TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERMATOGENEZDE ROL OYNAYAN HÜCRESEL MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI

YUNUS YÜKSELTEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Oya Sena AYDOS

2018- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERMATOGENEZDE ROL OYNAYAN HÜCRESEL MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI

YUNUS YÜKSELTEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Oya Sena AYDOS

2018- ANKARA

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "**Spermatogenezde Rol Oynayan Hücresel Moleküler Mekanizmaların Araştırılması"** başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yunus YÜKSELTEN
Tarih: 24.01.2018
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında

Yunus Yükselten tarafından hazırlanan

"**Spermatogenezde Rol Oynayan Hücresel Moleküler Mekanizmaların Araştırılması**"
adlı tez çalışması

Aşağıdaki Jüri tarafından **DOKTORA** tezi olarak **OY BİRLİĞİYLE** kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof. Dr. Belgin ATAÇ
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Raportör

İmza

Doç. Dr. O. Sena AYDOS

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Üye

İmza

Doç Dr.Ömer GÜLPINAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı
Üye

İmza
Doç. Dr.Ahmet Hakan
HALİLOĞLU
Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı
Üye

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

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii

Kabul ve Onay iii

İçindekiler iv

Önsöz viii

Simgeler ve Kısaltmalar x

Şekiller xii

Çizelgeler xv

1.GİRİŞ 1

1.1. Erkek İnfertilitesi 1

1.2.Primer Spermatogenik Yetmezlik 3

1.2.1.Spermatogenik yetmezlik nedenleri 4

1.3. Infertilitede Genetik Bozukluklar 6

1.3.1. Kromozomal Bozukluklar 6

1.3.2.Cinsiyet kromozom anomalileri(Klinefelter sendromu ve varyantları (46, XY; 47, XXY; 47,XXY mozaizmi) 6

1.3.3. Otozomal anomaliler 7

1.3.4.Genetik bozukluklar 8

1.3.4.1. X ‘e bağlı genetik bozukluklar ve erkek fertilitesi 8

1.3.4.2.Kalmann Syndromu 8

1.3.4.3.Androjen duyarsızlığı sendromu 8

1.3.4.4. Y genleri ve erkek infertilitesi. 9

1.3.4.5.Kistik fibrozis mutasyonları ve erkek infertilitesi 10

1.4. Erkek İnfertilitesinin Genetik Olmayan Nedenleri 11

1.4.1. Biyokimyasal Faktörler / Hormonlar 12

1.4.2.Çevresel Ve Yaşamsal Faktörler 12

1.4.2.1.Oksidatif Stres ve İnfertilite 13

1.4.3. İmmünolojik Faktörler 14

1.4.4.Epigenetik 14

1.5. İnfertil erkeğin değerlendirilmesi 15

1.5.1. Sperm frekans analizi 16

1.5.2. Semen Analizi 16

1.5.3. Hormonal analiz 17

1.5.4. Radyolojik değerlendirme 18
1.5.5. Testis biyopsisi 18
1.6. Spermatogenez, Spermatogonyumlar, ve spermiyogenez 19
1.6.1.Spermatogenez 19
1.6.2. Spermatogonyumlar 19
1.6.3. Seminifer epitelin spermatogenik dalgası 22
1.6.4.Spermatogenez Siklusunun Süresi 23
1.6.5. Spermatositler 24
1.6.6. Spermatid fazı 24
1.6.7. Spermiyogenez 24
1.6.7.1. Golgi fazı 26
1.6.7.2. Akrozomal faz 26
1.6.7.3. Olgunlaşma fazı 26
1.7. İnterstisyel doku ve leydig hücreleri 27
1.7.1.SertoliHücresi 28
1.8. Spermatogenezin Regulasyonu 30
1.8.1. Normal Spermatogenez 33
1.8.2. Sertoli Cell Only (Germ Hücre Aplazisi) 34
1.8.3. Hipospermatogenez 35
1.8.4. Maturasyon Arresti 36
1.8.5. Testiküler Atrofi ve Fibrozis 36
1.9. Spermatogonyal Kök Hücreler 36
1.10. Spermatogonyal Kök Hücre Nişi 38
1.11. Spermatogonyal Kök Hücrelerin Regülasyonu ve Spermatogonya Fonksiyonları 41
1.12. Spermatogonyal kök hücre belirteçleri; CD133 43
1.12.1. CD133 splice varyantları 44
1.12.2. CD133- Glikoformları 44
1.12.3. CD133'ün İşlevi 46
1.13. Amaç 47

2. GEREÇ VE YÖNTEM 49

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar 49
2.1.1. Hasta Materyali 49
2.1.2. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonunda Kullanılan Malzemeler 50

2.1.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinde Kullanılan Malzemeler 50
2.1.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler 51
2.1.5. Custom Human spermatogonyal Stem CellPCR Array Ve Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz ZincirReaksiyonu (Quantitive RT-PCR) Yönteminde Kullanılan Malzemeler 51
2.2. RNA İzolasyonu 51
2.2.1. Homojenizasyon 52
2.2.2. Faz Ayrımı 52
2.2.3. RNA Presipitasyonu 52
2.2.4. RNA Yıkaması 52
2.2.5.RNA'nın sulandırılması 53
2.2.6. RNA Kantitasyonu 53
2.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi 53
2.3. RT² Profiler'ı ™ PCR Dizi Sistemi 53
2.4. Protein İzolasyonu 55
2.4.1. Homojenizasyon 56
2.4.2. Protein Kaynatma 56
2.5. Western Blot 57
2.5.1. Jelin Hazırlanması ve Proteinlerin Yürütülmesi 57
2.5.2. Transfer 58
2.5.3. Bloklama 58
2.5.4. Antikor ile Muamele 58
2.5.5. Görüntüleme 58
2.5.6. Hesaplama 59
2.6. İmmünhistokimyasal Yöntem 60
2.7. Sertoli hücre kültürü 60
2.8. Lazer tarmalı Konfokal Mikroskopta İmmunfloresan görüntüleme 61
2.9. Sonuçların Değerlendirmesi 61

3. BULGULAR 63
3.1. Histopatoloji Sonuçlarına Göre Hastaların Değerlendirilmesi 63
3.2. Spermatogonyal Kök Hücre Gen İfadelerinin Analizi 65
3.2.1.CD90 (THY-1) Gen İfadelerinin Analizi 67
3.2.2. CD117 (c-Kit) Gen ifadelerinin analizi 68
3.2.3. CD29 (ITGβ-1) Gen ifadelerinin analizi 69

3.2.4. CD133 (PROM 1) Gen ifadelerinin analizi 69
3.2.5.ID1 (Inhibitor of DNA-1) Gen ifadelerinin analizi 70
3.2.6. CD24 Gen ifadelerinin analizi 71
3.2.7. CD49f (ITGα6) Gen ifadelerinin analizi 72
3.2.8. DNM-2 (Dinamin 2) Gen ifadelerinin analizi 73
3.2.9. LİN28A Gen ifadelerinin analizi 74
3.2.10. POU5F1 Gen ifadelerinin analizi 74
3.3. CD133 geninin Western Blot Analizi ile protein ekspresyonlarının analizi 75
3.4. İmmunohistokimyasal Analiz 76
3.5. İmmunfloresan Boyama 78

4. TARTIŞMA 81
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 112
ÖZET 115
SUMMARY 116
KAYNAKLAR 117
EKLER 131
Ek-1 Etik Raporu 131
ÖZGEÇMİŞ 133

ÖNSÖZ

İnsan üreme sağlığında infertilitenin nedenleri araştırıldığında son verilere göre % 40 erkek kaynaklı, % 40 bayan kaynaklı, % 20 olarakta her iki çifte ait nedenlerden dolayı gerçekleştiği bildirilmektedir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %30'unda infertiliteye sebep olan faktör bilinmemektedir. Azoospermik hastaların %13'ünde azoospermi nedenleri bilinmemektedir. Dünyada erkek infertilitesinin etyolojisinin aydınlatılması ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda erkek infertilitesinde spermatogonyal kök hücrelerin varlığı ve tanımlanması üzerine yoğunlaşılmıştır.

Bu tez çalışmasında erkek infertilitesinin etyolojisinin aydınlatılmasında Spermatogonyal Kök hücrelerin tanımlanması ve bu belirteçlerin spermatogenez defektlerindeki etkilerinin belirlenmesi için, germ hücre proliferasyonu, diferensiyasyonu ve hücre canlılığında rol oynayan spermatogonyal kök hücreleri tanımlayacak yeni biyobelirteçler ve bu belirteçlerin spermatogenez defektleri ile olan ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçlara yönelik olarak, planladığımız çalışmada, azoospermik hastalarda yeni spermatogonyal kök hücre belirteçlerinin tanımlanması gerçekleştirilmiş ve bu belirteçlerin spermatogenez defektleri ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Erkek infertilitesinin etyolojisinin aydınlatılmasına yönelik yeni bir biyobelirteç olarak CD133 geni detaylı bir şekilde tanımlanmıştır.

Bana tez çalışmamı gerçekleştirme fırsatı tanıyan ve bu süreçte bilgisiyle, tecrübesiyle ışık tutan, desteğiyle hep yanımda olan sayın danışman hocam Doç.Dr. O.Sena AYDOS'a, erkek infertilitesi konusunda tecrübelerini, birikimlerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam sayın Prof.Dr. Kaan AYDOS'a, çalışmalarımız sırasında yardımlarını esirgemeyen ve her ihtiyacım olduğunda desteğini gördüğüm değerli hocam sayın Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na teşekkür ederim.

İmmunohistokimya analiziyle ilgili olarak bilgi birikimini paylaşan ve bize değerli zamanını ayıran Dr. Sanem ARIK'a teşekkür ederim.

Deneylerim esnasında yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Tülin ÖZKAN'a, istatistik analizlerinde yardımcı olan Nazmiye Kurşun'a teşekkür ederim. Çalışamalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ailesine teşekkür ederim

Bu tez çalışmamı hazırlamam sırasında bana verdikleri sonsuz destek, gösterdikleri fedakarlıktan dolayı değerli eşim ve minik Zehram &Yusufuma teşekkür ederim.

