:475–498.

RUSSELL, L. (1980). Sertoli–germ cell interactions: a review. Gamete Res; 3:179–202.

RUSSELL, L.D. (1977). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat*, 148:313–328.

RUSSELL, L.D. (1993). Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD, eds. The Sertoli Cell. Clearwater, FL: Cache River Press; 1–37.

RUSSELL, L.D. (1993). Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships. In: Russell LD, Griswold MD, eds. The Sertoli Cell. Clearwater, FL: Cache River Press; 365–390.

RUSSELL, L.D. (1993). Role in spermiation. In: Russell LD, Griswold MD, eds. The Sertoli Cell. Clearwater, FL: Cache River Press; 269–303.

RUSSELL, L.D., REN, H.P., SINHA HIKIM, I., SCHULZE, W., SINHA HIKIM, A.P. (1990). A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat*, 188:21–30.

RUWANPURA, S., MCLACHLAN, R., MATTHİESSON, K., MEACHEM, S. (2008) Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod;* 23(2):403–411.

SALEH, R.A, AGARWAL, A., SHARMA, R.K., NELSON, D.R., THOMAS, A.J. (2002a). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: A prospective study. *Fertil Steril*; (78):491-99.

SANTIEMMA, V., ROSATI, P., GUERZONI, C., MARIANI, S., BELIGOTTI, F., MAGNANTI, M., GARUFI, G., GALONI, T., FABBRINI, A. (1992).Human Sertoli cells in vitro: morphological features and androgen-binding protein secretion. J Steroid Biochem Mol Biol., Oct;43(5):423-9.

SARKAR, O., MATHUR, PP., CHENG, CY., MRUK, DD. (2008). interleukin 1 alpha (IL1A) is a novel regulator of the blood–testis barrier in the rat. Biol. Reprod.; 78:445–454.

SATO, T., YOKONISHI,T., KOMEYA, M., KATAGIRI, K., KUBOTA, Y., MATOBA, S., OGONUKİ, N., OGURA, A., YOSHİDA, S., OGAWA, T. (2012), Testis tissue explantation cures spermatogenic failurein c-Kit ligand mutant mice, *PNAS* vol. 109, no. 42, 16935.

SAUT, N., TERRİOU, P., NAVARRO, A., LEVY, N., MİTCHELL, M.J. (2000). The human Y chromosome genes BPY2, CDY1 and DAZ are not essential for sustained fertility. *Mol Hum Reprod*; 6: 789-93.

SCHAEFFER, A.J. (2003). Epidemiology and demographics of prostatitis. *Andrologia*; 35(5): 252-57.

SCHLEGEL, P., PALERMO, G., GOLDSTEİN, M., et al. (1997). Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperminjection for nonobstructive azoospermia. *Urolog,* 1997; 49:435.

SELICE, R., GAROLLA, A., PENGO, M., CARETTA, N., FERLIN, A., FORESTA, C. (2011) The response to FSH treatment in oligozoospermic men depends on FSH receptor gene polymorphisms. *Int J Androl.;* Aug;34(4):306-12.

SETCHELL, BP. (2008). Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Landes Bioscience/Springer Science+Business Media; Austin, TX:. p. 212-233.

SHALABY,F., ROSSANT, J., YAMAGUCHI, TP.,GERTSENSTEIN,M.,WU, XF., BREITMAN,ML., SCHUH, AC. (2002). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*; 376, 62 – 66.

SHARPE, R.M. (2000). Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br Med Bull.* 56(3):630-42.

SHARPE, RM. (1994). The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; p. 1363-1434.

SHEFI, S. TUREK, P.J. (2006). Definition and current evaluation of subfertile men. *Int Braz J Urol*; 32: 385-97.

SINGER, G., GRANGER, D.N. (2007). Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation*; 14:(4-5):375-87.

SINGH, K., SINGH, S.K., SAH, R., SINGH, I., RAMAN, R. (2005). Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population. *Int J Androl*; 28:115-9.

SIU MK., LEE WM., CHENG CY. (2003) The interplay of collagen iv, tumor necrosis factor-alpha,gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology*; 144:371–387.

SIU, ER., WONG, EW., MRUK, DD., PORTO, CS., CHENG, CY. (2009). Focal adhesion kinase is a blood–testis barrier regulator. Proc. Natl Acad. Sci. USA.; 106:9298–9303.

SIU, MK., LEE, WM., CHENG, CY. (2003). The interplay of collagen iv, tumor necrosis factor-alpha, gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. Endocrinology; 144:371–387.

SIU, MK., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2003). Adhering junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of beta1-integrin and focal adhesion complex-associated proteins. Endocrinology; 144:2141–2163.

SKINNER, M.K., GRISWOLD, M.D. (1980). Sertoli cells synthesize and se- crete transferrin-like protein. *J Biol Chem*, 255:9523–9525.

SKINNER, MK., NORTON, JN., MULLANEY, BP., ROSSELLI, M., WHALEY, PD., ANTHONY, CT. (1991) Cell-cell interactions and the regulation of testis function.*Ann N Y Acad Sci.;* 637:354-63.

SOKOL, RZ. (2009). Endocrinology of male infertility: evaluation and treatment. Semin. Reprod. Med.; 27:149–158.

STEINMAN, N., GAMZU, R., YOGEV, L., BOTCHAN, A., SCHREIBER, L., YAVETZ, H. (2001). Serum leptin concentrations are higher in azoospermic than in normozoospermic men. *Fertil Steril.* 75(4):821-2.

SUOMINEN, JS., WANG, Y., KAIPIA, A., TOPPARI, J. (2004). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promotes cell survival during spermatogenesis, and this effect can be blocked by infliximab, a TNF-alpha antagonist. Eur. J. Endocrinol.; 151:629–640.

SYED, V., et al. (1995). Residual bodies activate Sertoli cell interleukin-1alpha (IL-1alpha) release, which triggers IL-6 production by an autocrine mechanism, through the lipoxygenase pathway. Endocrinology; 136:3070–3078.

TAPANAINEN, J., AITTOMAKİ, K., MIN, J., VASKIVUO, T. and HUHTANIEMI, I. (1997) Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet:* 15:205–206.

TEMPLETON, A., FRASER, C., THOMPSON, B. (1990). The epidemiology of infertility in Aberdeen. *Br. Med.* J., 301, 148-152.

THONNEAU, P., MARCHAND, S., TALLEC, A., FERIAL, M.L., DUCOT, B., LANSAC, J et al. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions. *Hum Reprod*; 6(6):811-16.

THORBECKE, G.J., LIEM, H.H., KNIGHT, S., COX, K., MULLER-EBERHARD, U. (1973). Sites of formation of the serum proteins transferrin and hemopexin. *J Clin Invest*, 52:725–731.

TRES, L.L., KİERSZENBAUM, A.L. (1983). Viability of rat spermatogenic cells in vitro is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci* USA, 80:3377–3381.

TURNER, JR. (2009). intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat. Rev. Immunol; 9:799–809.

ULUĞ, M., SÜSLEYİCİ DUMAN, B., ARVAS ULUĞ, A., ÇAMLIBEL, T. (2006). Testiküler Azospermili Erkeklerde Y KromozomundaAzospermi Faktör Mikrodelesyonlar›n›n Polimeraz ZincirReaksiyonuyla Belirlenmesi. *Cerrahpafla Tıp Dergisi;* 37: 126 - 130

UYGUR, M.C., ARIK, A.I., EROL, D., OZER, E., USTÜN, H. (1999). Quantitative evaluation of biopty gun testis needle biopsy. Correlation between biopsy score of varicocele-bearingtestis and sperm count. *J Reprod Med.*;44(5):445-9.

VILCEK, J. (2003). The cytokines: an overview. The cytokine handbook. Academic Press, p. 3–18.

VISSENBERG, R., MANDERS, VD.' MASTENBROEK, S., FLIERS, E., AFINK, GB., RIS-STALPERS,C., GODDIJN M., BISSCHOP, PH.(2007). Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. Andrologia; 39(1):22-7.