Akademik eğitimim ve gelişimimde üzerimde sonsuz emekleri olan canım anneme, babama, çok değerli kardeşlerime, çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AR	Androjen Reseptörü
AZF	Azoospermi Faktör
CBVDA	Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu
CFTR	Kistik fibrozis transmembran regulator
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNM2	Dinamin-2
EAU	Avrupa Üroloji Birliği
ES	Ektoplazmik spesifikasyon
FACS	Floresan aktivasyonu ile hücre ayırımı
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
FSH	Folikül stimülan hormon
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfodehidrogenaz
GDNF	Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
HH	Hipogonadotropik Hipogonadizm
HP	Hipospermatogenez
HRP	Horse Radish Peroksidaz
ICSI	İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu
ID1	Inhibitör of DNA
ITGA6	İntegrin alfa-6
ITGB1	İntegrin beta-1
IUI	İntrauterin inseminasyon
IVF	İn-vitro fertilizasyon
KS	Klinefelter Sendromu
KTB	Kan Testis Bariyeri
LH	Luteinizan hormon
MA	Marutasyon Arresti
MACS	Manyetik Hücre ayırıcı
MAR	Mix antiglobilin reaksiyonu
MESA	Mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu
NOA	Non-obstruktif azoospermi
OA	Obstrüktif Azoospermi
OAT	Oligo astheno teratozoospermi
OS	Oksidatif Stres
PESA	Perkütan epididimal sperm aspirasyonu
PGC	Primordiyal germ hücresi
POU5F1	POU Class 5 Homeobox 1
PRL	Prolaktin

PROM1	Prominin-1
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Real Time Polimeraz zincir reaksiyonu
SCF	Kök Hücre Faktör
SCO	Sertoli Cell Only Sendromu
SKH	Spermatogonyal Kök Hücre
T	Testesteron
TESE	Testiküler sperm ekstraksiyonu
TGFb	Transforme edici büyüme faktörü
THY1	CD90, Hücre yüzeyi antijeni
TJ	Sıkı Bağlantı
TRUS	Transrektal ultrason
ÜYT	Üremeye Yardımcı Teknikler
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.Y-kromozomunun uzun kolu (Yq) üzerinde, tekrarlayan delete bölgeler Azoospermia Faktor (AZF) AZFa, AZFb, ve AZFc olarak sıralanabilir. Bu bölgelerden delesyon görülen kısıma göre değişik patolojik sonuçlar ortaya çıkmaktadır. AZFabc (SCO), AZFa (SCO), AZFbc (SCO / maturasyon arresti), AZFb (maturasyon arresti), AZFc (azoospermi ağır oligospermi) şeklinde klinik sonuç doğurmaktadır (Flannigan ve Schlegel, 2017) 10

Şekil 1.2. ROS'un sperm fizyolojisi üzerine olan etkileri 14

Şekil 1.3. Kromatin yeniden modellenmesi ve epigenetik modifikasyon, spermatogenez, fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi sırasında değişir. **A.** Spermatogenez, fertilizasyon ve embriyogenez sırasında kromatin yeniden modelleme süreci. Kromatin yeniden modellenme süreci esas olarak spermiyogenez sırasında ve döllenmeden sonra kromatin yoğunlaşması ve dekondensasyonu ile oluşur. Spermatidlerin, spermatozoa dönüşümü olan spermiyogenez sırasında çekirdekte histon proteinleri kromatin yoğunlaşmasına yol açan protamin ile yer değiştirir. Fertilizasyondan sonra, pronükleer formasyondan önce, kromatin dekondensasyonuyla, protamin-histon arası değişim meydana gelir, maternal türevli histonlar sperm protaminleri ile değiştirilir. **B.** Bazı epigenetik modifikasyonların spermatogenez, fertilizasyon ve embriyogenez sırasında dönüşümü. DNA metilasyonu, H3K4 metilasyonu, H3K9 metilasyonu ve H3K27 metilasyonu gibi bazı epigenetik modifikasyonların dönüşümü, sperm üretimi ve erken embriyo gelişimi için gereklidir. Bu epigenetik modifikasyonlar, spermatogenez, fertilizasyon ve embriyogenez süreçlerinde önemli olayları kontrol eden faza spesifik gen ifadelerini düzenlemek için işbirliği içinde çalışırlar 15

Şekil 1.4.Erkek üreme sistemi, Spermatognez ve aşamaları 22

Şekil 1.5.Seminifer epitel döngüsü, seminifer tübülün uzunluğu boyunca ardışık safha evrelerinin düzenlemesi ile gerçekleştirilir. Undiferansiye Spermatogonya: **Kırmızı**; undiferansiye A1 spermatogonia **mavi;**, preleptoten spermatositler: **yeşil**; paktien spermatositler: **mor**; yuvarlak veya uzayan spermatidler: **turuncu**; uzun spermatidler: **koyu mavi** 24

Şekil 1.6. Sertoli hücreleri ile oluşturulan niş, spermatogenezin düzenlenmesinde çok kritik öneme sahiptir. Spermatogonial kök hücreler, seminifer tübüllerin taban zarında bulunur ve lümende sperm üretimi ve olgun spermlerin lümene salınması için Sertoli hücrelerinin komşuluğunda bir takım hücre bölünmelerini gerçekleştirir. SKH'ler niş faktörleri tarafından düzenlenen kendini yenileme ve farklılaşma dengesi içindedir. Örneğin, Sertoli hücreleri tarafından üretilen Glial türevi nörotrofik faktör (GDNF), fibroblast büyüme faktörü 9 (FGF9), retinoik asit (RA) ve kök hücre faktörü (SCF) SKH'de kendini yenileme, farklılaşma ve mayoz bölünme indüksiyonu da dahil olmak üzere farklı hücresel olayların gerçekleşmesinde rol oynar. ES: ektoplazmik spesifikasyon 39

Şekil 3.1. TESE biyopsilerinin histopatolojik görüntülenmesi; Obstruktif azoospermi, Hipospermatogenez, Maturasyon Arresti, Sertoli Cell Only Sendromu 64

Şekil 3.2. TESE dokularından elde edilen RNA örneklerinin %1'lik agoroz jel elektroforez görüntüsü. ***OA:*** *Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez* ***MA:*** *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu* 65

Şekil3.3. Yapılan RT-PCR analizinde yapılan erime eğrisi analizi. Hedef bölgenin doğruluğu ve farklı bir pik vermemesi nedeniyle doğru bölgenin analizinin yapıldığı gözlemlenmiştir 67

Şekil 3.4. CD133 ve GAPDH protein ifadelerinin western blot analizi.***OA:*** *Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez* ***MA:*** *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu* 76

Şekil 3.5. CD133'ün İmminohistokimyasal analizi. OA grubunda orta düzeyde geniş yayılımlı tutulum, HP grubunda çok hafif tutulum, MA ve SCO grubunda tutulum görünmemektedir 77

Şekil 3.6. Sağlıklı spermde nükleus (Kırmızı) ve mitotreaker (Yeşil) boyaması 78

Şekil 3.7. Sağlıklı sperm hücrelerinde CD133 Lazer taramalı konfokal mikroskop immunfloresan görütüsü. CD133-PE: Kırmızı, Mitotreaker FM: Yeşil, DAPI: Mavi 79

Şekil 3.8. Sağlıklı ticari Sertoli hücrelerinde yapılan lazer taramalı konfokal mikroskop görüntü analizi. CD133-PE: Kırmızı Mitotraker FM: Yeşil, DAPI: Mavi 80

Şekil 4.1. Spermatogonyal kök hücre belirteci için gen ekspresyonlarının NOA grupları arasındaki dağılımını gösteren heatmap analizi. Z-skoru satırından etkilenen renkler, genlerin spesifik kat artışları veya azalışlarındaki profili göstermektedir. Kırmızı / yeşil renklenme, gruplar arasında kök hücre belirteçlerin gen ifadelerindeki kat artışlarının daha yüksek / düşük ifade edildiğini gösterir 108

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. 10.469 hastada Erkek infertilitesi nedenleri ve buna bağlı faktörler ve dağılım yüzdeleri 2

Çizelge 1.2. Semen değerleri için düşük referans aralıkları 3

Çizelge 1.3. İnfertilite şikayeti ile başvuran hastaların dağılımı 5

Çizelge 1.4. 2017 verilerine göre CFTR Mutasyon tipleri 11

Çizelge 1.5. Kistik fibrozise ait en az bir alel üzerinde bulunan mutasyon yüzdeleri 11

Çizelge 1.6. Dünya sağlık örgütünün kriterlerine göre yıllar içinde güncellenmiş Semen Parametreleri 17

Çizelge 2.1. c-DNA sentez protokolü 54

Çizelge 2.2. qRT-PCR protokolü 55

Çizelge 3.1. Histopatoloji sonuçlarına göre gruplandırılmış hastaların yaş, FSH ve Testesteron değerleri 63

Çizelge 3.2. OA ve NOA grubu hastaların yaş, FSH ve Testesteron değerleri 63

Çizelge 3.3. Tez çalışmasında analizi yapılan Spermatogonyal Kök Hücre belirteçleri 65

Çizelge 3.4. CD90 (THY1) gen ifadelerinin RT-PCR analizi 67

Çizelge 3.5. CD117 (c-Kit) gen ifadelerinin RT-PCR analizi 68

Çizelge 3.6. CD29 (ITGβ1) gen ifadelerinin RT-PCR analizi 69

Çizelge 3.7. CD133 (PROM1) gen ifadelerinin RT-PCR analizi 70

Çizelge 3.8. ID1(Inhibitor of DNA 1) gen ifadelerinin RT-PCR analizi 70

Çizelge 3.9. CD24 gen ifadelerinin RT-PCR analizi 71

Çizelge 3.10. CD49f (ITGα6) gen ifadelerinin RT-PCR analizi 72

Çizelge 3.11. DNM2 (Dinamin 2) gen ifadelerinin RT-PCR analizi 73

Çizelge 3.12. LİN28 gen ifadelerinin RT-PCR analizi 74

Çizelge 3.13. POU5F1 (OCT3/4) gen ifadelerinin RT-PCR analizi 75

1.GİRİŞ

1.1. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, 1 yıl süreyle herhangi bir korunma olmadan, cinsel ilişki olmasına rağmen çiflerin çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır (Poongothai ve ark., 2009, Hamada ve ark., 2012). İnfertilite, çiftler arasında birlikteliği etkileyen bir durumdur. Çocuk sahibi olmak isteyen infertil çiftlerin yaklaşık % 40'ında erkeğe ait nedenler bulunur. Çoğu infertil çiftte, hem erkeğe hem de kadına ait faktörler (% 20) birarada bulunmaktadır. Erkek fertilitesini azaltan nedenlerin aşağıda sıralanan faktörler olabileceği bildirilmektedir;

- Doğuştan veya sonradan gerçekleşen ürogenital anormaliler
- Malignansiler
- Ürogenital sistem enfeksiyonları
- Artan skrotal sıcaklık (örn: Varikoselin bir sonucu olarak)
- Endokrin bozukluklar
- Genetik anomaliler
- Immünolojik faktörler

İnfertilite vakalarının % 30-40'ında erkek infertilitesine bağlı bir neden bulunamaz, bu durum nedeni bilinmeyen (idiyopatik) erkek infertilitesi olarak adlandırılmaktadır. Bu bireylerde fertiliteyi etkileyen herhangi bir hastalık öyküsü bulunmamaktadır. Yapılan tetkiklerde fiziki muayene, endokrin, genetik ve biyokimyasal laboratuvar analiz testlerinde normal bulgulara sahiptir. İdiyopatik erkek infertilitesinin, çevresel kirlilik, reaktif oksijen türleri, genetik ve epigenetik anomalilerin bir sonucu olarak endokrin bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden kaynaklandığı varsayılmaktadır. Çizelge 1.1'de 10.469 infertil erkekte yapılan analizler sonucunda, erkek infertilitesiyle ilişkili faktörler özetlenmiştir (Jungwirth ve ark., 2012).

Çizelge 1.1. 10.469 hastada Erkek infertilitesi nedenleri ve buna bağlı faktörler ve dağılım yüzdeleri.

Teşhis	Seçilmemiş Hastalar (n=12,945)	Azoospermik Hastalar (n=1,446)
Tüm	100%	11,20%
Bilinen (Muhtemel) İnfertilite nedenleri	42,60%	42,60%
Maling İnmiş Testis	8,4	17,2
Varikosel	14,8	10,9
Sperm Otoantikorları	3,9	-
Testiküler Tümör	1,2	2,8
Diğerleri	5	1,2
İdiyopatik İnfertilite	30	13,3
Hipogonodizm	10,1	16,4
Klinefelter Sendromu (47,XXY)	2,6	13,7
XX Erkek	0,1	0,6
Primer Hipogonadizm	2,3	0,8
Sekonder hipogonadizm	1,6	1,9
Kallman Sendromu	0,3	0,5
İdiyopatik Hipogonodotropik Hipogonadizm	0,4	0,4
Hipofiz cerrahi sonrası kalıntı	<0,1	0,3
Diğerleri	0,8	0,8
Geç başlangıçlı Hipogonadizm	2,2	-
Ergenliğin yapısal gecikmesi	7,8	-
Genel Sistemik Hastalıklar	2,2	0,5
Malign hastalıklardan dolayı Kriyoprezervasyon	7,8	12,5
Testiküler Tümör	5	4,3
Lenfoma	1,5	4,6
Lösemi	0,7	2,2
Sarkoma	0,6	0,9
Ereksiyon/Ejekülasyon Bozukluğu	2,4	-
Tıkanıklık	2,2	10,3
Vazoktemi	0,9	5,3
Kistik Fibrozis	0,5	3,1
Diğerleri	0,8	1,9

Erkek infertilitesi için prognostik faktörler şunlardır:

• Kısırlık süresi

• Birincil veya ikincil infertilite

• Sperm analiz sonuçları

• Kadın partnerin yaşı ve fertilite durumu.

İnfertilite, gebeliğin hiç oluşmadığı durumda primer infertilite ve daha önce gebelik oluşmuş fakat sonrasında istendiği halde tekrar gebelik oluşamıyorsa sekonder infertilite olarak tanımlanmaktadır. Yapılan araştırmalarda infertil hastaların % 67-71'inde primer infertilite ve % 29-33'ünde sekonder infertilite olduğu

gözlemlenmiştir (Hamada ve ark., 2012, Irvine, 1998). Kadın yaşı, üreme sürecinde sonucu etkileyen en önemli tek değişkendir. 35 yaşındaki bir kadın 25 yaşındaki bir kadına kıyasla doğurganlık potansiyeli % 50'ye, 35 yaşındaki bir kadının 38 yaşına göre doğurganlık oranı % 25'e, 40 yaşın üzerinde doğurganlık oranı % 5'e düştüğü gözlemlenmiştir (Jungwirth ve ark., 2012). Tüm erkekler için fertilitenin standart değerlendirmesini tıbbi öykü ve fiziki muayene, skrotal ultrasonografi ve sperm analizi oluşturmaktadır.

Sperm analizinde referans değerlerle karşılaştırıldığında, anormallik gözlemleniyorsa mutlaka kapsamlı bir androlojik muayene yapılmalıdır (Çizelge 1.2). Önemli tedavi kararları semen analizinin sonuçlarına dayanır, bu nedenle laboratuvar çalışmalarının tamamının standartlaştırılması çok önemlidir. Ejekülat analizi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından standardize edilmiş ve WHO Laboratuvar ında İnsan Semeninin İncelenmesi ve İşlenmesi Kılavuzu (2010, 5. baskı) yayınlanmıştır (Cooper ve ark., 2010). WHO 2010 kriterlerine göre referans değerler çizelge 1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Semen değerleri için düşük referans aralıkları

Parametre	**Düşük Referans sınırı (Aralık)**
Semen Hacim(mL)	1,5(1,4-1,7)
Toplam Sperm Sayısı(milyon/Ejekülat)	39(33-46)
Sperm Konsantrasyonu (milyon/mL)	15(12-16)
Toplam motilite(hareketli+hareketsiz)	40(38-42)
İleri Hızlı	32(31-34)
Canlılık(canlı spermatozoa,%)	58(55-63)
Sperm Morfolojisi (Normal ,%)	4(3,0-4,0)
Diğer ortak eşik Değerleri	
Ph	>7,2
Peroksidaz- pozitif Lökosit(milyon/mL)	<1,0
Opsiyonel Araştırmalar	
MAR testi (bağlı parçacıkları olan motil spermatozoa,%)	<50
Seminal Çinko miktarı (µmol/ejakülat)	≥2,4
Seminal Fruktoz (µmol/ejakülat)	≥13
Seminal nötral glukozidaz(mU/ejekülat)	≤20

MAR= Mix antiglobulin reaksiyonu

1.2 Primer Spermatogenik Yetmezlik

Endokrin testiküler yetmezlik hipogonadizime neden olurken, ekzokrin testiküler yetmezlik olarak tanımlanan spermatogenik yetmezlik erkek infertilitesine yol açmaktadır. Spermatogenik yetmezliğe hipotalamik, hipofiz veya testiküler

rahatsızlıklar neden olabilir. Spermatogenik yetmezliğin çeşitli testiküler etyolojileri aynı histopatolojik paternlere neden olabilir. Bu anlamda, germ hücre aplazisi (Sertoli Cell Only-SCO), yuvarlak spermatidler, primer spermatositlerin veya spermatogonyumların farklı seviyelerindeki olgunlaşma blokajı (Maturasyon Arresti MA) ve hipospermatogenez (HP) gibi spermatogenik yetmezlik, normal spermatogenezisden açıkça ayırt edilmelidir.

1.2.1 Spermatogenik yetmezlik nedenleri

• Anorşi
•İnmemiş testis
• Kazanılmış faktörler (travma, testiküler torsiyon, tümör, cerrahi)
• Konjenital faktörler (testiküler disgenezi)
• Klinefelter sendromu
• Diğer kromozomal değişiklikler
• Post-enflamatuar (orşit)
• Komplet ve fokal germ hücre aplazisi (SCO),
• Radyasyon,
• Sitostatik ilaçlar
• Spermatogenik duraklama
• Testis tümörü
• Ekzojen faktörler (ilaç tedavileri, toksinler, radyasyon, sıcaklık)
• Sistemik hastalıklar (karaciğer sirozu, böbrek yetmezliği)
• Varikosel
• Testisin vaskülarizasyonunu bozabilecek cerrahiler
• İdiyopatik

Yapılan bir araştırmada 2383 hastadan oluşan infertil grubun % 48,4’ ünde tedaviye yanıt verebilecek bir patoloji saptanmıştır. Olguların dağılımı aşağıdaki Çizelge 1.3 ‘te belirtilmiştir (Esteves ve ark., 2011).

Çizelge 1.3.İnfertilite şikayeti ile başvuran hastaların dağılımı

Kategori	Sayı	%
Varikosel	629	26,4
Enfeksiyon	72	3
Hormonal	54	2,3
Ejakülasyon Bozukluğu	28	1,2
Sistemik Hastalık	11	0,4
İdiopatik (Bilinmeyen)	289	12,1
İmmünolojik	54	2,3
Obstrüksiyon	359	15,1
Kanser	11	0,5
İnmemiş Testis	342	14,3
Genetik	189	7,9
Testiküler Yetmezlik	345	14,5
Toplam	**2,383**	**100**

Spermatogenik yetmezliği bulunan bir hastanın öykü ve fizik incelemesinde saptanan tipik bulgular:

• Kriptorşidizm
• Testiküler torsiyon
• Genitoüriner enfeksiyon
• Testiküler travma
• Çevresel toksinlere maruz kalma
• Gonodotoksik ilaç tedavisi
• Radyasyon ya da kimyasallara maruz kalma
• Testis kanseri
• Testislerin olmayışı
• Anormal sekonder seks karekterleri
• Jinekomasti
• Kriptorşidizm
• Anormal testiküler volüm ve/veya kıvam
• Varikosel

Erkek infertilite etyolojisinin yaklaşık olarak % 40'ı idiyopatik olarak tanımlanmaktadır. İdiyopatik olgularda genetik faktörler, bu tip olguların büyük bir kısmından sorumludur (de Kretser, 1997). Yapılan çalışmalarda, nedeni bilinmeyen oligozoospermik ve azoospermik olgularda sayısal ve yapısal kromozomal

bozukluklara rastlandığı bildirilmiştir (Chandley, 1998). Oligozoospermik ve azoospermik hastalarda kromozomal bozuklukların oranının % 2-10 arasında olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur (Koulischer ve Schoysman, 1974). Azoospermi ve şiddetli oligospermi ile birlikte görülen genetik bozukluklar sperm yapısının bozulmasına veya hareketliliğini engelleyerek erkekte infertiliteye neden olabilir.

1.3 INFERTİLİTEDE GENETİK BOZUKLUKLAR

1.3.1 Kromozomal Bozukluklar

Anomali olasılığı spermatogenezdeki bozukluk ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Gelişen laboratuvar tekniklerinden olan *in vitro* fertilizasyon ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyon (IVF ve ICSI) teknikleri ile günümüzde, azoospermik erkeklerin çocuk sahibi olmalarında başarı şansı giderek artmaktadır. İnfertilite tedavisi düşünülen ve spermatogenezi bozuk tüm erkeklere standart karyotip analizi mutlaka önerilmelidir.

Kromozom anomalileri sayısal (örneğin trizomi) veya yapısal (örn. transversiyon veya translokasyonlar) olabilir. 9,766 infertil erkekte yapılan analizler sonucunda kromozomal anomali görülme sıklığı % 5,8 olarak hesaplanmış olup (Mercier ve ark., 1995) cinsiyet kromozom anomalisi % 4,2 otozomal anomali % 1,5 olarak saptanmıştır. Sperm sayısının <5 milyon / mL olan hastalarda, genel olarak, otozomal yapısal anomalileri, genel popülasyona kıyasla 10 kat daha fazla (% 4) görünmektedir (De Braekeleer ve Ferec, 1996,Chillon, 1995 #12).

Non-Obstrüktif Azospermi (NOA)'li erkekler, özellikle cinsiyet kromozom anomalileri açısından en yüksek risk altındadır.

1.3.2 Cinsiyet kromozom anomalileri (Klinefelter sendromu 47, XXY; 47,XXY mozaizmi)

Cinsiyet kromozom anomalilerinden en sık görüleni Klinefelter sendromudur. Klinefelter sendromlu erişkin erkeklerde, germ hücreleri bulunmayan, hacmi

küçülmüş ve büyük oranda skleroz yapıya sahip sert testisler bulunur. Fenotipleri normal erkek görünümünden, azalmış vücut kılı, epifiz plaklarının geç kapanmasına bağlı uzun kol ve bacakların görüldüğü fenotipe değişkenlik göstermektedir (Bojesen ve Gravholt, 2007). Klinefelter sendromlu erkeklere, yaş ilerledikçe androjen eksikliği nedeniyle hormon replasmanı yapılması gerekebilir.

Klinefelter sendromlu bireylerde, bozulmuş spermatogenez, tubuler skleroz ve Leydig hücre sayılarında bir artış söz konusudur. Klinefelter sendromunda ilk olarak germ hücrelerinin giderek kaybına yol açan spermatogenik aktivite azalması gözlemlenir. Spermatogenik aktivite azalmasını takiben germ hücre kayıpları, Sertoli hücrelerinin atrofisi ve tübül membranlarının kalınlaşması ile sonlanır.