VISSENBERG,R., MANDERS, VD., MASTENBROEK,S., FLIERS, E.,AFINK, GB., RIS-STALPERS C., GODDIJN M.,BISSCHOP PH. () Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction.

VOGL, A.W., PFEIFFER, D.C., MULHOLLAND, D., KIMEL, G., GUTTMAN, J. (2000). Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. *Arch Histol Cytol*, 63:1–15.

VOGL, A; VAID, K; GUTTMAN, J. (2008). Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Landes Bioscience/ Springer Science+Business Media; Austin, TX: 2008. p. 186-211.

VOGT, P.H., EDELMANN, A., KIRSCH, S., et al. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet*; 5:933-43.

VON ECKARDSTEIN, S., SIMONI, M., BERGMANN, M., et al. (1999). Serum inhibin B in combination with serum follicles-timulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. J Clin Endocrinol Metab; 84: 2496-501.

WALKER, W.H. (2009). Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids*; 74: 602-7.

WALSH, SV., HOPKİNS, AM., NUSRAT, A. (2000). Modulation of tight junction structure and function by cytokines. Adv. Drug Deliv. Rev; 41: 303–313.

WANG, RS., et al. (2006) Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junction complex formation in mouse testes. Endocrinology; 147:5624–5633.

WANG, RS., et al. (2006). Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junction complex formation in mouse testes. Endocrinology; 147:5624–5633.

WANG, RS., YEH, S., TZENG, CR., CHANG, C. (2009). Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. Endocr. Rev.; 30:119–132.

WEBER, J.E., RUSSELL, L.D., WONG, V., PATERSON, R.N. (1983). Three dimen-sional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell relationships. *Am J Anat*, 167:163–179.

WEBER, JE., RUSSELL, LD., WONG, V., PETERSON, RN. (1983). Three dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell relationships. Am. J. Anat.; 167:163–179.

WEEDIN, J.W., BENNETT, R.C., FENİG, D.M., LAMB, D.J., LARRY, I. (2011). Early Versus Late Maturation Arrest: Reproductive Outcomes of Testicular Failure. *J Urol*; 186(2): 621–626.

WONG, CH., et al. (2005). Regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the seminiferous epithelium by focal adhesion-associated proteins in testosterone-suppressed rat testes. Endocrinology; 146:1192–1204.

WONG, CH., Mruk, DD., Lui, WY., Cheng, CY. (2004). Regulation of blood–testis barrier dynamics: an in vivo study. J. Cell Sci; 117:783–798.

WONG, CH., Mruk, DD., Lui, WY., Cheng, CY. (2004).Regulation of blood–testis barrier dynamics: an in vivo study. J. Cell Sci; 117:783–798.

WONG, CH., MRUK, DD., SİU, MK., CHENG, CY. (2005). Blood–testis barrier dynamics are regulated by alpha2-macroglobulin via the c-Jun N-terminal protein kinase pathway. Endocrinology, 2005.

WONG, EW., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2008). Par3/Par6 polarity complex coordinates apical ectoplasmic specialization and blood–testis barrier restructuring during spermatogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA.; 105:9657–9662.

WONG, V., RUSSELL, LD. (1983). Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: I. Methods, basic configuration, and dimensions. Am. J. Anat.; 167:143–161.

WONG, W.Y., MERKUS, H.M., THOMAS, C.M., MENKVELD, R., ZİELHUİS, G.A., STEEGERS-THEUNİSSEN, R.P. (2002). Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*; 77: 491-8.

World Health Organization (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 5th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

World Health Organization. (1992). The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril*; 57:1289-93.

World Health Organization. (2000). WHO manual for thestandardized investigation and diagnosis of the infertilecouple. Cambridge University Press, Cambridge.

WU, L., LIU, W., BAYAER, N., GU, W., SONG J. (2007). Exogenous leptin administered intramuscularly induces sex hormone disorder and Ca loss via downregulation of Gnrh and PI3K expression.

XIA, W., CHENG, CY. (2005). TGF-beta3 regulates anchoring junction dynamics in the seminiferous epithelium of the rat testis via the Ras/ERK signaling pathway: An in vivo study. Dev. Biol; 280:321–343.