Germ hücre varlığı ve sperm üretimi, mozaik Klinefelter 46, XY / 47, XXY erkeklerde değişkenlik göstermektedir (Schiff ve ark., 2005). TESE amacı ile testis biyopsisi yapılan Klinefelter sendromlu tüm bireyler endokrin açıdan takip edilmelidir.

1.3.3 Otozomal anomaliler

İnfertil çiftlerden erkek partnerin otozomal karyotip anomalisine sahip olduğu durumlarda çocuk sahibi olmak (IVF / ICSI dahil) isteyen tüm çiftlere genetik danışmanlık önerilmelidir. En sık rastlanan otozomal karyotip anormallikleri Robertsonian translokasyonlar, resiprokal karşılıklı translokasyonlar, parasentrik inversiyonlar ve marker kromozomlarıdır.

Kromozomal translokasyonların rolü erkek infertilitesinde çok iyi bilinmektedir (Martin, 2008). İnfertil erkekler translokasyonlar, inversiyonlar ve cinsiyet kromozom anomalileri gibi kromozomal anomalilere sahip spermatozoalara sahiptirler (McLachlan ve O'Bryan, 2010). Sperm parametrelerinde ciddi bozukluk görülen erkeklerin sitogenetik değerlendirmesinde yaklaşık % 13'ünde translokasyon ve anormal karyotipler, fertil kontrollerden anlamlı derecede daha sık olduğu gözlemlenmiştir (Peschka ve ark., 1999). Oligozoospermi olan 46 erkek ve ICSI uygulanan azoospermi olan 42 erkek üzerinde yapılan bir çalışmada, azoospermik grubun% 14,3'ünde ve oligozoospermik grubun % 6,5'inde kromozomal anormallikler gösterilmiş; bu yapısal değişikliklerin, çalışma gruplarının % 37,5'inde

olduğu bildirilmiştir (Nagvenkar ve ark., 2005).

Sperm, hem normal karyotipli hem de anomalili erkeklerde çok renkli FISH kullanarak kromozom anomalisi açısından incelenebilir. Spermdeki anöploidi, özellikle seks kromozom anöploidisi, spermatogenezde var olan ağır hasar ve translokasyonlar ile yakından ilişkilidir.

1.3.4 Genetik bozukluklar

1.3.4.1 X ‘e bağlı genetik bozukluklar ve erkek fertilitesi

Her erkekte tek bir X kromozomu bulunmaktadır. X‘e bağlı bir resesif bozukluk erkeklerde ortaya çıkar. Genetik defekt kız çocuklara aktarılır, ancak erkek çocuklara aktarılmaz.

1.3.4.2 Kalmann Sendromu

İnfertilitede görülen en sık X’e bağlı genetik bozukluk Kallmann sendromudur. En çok gözlemlenen formu Kalig-a gen mutasyonudur. Kallmann sendromunda otozomal dominant form daha az görülmektedir. Kallmann sendromlu hastalarda fenotipik olarak hipogonadotropik hipogonadizm bulunur. Bu fenotipe ek olarak hastalarda yarık damak, işitme kayıpları, böbrek fonksiyon bozuklukları, fasial asimetri, inmemiş testis ve renk körlüğü, gibi klinik özellikler de bulunabilir.

1.3.4.3 Androjen duyarsızlığı sendromu

Androjen Reseptör (AR) geni X kromozomunun p kolunda bulunur. AR genindeki mutasyonlar androjen hassasiyetinin azalmasına neden olabilmektedir. Tam androjen duyarsızlığına bağlı sendromun fenotipik özellikleri; dış genital bölgesinin dişi görünümde olması ve pubik tüylenme yokluğudur.

Parsiyel androjen duyarsızlığı sendromunda, fenotipler ağırlıklı olarak dişi fenotipten belirsiz genital görünüme kadar değişkenlik göstermekte olup, çoğunlukla mikro penis, perineal hipospadias ve kriptorşidizm ile birliktelik gösteren erkek fenotiptedir. Sözü edilen androjen direncinin şiddetli formlarında, etkilenen erkekler mevcut teknolojileri kullanarak kendi biyolojik çocuğunu üretemediği için sonraki nesile aktarılma durumu söz konusu değildir.

1.3.4.4 Y genleri ve erkek infertilitesi

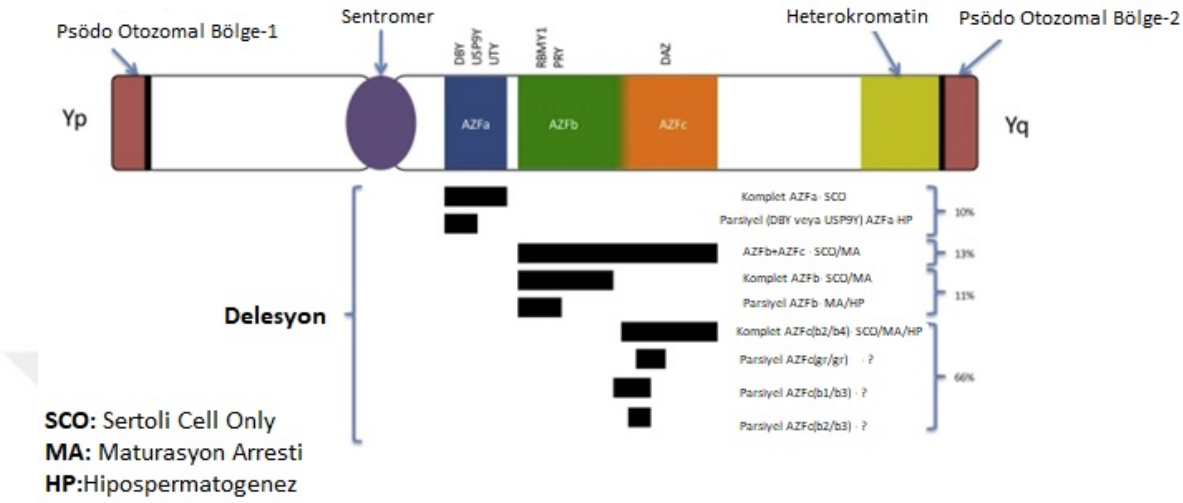
İnsanda "Azoospermi faktörü (AZF)" olarak bilinen lokuslar, Y kromozomunun uzun kolunda AZFa, AZFb, AZFc olarak adlandırılır. AZF lokusları erkek inferilitesinde spermatogenez ile ilişkili bir dizi protein kodlama genini barındırır ve bundan dolayı spermatogenezden sorumlu bölgeler olarak tanımlanır. AZF bölgelerinde gerçekleşen delesyonlar komplet veya parsiyel olarak gerçekleşebilmektedir. Yapılan çalışmalarda birçok gen bu alanlarda tanımlanmıştır. Ancak spermatogenezde etkileri günümüzde halen açıklanamayan birçok gen bulunmaktadır. Bunun nedeni komplet delesyonların varlığıdır.

AZFc bölgesi beş geni barındırır: Bunlar, DAZ, chromodomain Y1, bazik protein Y2 (BPY2), PTA-BL ile ilgili Y (PRY) ve testis transkripti Y2'dir. AZFb bölgesinde bulunan, ökaryotik çeviri başlatma faktörü 1A, Y-bağlantılı (EIF1AY) ve RNA bağlama motifi ve Y-kodlu (RBMY) genler spermatogenezin devamlılığında etkilidir AZFa bölgesine ait delesyonlar diğer iki bölgeye göre daha nadirdir. Bu bölgede tanımlanan genler; *USP9Y* (ubiquitin spesifik peptidaz 9), *DBY* (Dead box polipeptid 3) ve *UTY genleridir*. AZFa bölgesinde spermatogenezi direkt etkileyen en önemli genin DBY, sonra USP9Y geni olduğu bildirilmiştir. UTY genindeki sınırlı sayıdaki delesyonlar spermatogenezi etkileyebileceği öngörülmektedir.

Y-kromozomu (AZF) bölgesinde genetik materyalin delesyonu erkek infertilitesi ile sonuçlanmaktadır. Dört holandrik yapıya sahip DAZ geninde meydana gelebilecek bir delesyon, spermatogenik defekte neden olabilir.

Y kromozomu mikrodelesyonlarının saptanması, non-obstrüktif azoospermi ve orta-şiddetli oligospermili erkeklerde infertilitenin nedenlerini belirlemeye yardımcı

olmaktadır. Ayrıca, erkek infertilitesinin teşhisi ve tedavisi için büyük önem taşıyan uygun üremeye yardımcı tekniklerin seçiminde çok önemli bir yere sahiptir (Flannigan ve Schlegel, 2017).



Şekil 1.1. Y-kromozomunun uzun kolu (Yq) üzerinde, tekrarlayan delete bölgeler: Azoospermia Factor (AZF) AZFa, AZFb, ve AZFc olarak sıralanabilir. Bu bölgelerden delesyon görülen kısıma göre değişik patolojik sonuçlar ortaya çıkmaktadır. AZFabc (SCO), AZFa (SCO), AZFbc (SCO / maturasyon arresti), AZFb (maturasyon arresti), AZFc (azoospermi ağır oligospermi) şeklinde klinik sonuç doğurmaktadır (Flannigan ve Schlegel, 2017).

1.3.4.5.Kistik fibrozis mutasyonları ve erkek infertilitesi

Kistik fibrozis ölümcül bir otozomal resesif hastalıktır. Yapılan araştırmalarda hastaların %4'ünde kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) geni içeren gen mutasyonu taşıyıcılığı vardır. CFTR geni, iyon kanalı olarak görev yapan bir membran proteinini kodlar. CFTR gen mutasyonu taşıyan bireylerde ejakülatuvar kanal, seminal vezikül, vaz deferens ve epididimin oluşumunda ciddi sorunlar gözlemlenmektedir. Doğuştan vaz deferens yokluğu CFTR mutasyonu ile doğrudan ilişkilidir.

2017 güncel verilerine göre 2300'ü aşkın CFTR mutasyonu tanımlanmıştır. Bunlardan % 0,1'den büyük bir frekansta, yaklaşık 20 mutasyon meydana gelir. Bunların en yaygın olanı, dünya çapında kistik fibrozis bulunan hastalarda CFTR

genlerinin yaklaşık % 70'ini oluşturan mutasyon F508del (veya ΔF508) 'dir.

En sık görülen mutasyonlar ΔF508, R117H ve W1282X'dir. Ancak mutasyonların frekansı ve diğer mutasyonların varlığı büyük oranda hastanın etnisitesine bağlı olarak değişmektedir (Çizelge 1.4, 1.5).

Çizelge 1.4. 2017 verilerine göre CFTR Mutasyon tipleri

Mutatsyon Tipi	Sayı	Frekans %
Missense	796	39,35
Frameshift	317	15,67
Splicing	228	11,27
Nonsense	169	8,35
In frame in/del	42	2,08
Large in/del	52	2,57
Promoter	17	0,84
Sekans Varyasyonu	269	13,30
Bilinmeyen	133	6,57

http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html

Çizelge 1.5. Kistik fibrozise ait en az bir alel üzerinde bulunan mutasyon yüzdeleri

Mutasyon	En az bir alel üzerinde mutasyona sahip olan CF hastalarının tahmini yüzdesi
F508del	90%
G542X	5%
G551D	4%
W1282X	4%
N1303K	2.5%
R553X	2.5%
R117H	1%

.