XIA, W., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2005). Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis—a lesson to learn from the testis. Cytokine & Growth Factor Reviews 16, 469–493.

XIA, W., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2005). Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis—a lesson to learn from the testis. Cytokine Growth Factor Rev; 16: 469–493.

XIA, W., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2006). Differential interactions between transforming growth factor-beta3/TbetaR1, TAB1, and CD2AP disrupt blood–testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion. J Biol. Chem; 281:16799–16813.

XIA, W., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2006). Differential interactions between transforming growth factor-beta3/TbetaR1, TAB1, and CD2AP disrupt blood–testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion. J. Biol. Chem; 281:16799–16813.

XIA, W., WONG, CH., LEE, NP., LEE, WM., CHENG, CY. (2005). Disruption of Sertoli-germ cell adhesion function in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood–testis barrier integrity: an in vivo study using an androgen suppression model. J. Cell. Physiol.; 205:141–157.

XIA, W., WONG, EW., MRUK, DD., CHENG, CY. (2009). TGF-beta3 and TNFalpha perturb blood–testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis. Dev. Biol.; 327:48–61.

YAMAMOTO,H., OCHIYA,T., TAKAHAMA,Y., ISHII, Y., OSUMI,N., SAKAMOTO, H., TERADA,M. (2000) Detection of spatial localization of Hst-1/Fgf-4 gene expression in brain and testis from *adult mice*

YAMAMOTO, H., TEI, M., UEMURA, M., TAKEMASA, I., UEMURA,Y., MURATA, K., FUKUNAGA, M., OHUE, M., OHNISHI, T., IKEDA, K., KATO, T., OKAMURA, S., IKENAGA, M., HARAGUCHI, N., NISHIMURA, J., MIZUSHIMA, S., MIMORI, K., DOKI, Y., MORI, M. (2013). Ephrin-A1 mRNA is associated withpoor prognosis of colorectal cancer. INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY; 42:549-555.

YAN, HH., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2008). Blood–testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. FASEB J; 22: 1945–1959.

YAN, HH., MRUK, DD., LEE, WM., CHENG, CY. (2008). Blood–testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. FASEB J.; 22:1945–1959.

YAN, W. (2009). Male infertility caused by spermiogenic defects: Lessons from gene knockouts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 306,24–32.

YAN, W., SUOMINEN, J., TOPPARI, J. (2000). Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J Cell Sci*, 113:161–168.

YAO, PL., LIN YC, RICHBURG JH. (2009) TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to Sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2. *Biol. Reprod.*; 80:581–589.

YAO, PL., LIN, YC., RICHBURG, JH. (2009). TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to Sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2. Biol. Reprod.; 80:581–589.

YAO, PL., LIN, YC., RICHBURG, JH. (2010). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. Biol. Reprod.; 82:516–527.

YIN, LU., BN, LUO., JING, LI., DAIRECEIVED,J. (2015). Perfluorooctanoic acid disrupts the blood–testis barrier and activates the TNFα/p38 MAPK signaling pathway in vivo and in vitro. *Arch Toxicol* 10.1007, s00204-015-1492.

ZHANG, J., et al. (2005). Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics via changes in protein-protein interactions of the N-cadherin-beta-catenin protein complex which are possibly mediated by c-Src and myotubularin-related protein 2: an in vivo study using an androgen suppression model. Endocrinology; 146:1268–1284.

ZHANG, J., ETO, K., HONMYOU, A., NAKAO, K., KIYONARI, H., ABÉ,S.(2011). Development Neuregulins are essential for spermatogonial proliferationand meiotic initiation in neonatal mouse testis. Biologists Ltd; 138, 3159-3168.

ZHANG, JD., ETO, K., HONMYOU, A., NAKAO, K., KİYONARİ H. AND ABÉS. (2011). Neuregulins are essential for spermatogonial proliferation and meiotic initiation in neonatal mouse testis.*Development;* 138, 3159-3168.