1.4. Erkek 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. Biyokimyasal Faktörler / Hormonlar

Spermatogenez süreci hormonal olarak da kontrol edilmektedir. Erkek infertilitesinde etkili hormonal bozukluklar:

(i) Hipotalamus salgılarını ya da fonksiyonunu etkileyen bozukluklar;

(ii) Hipofiz gelişim bozuklukları;

(iii)Hipofizin LH ve FSH salgılanmasının ve fonksiyonunun primer bozuklukları.

LH ve FSH testis ve yumurtalıklar için trofik hormonlar olduğu için bu gonadotropinlerin azalmış salgıları cinsel organlarda hipogonadizm ile sonuçlanmaktadır (Huynh ve ark., 2002).

LH ve FSH hormonunun yüksek konsantrasyonu yanı sıra, gonadal steroidlerin düşük konsantrasyonları erkek infertilitesinin bir nedeni olan gonadal yetersizlikiğe neden olabilmektedir.

Erkekte, LH'ın yüksek konsantrasyonlarının nedeni hipergonadotropik hipogonadizm'den (HH) kaynaklanabilir. HH birincil testis yetmezliği, seminifer tübül disgenezisi (Klinefelter sendromu), Sertoli hücre yetmezliği ve Anorşi gibi çeşitli nedenlere bağlı olabilmektedir (Poongothai ve ark., 2009)

1.4.2. Çevresel ve Yaşamsal Faktörler

Gametogenez ve embriyogenezi etkileyebilecek egzersiz eksikliği, sigara, alkol tüketimi, uyuşturucu madde kullanımı, hava kirliliği, pestisitler, ağır metal maruziyeti ve kötü beslenme gibi yaşam tarzı ve çevresel faktörler sperm kalitesini etkileyerek kısırlığa yol açabilmektedirler (Sharpe, 2000). Oksidatif stresin erkek infertilitesinde önemli bir rolü bulunmaktadır. Oksidatif stresin spermatogenik sürecin yanı sıra sperm kalitesini ve miktarını etkilediği bildirilmiştir.

Reaktif oksijen türlerinin birikmesine neden olan birçok faktörün oksidatif stresi arttırdığı rapor edilmiştir. Obezite, oksidatif stres, adipoz dokunun proinflamatuar sitokinleri serbest bırakması gibi etkiler ROS üretimini arttırmaktadır (Singer ve Granger, 2007). Testisin skrotal ısısının artması oksidatif strese ve azalmış sperm kalitesine yol açabilmektedir (Perez-Crespo ve ark., 2008).

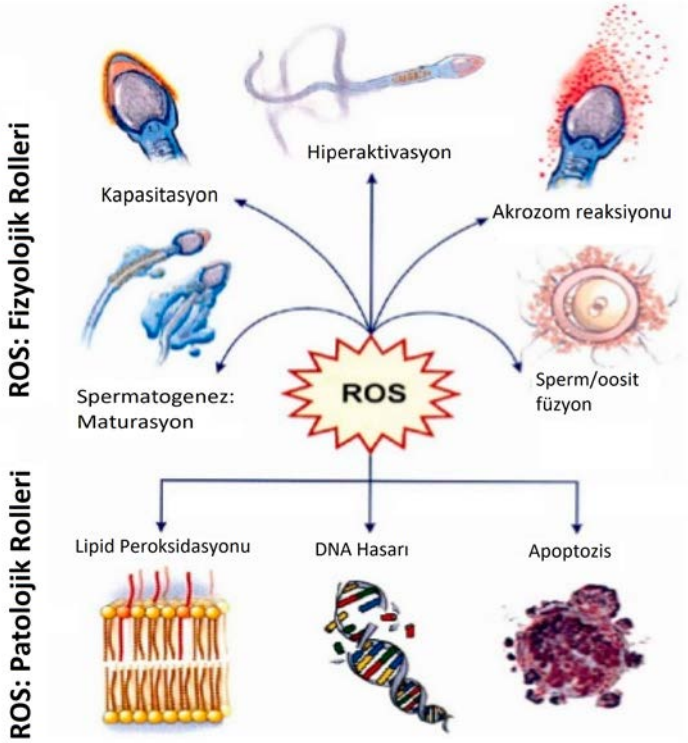
1.4.2.1. Oksidatif Stres ve İnfertilite

Endojen serbest radikallerin her bir hücrede, günde 200.000 kadar bazı hasara uğrattığı tahmin edilmektedir. Serbest radikaller, DNA hasarlarına, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır (van den Akker ve ark., 1994, Steenken, 1989).

ROS (Reaktif Oksijen Türleri) ve RNS (Reaktif Nitrojen Türleri) ile DNA hasarlarının çok az bir kısmı doğal olarak meydana gelmektedir. DNA hasarlarının oluşumuna neden olan endojen reaksiyonlar, oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır.

Serbest radikaller, metabolizmada eşleşmemiş elektron taşıyan ve diğer moleküllerden elektron koparma eğiliminde olan atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı reaktif yapıya sahip olduklarından biyolojik sistemde lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli unsurlara geri dönüşümsüz zarar verebilirler (Dizdaroglu, 1992).

Oksidatif stres (OS) tarafından ROS indüklenmektedir. ROS'un normal düzeyde olması sperm fizyolojisi için gereklidir; fakat ROS'un aşırı düzeyde olması sperm kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir (Şekil 1.2). Sperm hasarını indükleyen OS'in, 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 dolayı şiddetli olabilmektedir (Gonzalez-Flecha, 2004).



http://www.inviafertility.com/blog/blog/infertility/drvkarande/anti-oxidants-and-male-fertility/

Şekil 1.2. ROS'un sperm fizyolojisi üzerine olan etkileri

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 yapılan çalışmalarda, erkek infertilitesinde OS tedavi yönetimlerine odaklanmış birçok çalışma bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fertilite modülatörleri olarak antioksidanlar ve B vitaminlerin etkisine olan ilgi artmaktadır (Esteves ve Agarwal, 2011).

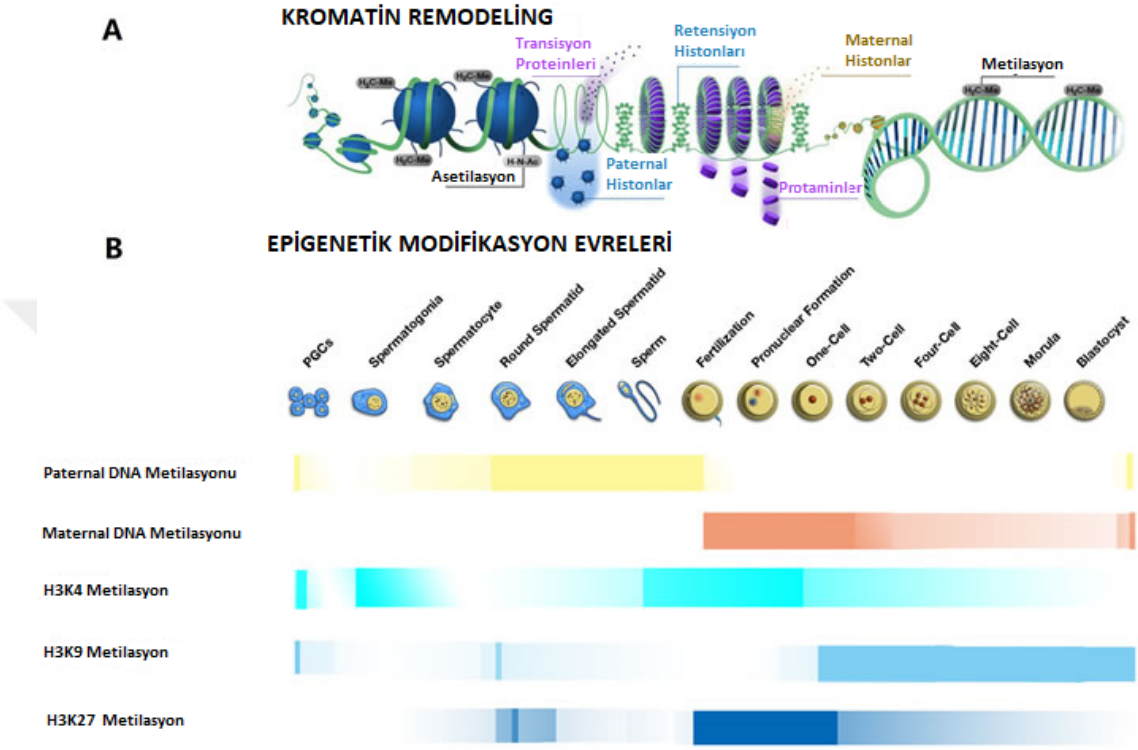
1.4.3. İmmünolojik Faktörler

İmmünolojik faktörler, insan üreme sürecinin neredeyse her adımında etkili olması nedeniyle, gametlerde antikor kaynaklı oluşan hasar, immünolojik kısırlığın önemli bir kaynağı sayılmaktadır (Poongothai ve ark., 2009).

1.4.4. Epigenetik

Erkek infertilitesinde epigenetik değişiklikler hastalığın tedavisinde önemlidir.

Anormal epigenetik değişiklikler, erkek germ hücrelerinde sperm anomalilerine yol açabilmektedir. Bu amaçla yapılan son çalışmalarda, oligozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi görülen erkeklerin sperm örneklerinde, değişen epigenetik profillerin bulunduğu bildirilmiştir (şekil 1.3) (Dada ve ark., 2012, Ge ve ark., 2017)



Şekil 1.3. Kromatin yeniden modellenmesi ve epigenetik modifikasyon, spermatogenez, fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi sırasında değişir. **A**. Spermatogenez, fertilizasyon ve embriyogenez sırasında kromatin yeniden modelleme süreci. Kromatin yeniden modellenme süreci esas olarak spermiyogenez sırasında ve döllenmeden sonra kromatin yoğunlaşması ve dekondensasyonu ile oluşur. Spermatidlerin, spermatozoa dönüşümü olan spermiyogenez sırasında çekirdekte histon proteinleri kromatin yoğunlaşmasına yol açan protamin ile yer değiştirir. Fertilizasyondan sonra, pronükleer formasyondan önce, kromatin dekondensasyonuyla, protamin-histon arası değişim meydana gelir, maternal türevli histonlar sperm protaminleri ile değiştirilir. **B.** Bazı epigenetik modifikasyonların spermatogenez, fertilizasyon ve embriyogenez sırasında dönüşümü. DNA metilasyonu, H3K4 metilasyonu, H3K9 metilasyonu ve H3K27 metilasyonu gibi bazı epigenetik modifikasyonların dönüşümü, sperm üretimi ve erken embriyo gelişimi için gereklidir. Bu epigenetik modifikasyonlar, spermatogenez, fertilizasyon ve embriyogenez süreçlerinde önemli olayları kontrol eden faza spesifik gen ifadelerini düzenlemek için işbirliği içinde çalışırlar(Ge ve ark., 2017).

1.5. İnfertil erkeğin değerlendirilmesi

Erkek bireylerde infertilite tanısının konulması için dünya sağlık örgütünün koyduğu

belirli kriterlere göre değerlendirme yapılması gerekmektedir. Bu kriterler aşağıda belirtildiği gibi olmalıdır.

- Hastadan alınan hastalık öyküsü
- Fiziki muayene
- Semen analizi
- Hormonal analiz
- Radyolojik değerlendirme
- Testis biyopsisi
- Genetik değerlendirme

1.5.1.Sperm frekans analizi

Semen analizinin sonuçları WHO 2010 kriterlerine göre normal ise, tek bir test yapılması yeterlidir. Sonuçlar en az iki testte anormal ise, daha ileri ve androlojik araştırmalar ile desteklenmelidir.

1.5.2.Semen Analizi

Semen analizi, hastanın sperm fonksiyonu hakkında bilgi vermez, ancak mutlaka infertilite tanısının konulması için yapılması gerekmektedir. Testiste sperm üretiminin sağlıklı olarak gerçekleşmesi, epididim ve seminal veziküllerin ve prostat bezinin sağlıklı olduğunun ve varlığının bir göstergesi sayılmaktadır. Semen analizi ideal olarak en az 72 saat cinsel perhiz sonrası yapılmalıdır. Eğer bu süre uzarsa, sperm sayısı ve miktarında bir artış olabilir ancak sperm motilitesi olumsuz etkilenebilir. Normal sperm parametreleri WHO tarafından tanımlanmıştır (Cooper ve ark., 2010) (Çizelge 1.6). Semen analizinin normal değer aralıkları dünya sağlık örgütünün kriterlerine göre yıllar içinde güncellenmiş ve aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 1.6.Dünya sağlık örgütünün kriterlerine göre yıllar içinde güncellenmiş Semen Parametreleri

Semen Parametreleri	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010
Hacim	≥ 2 mL	≥ 2 mL	1.5 mL
Sperm Konsantrasyonu	≥ 20 x 10 6	≥ 20 x 10 6	15 x 10 6
Total sperm konsantrasyonu	≥ 40 x 10 6	≥ 40 x 10 6	39 x 10 6
Total Hareketlilik(% Motilitte)	≥ 50 %	≥ 50 %	40%
ileri Motilite	≥ 25 % (Derece a)	≥ 25 % (Derece a)	32 % (Derece a+b)
Canlılık	≥ 75 %	≥ 75 %	58%
Morfoloji	≥ 30 %	≥ 14 %	4%
Lökosit Sayısı	< 1.0 x 10 6/mL	< 1.0 x 10 6/mL	< 1.0 x 10 6/mL

İnfertilitenin değerlendirlmesinde;

• Oligozoospermi: <15 milyon sperm / mL;

• Astenozoospermi: <% 32 ileri hareketli sperm;

• Teratozoospermi: <% 4 normal kriterleri iyi ayırt edilmelidir.

Genellikle, üç anomali aynı anda, oligo asthenoteratozoospermi (OAT) sendromu olarak tanımlanır. Azoospermide olduğu gibi aşırı oligozoospermi vakalarında (spermatozoa <1 milyon / mL), erkek genital bölge tıkanıklığı ve genetik anomalilerle birlikte artış gösterir.

1.5.3.Hormonal analiz

Erkek üreme sisteminde etkili olan önemli hormonlar gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), Lütein yapıcı hormon **(**LH), Folikül Sitümule edici hormon (FSH), testosteron (T) ve östradioldür.

Endokrin değerlendirmede serum FSH ve testosteron bakılmalıdır. Yapılan analiz sonucunda eğer T değeri düşükse buna ek olarak serbest T, LH ve prolaktin (PRL) bakılmalıdır. İnfertil hastalardaki FSH yüksekliği spermatogenezdeki bozukluk hakkında bilgi verebilir. Hastalarda düşük serum T ile birlikte yüksek FSH ve LH testislerde gonadal yetmezlik olarak değerlendirilebilir. Klinik olarak düşük FSH ve LH ise hipogonadotropik hipogonadizm bulgusu olarak değerlendirilir.

Azoospermili hastalarda FSH ve LH'ın normal olması, obstrüksiyon varlığı hakkında bilgi verebilir. Testislerde germ hücre yokluğu sonucu sadece Sertoli hücreleri görülebilir. Sertoli cell only sendromu olarak tanımlanan bu durumda serum FSH

yüksek bulunurken, yaklaşık % 10 olguda serum FSH normal olabilmektedir (Pavlovich ve ark., 2001).

1.5.4.Radyolojik değerlendirme

Transrektal ultrasonografi (TRUS);
Semen hacmi 1,5ml'den daha az ise, rektal muayenenin anormal olması ve ejekulasyon bozuklukları (anejakülasyon, hematospermi, ağrılı ejakülasyon) durumlarında yapılmalıdır. Radyolojik değerlendirmenin amacı parsiyel veya toplam duktal obstrüksüyonu saptamaktır.

1.5.5.Testis biyopsisi

Testis biyopsisi, erkek infertilitesinde iki kritik öneme sahiptir. Bunlar obstruksiyon ile non obstruktif testiküler patoloji ayrımı yapılması ve intrasitoplazmik sperm injeksiyonunda (ICSI) kullanılmak üzere sperm elde edilmesidir. Testiküler yetmezliği tespit edilmiş, küçük volümlü testis, yüksek serum FSH olan hastalarda, gelecekte yapılacak bir ICSI için sperm elde edebilme olasılığını saptamak amacıyla da tanısal biyopsi yapılabilir. Bununla birlikte özellikle son yıllarda mikrocerrahi konusundaki gelişmelerin ardından, testisten mikroskobik testiküler sperm ekstraksiyonu (mikro-TESE) yöntemi ile sperm elde edilmesi ve elde edilen bu hücrelerin infertilite tedavisinde kullanılması gündeme gelmiştir.

Testiküler histoloji, testiküler sperm ekstraksiyonunda (TESE) sperm varlığının belirlenmesinde iyi bir prediktif faktör olarak bilinmektedir (Jezek ve ark., 1998, Su ve ark., 1999, Abdel Raheem ve ark., 2013). Buna zıt olarak, testis biyopsisinde SCO saptanan hastalarda daha sonra yapılacak ikinci TESE ameliyatlarında azımsanmayacak oranlarda sperm çıkabildiği ve testiküler histolojinin TESE başarısını göstermede yeterli olmayabileceğini öne süren çalışmalar da yapılmıştır (Donoso ve ark., 2007, Kalsi ve ark., 2012). EAU 2015 (Avrupa Üroloji Topluluğu) kılavuzuna göre ise tanısal amaçlı testis biyopsisi histolojisi ile TESE'de alınan biyopsinin histolojisi arasında yüksek bir korelasyon bulunduğu bildirilmektedir.

Azoospermik hastanın obstrüksiyon değerlendirmesinde, tek taraflı testis biyopsisi genellikle yeterlidir. Testis biyopsilerinin yorumlanması, kantitatiften daha çok tanımlayıcı analiz gerektirdiği için, deneyimli bir patolog gerektirir. Germinal epitelin elektron mikroskopta incelenmesi, ışık mikroskobundan daha fazla klinik fayda sağlamamaktadır. Testis biyopsisinde patoloji değerlendirmesinde kullanılan kategoriler, normal, hipospermatogenez, maturasyon arresti, germinal aplazi olarak sınıflanabilir.

1.6. Spermatogenez, Spermatogonyumlar ve spermiyogenez

1.6.1. Spermatogenez

İnsan vücudundaki en karmaşık hücresel farklılaşma olaylarından olan spermatogenez, spermatogonyumdan olgun sperm hücrelerin geliştiği bir süreçtir. İnsanda tüm spermatogenik süreç yaklaşık olarak 64 gün sürer. Olgun spermatozoanın ejekulatta görülmesi ise 74 gün alır. Spematogenez, testiste seminifer tübüllerde meydana gelir.

Endodermal kökenli germ hücreleri, embriyonik hayatta testise göç ederek seminifer tübüllere yerleşir ve spermatogonyum adını alırlar. Puberte öncesinde seminifer epitelin çok büyük bir kısmını Sertoli hücreleri oluşturur. Spematogonyumların gelişimi, hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle puberteden önce başlar, yaşam boyu devam eder. Erişkin bir insanda spermatogonyumların Sertoli hücrelerine oranı yaklaşık 13:1'dir. Spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan bazal kompartmanda yer alırken, primer ve sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiumlar ise adluminal kompartmanda yer alır. Spermatogenez; spermatogonyum, spermatosit ve spermatid olmak üzere 3 ayrı fazda incelenir.

1.6.2. Spermatogonyumlar

Primordiyal germ hücreleri, bireyin fetal periyodunda testislerde bulunur ve farklılaşıp spermatogonyumlara dönüşürler. Yetişkinlik evresine kadar geçen süreçte

spermatogonyumlarda herhangi bir diferansiyasyon gerçekleşmez. Olgunlaşmamış spermatogenik hücreler olan spermatogonyumlar, bazal membran üzerine yerleşmiş durumdadır. Pubertede spermatogonyumlar bir dizi mitoz bölünme geçirerek germ hücre sayılarını arttırırlar. Primitif germ hücresi spermatogonyumların, mitoz bölünmeleri ile başlayan ve haploid sayıda spermatozoonların oluşmasıyla sonlanan bu süreç spermatogenez'dir (Barratt ve ark., 1995, Parks ve ark., 2003)(Şekil 1.4).
Mitoz bölünmeler sonrası germ hücreleri spermatogonyum A ve B olmak üzere iki farklı tipe ayrılırlar. Spermatogonyum A'ların bir bölümü spermatogonyal kök hücre olarak kalırken bir bölümüde bazal membrandan tübülüsün lümenine doğru hareket eden spermatogonyum B'lere diferansiye olur. Tip B spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan pregenitör hücrelerdir. Primer spermatositler spermatogenezde gözlemlenen en büyük hücrelerdir (Kierszenbaum, 2006).

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 korunmaktadır. 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).