ZINI, A., BUCKSPAN, M., JAMAL, M., JARVI, K. (1999). Effect ofvaricocelectomy on the abnormal retention of residualcytoplasm by human spermatozoa. *Hum Reprod*, 14:1791–1793.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER



Adı Soyadı : Somayyeh HEİDARGHOLİZADEH
Doğum Yeri ve Tarihi : Khalkhal 28/04/1984
Cinsiyet : Kadın
Uyruk : İran

İLETİŞİM BİLGİLERİ

Ev Adresi : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Morfoloji binası 2. kat Tıbbi Biyooji Anabilim Dalı Sıhhiye/Ankara 06100

Tel : 0535 083 6320

Mail : ayda_turkan@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Kayıt yılı:2012 güz dönemi.
Üniversite	İran Mohageg ARDABİLİ Üniversitesi Biyoloji Bölümü 2002-2006 yılları arası
Lise	Alzahra okulu 2002 mezenuyumİran/Khalkhal

YABANCI DİL BİLGİSİ

İngilizce ve Türkçe

KARİYER HEDEFİ

Tıbbi Biyoloji bölümünde yüksek lisans yapıyorum.Doktorayı da Tıbbi Genetik bölümünde devam etmek istiyorum.Bir genetik laboratuvarı kurma amacıyla sitogenetik ve moleküler genetiği iyi derecede öğrenmek istiyorum.

İŞ TECRÜBESİ

- 2007-2008 yılları arası biyoloji öğretmeni olarak çalıştım
- 2008-2009 yılları arası sitogenetik laboratuvarında harvest ve analiz kısmında çalıştım.

BİLGİSAYAR BİLGİSİ

MS Windows (İyi Düzeyde)
MS Office (İyi Düzeyde)
Perl primer
Primer Premiere 6
Endnote Bibliography

Mesleki Deneyimi

Ankara Üniversitsi Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji Lab. (Proje Destek Uzmanı)

REFERANSLAR

Prof.Dr. Asuman SUNGUROĞLU	Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı. asungur@medicine.ankara.edu.tr
Prof.Dr.A.Fulya TEKEŞN	Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.Öğretim üyesi fteksen@medicine.ankara.edu.tr
Yrd.Doç.Dr.Sena AYDOS	Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı saydos@ankara.edu.tr

Teknikler

İzolasyon teknikleri (DNA, RNA,...)

Pcr çeşitleri (ASO, real time pcr,normal pcr)

CDNA sentezi

RFLP

Hücre kültürü

Flow Sitometri

Harvest

Kromozom Analizi

COMET

Modifikasyon

Western blot

Elektrofrez

RT-PCR

Katıldığım kongreler

Ankara Üniversitesi Biyokimya Günleri

Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Kongresi

Hacettepe Üniversitesi Next Generation Sequence Kongresi ve Kursu

Bilimsel Etkinlikleri

Seminerler:

DNA repair dyregulation from cancer driver thrapeutic target

Prostat kanseri ve Prostazomlar

Projeler:

“Azoospermik olgulardan elde edilen yuvarlak spermatidlerin in vitro maturasyonu ve Non Obstruktif Azospermi (NOA), Obstrüktif Azospermi (OA) olgularından elde edilen Sertoli hücrelerinin, sitokin ifade düzeylerinin karşılaştırmalı analizi” başlıklı tübitak 3001 projesi

Poster:

FEBS POSTER

A. Karadag1, S. Aydos1, T. Ozkan1, B. Altinok1, M. Bunsuz1,

S. Heidargholizadeh1, K. Aydos2 and A. Sunguroglu1

The role of MDR1 C3435T single nucleotide polymorphism in male infertility. 2012 FEBS Sevilla/spain. Volume 279 Supplement 1 September 2012

S.E. Aydos, A. Karadağ, T. Özkan1, B. Altınok, M. Bunsuz, **S. Heidargholizadeh,** K. Aydos3 and A. Sunguroğlu, Association of MDR1 C3435T and C1236T single nucleotide polymorphisms with male factor infertility Genetics and Molecular Research 14 (2): 6330-6339 (2015).