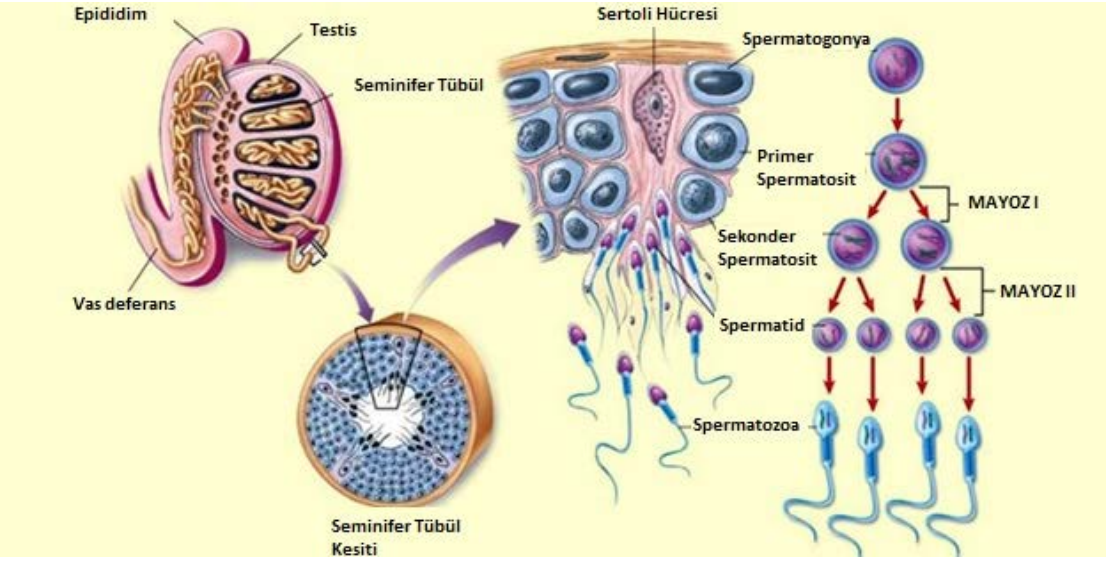
Spermatogenezde, germ hücreleri mayoz bölünme ile 46 kromozomlu diploid hücre yapısından 23 kromozomlu haploid hücre yapısına dönüşür ve fertilizasyon aşamasında 23 kromozom içeren haploid oosit hücresi ile birleşerek, 46 kromozomlu yeni bir bireyin oluşmasını sağlarlar (Şekil 1.4). Spermatogenez proliferasyon fazı, redüksiyon-bölünme fazı ve farklılaşma fazı olmak üzere üç aşamada incelenir (Chocu ve ark., 2012).

Spermatogenesiz erkek germ hücrelerinin sürekli olarak diferansiyasyonu ve kendilerini yenilemeleri için gereklidir. Proliferatif faz olarak adlandırılan

spermatogenik kök hücrelerin ve spermatogonyaların bir dizi mitoz bölünmeye girmeleri ile hücrelerin kendilerini yenilemeleri sağlanır. Bu kendini yenilemelerinin nedeni olarak ya proliferasyon için mitoza uğrarlar veya mayoza girmesiyle bir dizi farklılaşma basamaklarını geçirerek olgun sperm hücresi haline dönüşürler. Spermatogenezde proliferatif faz, seminifer tübülün bazal kısmında gerçekleşirken, adluminal kısımda diferansiye olmamış hücreler, kan-testis bariyeri ile bir takım immunojenlere karşı korunur (Griswold, 2016).

İnsan spermatogenezinde, koyu tip A, açık tip A ve B spermatogonyumlar olmak üzere üç farklı grup spermatogonyum tanımlanmıştır. Koyu tip A spermatogonyumlar açık tip A spermatogonyumlarına diferansiye olmaktadır. Açık tip A spermatogonyumlar da, B spermatogonyumlarına dönüşürler. Tip B spermatogonyumlar ise diferansiyasyon sürecine girerek primer spermatositlerin progenitörlerini oluştururlar. Sonrasında oluşan primer spermatositler ise ilk mayoz bölünme ile sekonder spermatositlerini oluşturur. Hemen ardından ikinci mayoz bölünme gerçekleşerek haploid sayıda kromozom içeren spermatidler meydana gelir (Griswold, 2016).

Seminifer tübülde farklı hücre grupları bulunmaktadır. Spermatogonyumlar, olgun sperm hücrelerine dönüşmek için bir takım diferansiyasyon basamaklarını gerçekleştirirken, Sertoli hücreleri germ hücrelerine yapısal destek dokusunu oluştururlar. Testislerde bulunan bir diğer hücre türü de testosteron üretimini gerçekleştiren Leydig hücreleridir. Seminifer tübül içinde spermatogenezin tüm aşamalarındaki olgun sperm hücresine dönüşmeyi bekleyen germ hücreleri bulunur. Diferansiyasyon fazını başarıyla tamamlayan hücreler seminifer tübülden lümene dökülürler. Bu nedenle testisin farklı kesimlerindeki alanlarda gelişimin değişik evrelerindeki sperm üretimi gözlemlemek mümkündür.



Şekil 1.4. Erkek üreme sistemi, Spermatognez ve aşamaları (Allais-Bonnet ve Pailhoux, 2014)

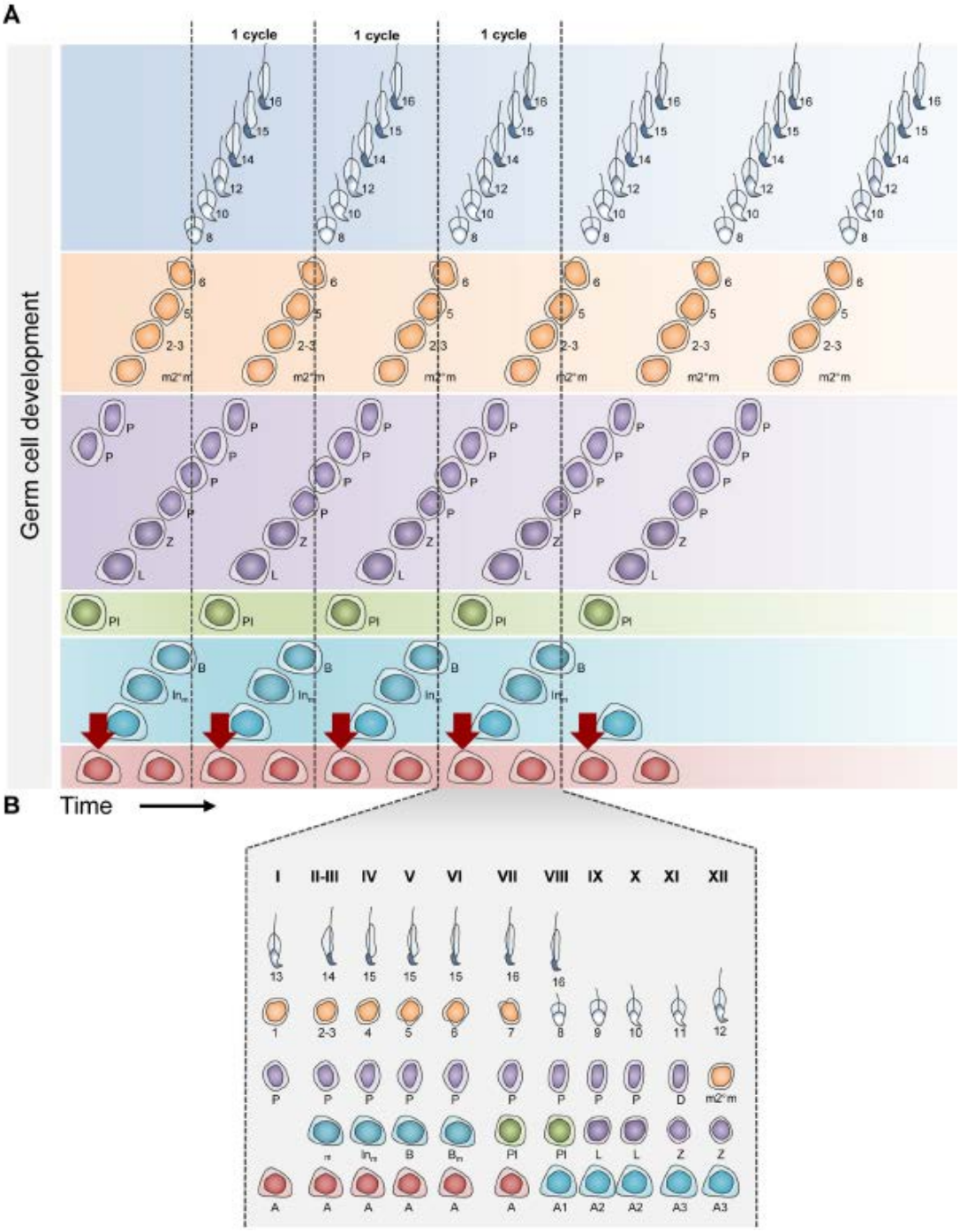
1.6.3.Seminifer epitelin spermatogenik dalgası

Seminifer epitel döngüsü, seminifer tübülün uzunluğu boyunca ardışık evrelerin düzenlemesi olarak tanımlanabilir. Seminifer epitelin spermatogenik döngüsünde, seminifer tübül uzunluğu boyunca ortak bir senkronizasyon yoktur, ancak her seminifer tübül, farklı dalgalar halinde gelişim göstermektedir. Her uçta, bölümlerin sırası en yüksek aşamada başlar ve I. evreye kadar dönüşüm gösterir. Örneğin, XII. Aşamayı gösteren tüp segmentinde kesitler izlenirse, tüpün uzunluğu boyunca bir sonraki aşama XI. evre, daha sonra X, IX, vb. olacak ve böylece I. evre gösteren bir kesit elde edilmiş olur (De Jonge ve Barratt, 2006).

Bununla birlikte, bu genel kural, spermatojenik dalganın modülasyonunun gerçekleştiği seminifer tübülünün spesifik segmentlerinde tersine çevrilebilir. Bu, modülasyon segmenti içinde, seminifer tübülün bir safhasının her iki taraftan olgunlaşma yönündeki germ hücrelerinin değişik aşamadaki germ hücreleri ile yan yana olduğu anlamına gelir (örneğin, XII, XI, X, IX, VIII yerine XII, XI, XI, XII). Bu gerçekleşen sistemle, spermatogenezin tüm safhalarının seminifer epitelde eşit dağılımını ve tam olarak diferansiye testiküler spermatozoanın kesintisiz, istikrarlı bir şekilde gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır (De Jonge ve Barratt, 2006).

1.6.4.Spermatogenez Siklusunun Süresi

Bir spermatogonyum hücresinin diferansiyasyon basamaklarını geçirdikten sonra ejakulatta görülmesi için geçen ortalama süre 64 ± 8 gündür (Li ve ark., 2006). Sağlıklı erkeklerde, seminifer epitelinden serbest bırakılan sperm, sonraki ejakulasyondan önce eski ve yeni sperm karışmaksızın koordineli bir şekilde epididime girmektedir (Mruk ve Cheng, 2004).



Şekil 1.5. Seminifer epitel döngüsü, seminifer tübülün uzunluğu boyunca ardışık safha evrelerinin düzenlemesi ile gerçekleştirilir. Undiferansiye Spermatogonya: **Kırmızı**; undiferansiye A1 spermatogonia **mavi;**, preleptoten spermatositler: **yeşil**; paktien spermatositler: **mor**; yuvarlak veya uzayan spermatidler: **turuncu**; uzun spermatidler: **koyu mavi** (Griswold, 2016)

1.6.5.Spermatositler

Ergenlikle birlikte, Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesiyle primer spermatositler oluşur. İlk mayotik hücre bölünmesi bu hücrelerde meydana gelir. Mayoz I tamamlandığında, bir primer spermatositten, her biri haploid sayıda kromozoma sahip iki tane sekonder spermatosit oluşur. Mayoz II'de, sekonder spermatositlerin her biri iki spermatid oluşturmak üzere bölünür. Böylece bir spermatosit, her biri haploid kromozom sayısına sahip dört spermatid oluşturur. Bu faz büyük oranda kan–testis bariyerinin (KTB) iç tarafında, luminal kompartımanda gerçekleşir (Kierszenbaum, 2006).

1.6.6. Spermatid fazı

Haploid spermatidler yaklaşık 7-8 μm çapa sahip küçük boyutları ve yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nukleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübülde özelikle lümene yakın bölgede yerleşim gösterirler. Spermatidler spermatogenezin son aşamasında spermiyogenez adı verilen diferansiyasyon basamağının son aşamasını gerçekleştirler (Junqueira ve Carneiro, 2005, Kierszenbaum, 2006).

1.6.7. Spermiyogenez

Spermiyogenez germ hücrelerinin olgunlaşması olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir deyişle yuvarlak spermatidlerin olgun spermatozoa oluşturacak şekilde diferansiyasyona uğraması olarak tanımlanır. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Bu sırada spermatidlerin sitoplazmasında ve nükleusunda önemli hem morfolojik, hem de hücresel ve moleküler değişiklikler gerçekleşmektedir. Spermiyogenez akrozom oluşumu, nukleus yoğunlaşması ve uzaması, flagellum gelişmesi ve sitoplazmanın büyük bir kısmının kaybolması olaylarını kapsayan

karmaşık bir süreçtir. Bu değişiklikler spermatidin hücre çekirdeğini oluşturan genetik materyalin sıkı paketlenmesi, uç kısımda akrozom gelişimi, orta kısımda sıkı şekilde paketlenmiş mitokondri oluşumu ile birlikte kuyruk uzaması, sitoplazma kaybı, sitoplazma içinde bulunan organellerin yer değiştirmesi ve histon proteinlerinin transiyasyon proteinleri aracılığı ile protaminlerle yer değişimi ile karakterize olmaktadır (Cheng ve Mruk, 2012).

Spermiyasyon çeşitli yapılar ve adezyon kompleksleriyle, ultra-yapısal düzeyde olan karmaşık bir süreçtir. Bu kompleks yapılar normal spermin verimli olarak olgunlaşması ve lümene dökülmesi için birlikte çalışmaktadır. Spermiasyon ektoplazmik spesifikasyonların (ES) yapısının etkin olarak birbirinden ayrılmalarına ihtiyaç duymaktadır.

Spermiyasyon işlemi, spermiyogenez boyunca germ hücrelerinin ES'den kolaylaştırılmış kopma mekanizmalarında yeni bakış açıları ortaya çıkarmaktadır. İntegrin merkezli adezyon bağlantıları, bir çözünme esnasında spermatid için sıkı bir tutunma 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 spermiyasyon ilerledikçe değişim göstermektedir. Bazı adezyon ilişkili proteinler, sadece spermiasyon başlangıcında çok fazla miktarda ifade edilirken, diğerleri spermiyogenezin uzama aşaması sırasında spermatid-Sertoli hücre arayüzünde (interface) ifade edilmektedir. Sertoli hücreleri spermatidleri serbest bırakmak için hazırlarken spermatid sürecinde yer alan adezyon bağlantıları sürekli değişime uğramaktadır. Spermiasyon, spermatogenezin son olgunlaşma basamağı olduğu için bu süreç sperm morfolojisinde de bir takım değişiklikler yapmaktadır (O'Donnell ve ark., 2011).

Spermiyogenez süreci, üç aşamada incelenir. Bu evre, spermatidler Sertoli hücresi membranına özel bağlantı kompleksleri ile bağlı halde iken meydana gelir (Johnsen, 1970).

Spermiyogenez aşamaları;

• Golgi fazı

• Akrozomal faz

• Olgunlaşma fazıdır.

1.6.7.1.Golgi fazı

Golgi fazı, spermatidlerin golgi komplekslerinde, glikoproteinlerden zengin proakrozomal granüllerin (PAS) biraraya gelmesi ve çekirdek zarı yakınında membranla çevrili bir vezikül olan akrozomal vezikülü meydana getirmesiyle karakterize bir süreçtir. Sentriyoller göç ederek oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden nukleusa doğru göç ederken hareket ettikçe aksonemal bileşenleri çevresine sararlar (Gartner ve Hiatt, 2007, Ross ve Pawlina, 2006).

1.6.7.2.Akrozomal faz

Bu evrede, spermatidler, baş kısımları Sertoli hücresine iyice gömülecek ve yönü bazal laminaya bakacak şekilde yeniden yönlenirler. Gelişen kuyruk seminifer tübül lümenine uzanır (Gartner ve Hiatt, 2007, Niederberger ve ark., 1997, Ross ve Pawlina, 2006). Akrozomal fazda, akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nukleusun ön tarafında nukleus ile membran arasındaki bölümün büyük kısmını oluşturur ve akrozom adını alır. Akrozom; hyaluronidaz, nörominidaz, asit fosfataz, akrozin, proteaz, B-N-asetilglikoz-amidaz, aril sülfataz gibi hidrolitik enzimler içerir. Spermiyogenezin bu aşamasında, spermatid seminifer tübülün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümene doğru uzanır. Ayrıca nukleus uzar ve daha yoğun bir hal alır. Sentriyollerden biri gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun üst kısmı etrafında toplanarak "orta parça" adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluştururlar (Gartner ve Hiatt, 2007, Niederberger ve ark., 1997, Ross ve Pawlina, 2006).

1.6.7.3. Olgunlaşma fazı

Olgunlaşma fazında, sitoplazmanın fazlası atılır ve Sertoli hücreleri tarafından bu artık sitoplazma fagosite edilir. Olgunlaşma işleminde, nukleus uzayıp yoğunlaşarak

son şeklini alır. Mitokondriler dağılmaya başlar ve kuyruk iskeleti yapısal düzenini tamamlar. Bu aşamadan sonra spermatidler birbirlerine bağlı değildirler ve daha sonra "spermiasyon" adı verilen mekanizma ile Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine salıverilirler (Barratt ve ark., 1995, Gartner ve Hiatt, 2007, Ross ve Pawlina, 2006). Farklılaşma ve gelişimlerini tamamlayan spermler, morfolojik açıdan gelişmiş, ancak fonksiyonel açıdan olgunlaşmamış olan hücrelerdir. Çünkü aktif hareket yeteneklerini henüz kazanmamışlardır. Fonksiyonel olarak tam olgunlaşmaları, erkek taşıyıcı kanallarında tamamlanır.

Normal spermatogenez; testis, ön hipofiz gonadotropinleri ve hipotalamusun uygun etkileşimine bağlıdır. Luteinleştirici hormon (LH), spermatogenez için gerekli olan testosteronun, Leydig hücrelerinde yapımını uyarır. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ise optimal Sertoli hücre fonksiyonu için gereklidir. Sertoli hücreleri intratübüler ortamın korunmasında ve üreme hücreleri ile hormon etkileşimleri yoluyla spermatogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (de Kretser, 1997, Griswold, 2014).

Spermler gelişimlerini tamamladıktan sonra epididime taşınırlar ve bu kanaldan geçerken, hareketlilik ve oositi tanıyıp ona tutunabilme yeteneklerini kazanırlar. Bu değişiklikler sperm olgunlaşması olarak tanımlanır ve fertilizasyonun oluşması için hayati öneme sahiptir. Sperm epididimden ayrıldığında, olgun olarak kabul edilir ve spermler epididimin sonundaki terminal (Abdel Raheem ve ark., 2013) bölgede bulunurlar. Ejakülasyon sırasında, kas kasılmalarının etkisiyle bir miktar sperm, epididimisten vaz deferansa taşınır. Daha sonra spermler ejakülasyon kanalına giderler. Spermler bu şekilde farklı tüplerden geçerken, bir miktar sıvı içerisinde bulunurlar. Seminal veziküllerden ve prostat bezinden salgılanan sıvılar da spermlerle karışır ve oluşan karışım semen olarak adlandırılır. Ejakülatın %90'ından fazlası prostat ve seminal veziküller tarafından üretilir (Barratt ve ark., 1995, Ross ve Pawlina, 2006, Parks ve ark., 2003).

1.7. İnterstisyel doku ve Leydig hücreleri

Testiste, 'interstisyel" ya da "Leydig hücreleri" adı verilen hücreler, kan damarları, lenfatik kanal ya da sinüzoidlerin yakınında, tübüller arası bağ dokuda yer alırlar.

Steroid üreten pek çok hücre gibi Leydig hücreleri de lipid damlacıkları, mitokondriler ve düz endoplazmik retikulum içerirler. Leydig hücrelerinin sayıları ve işlevleri hormonal uyarılara bağlıdır (Junqueira ve Carneiro, 2005). Puberte sonrasında LH (lüteinizan hormon) uyarısının ardından Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar. Serumda bulunan testosteronun % 95'i Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. FSH (folikül stimülan hormon) uyarımından sonra Sertoli hücrelerince üretilen ABP (androjen bağlayıcı protein), gelişen spermatogenik hücrelerin çevresinde yüksek bir testosteron yoğunluğu oluşturur (Kierszenbaum, 2006).

1.7.1. Sertoli Hücresi

İlk kez 1865 yılında, İtalyan fizyolog ve histolog Enrico Sertoli tarafından, tanımlanmış olan Sertoli hücreleri, testis dokusunda, seminifer epitelde yer almaktadır. Sertoli hücreleri, seminifer tübülde, bazal membran üzerine yerleşmiş, lümene kadar uzanabilen büyük hücrelerdir. Düzensiz şekilli bir nukleusu, belirgin bir nukleolusu bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2006, Junqueira ve Carneiro, 2005).
Ergenliğe yakın belirli bir zaman diliminde Sertoli hücreleri hızlı bir şekilde çoğalırlar ve hacimlerini 10-20 kat artırırlar. Sayıları germinal hücrelerle karşılaştırıldığında az olmasına rağmen seminifer tübülün hacimsel olarak dörtte birini oluştururlar. Tam olarak özelleştiklerinde bölünme yeteneklerini kaybederler ve ergenlikten sonra çoğalmazlar (Ross ve Pawlina, 2006).
Sertoli hücreleri spermatogenik seri hücreleri için destekleyici ve besleyici hücreler olarak bilinirler. Konik-prizmatik hücrelerdir ve çok sayıda apikal ve lateral uzantıları vardır, bu sitoplazmik uzantılarıyla birbirlerine tutunurlarken, germ hücrelerinin etrafını kuşatırlar. Böylece germ hücrelerinin beslenme, hormonal etkileşim gibi fonksiyonları Sertoli hücreleri aracılığıyla gerçekleşmiş olur (Ross ve Pawlina, 2006, Junqueira ve Carneiro, 2005).
Spermatogenezin başarılı bir şekilde tamamlanması için, gelişen germ hücreleri ile yapısal ve sinyal teması açısından Sertoli hücreleri ile çok sıkı ilişki içerisinde olması gerekmektedir (Şekil 1.6). Örneğin, spermatogonya'nın farklılaşması ve ardından mayoza girmesi için A vitamini gereklidir. Alltrans retinoik asit (ATRA) A

vitamininin aktif metabolitidir ve rezinoidler retinoik asitlerin sentetik agonistleridir. Spermatogonya'da ATRA, bir ATRA reseptörünün (RAR) ve bir rexinoid reseptörünün (RXR) heterodimerleri vasıtasıyla Kit (mitotik farklılaşma ve mayotik girişi sırasında spermatogonya sırasında önemli bir rol oynayan bir reseptör tirozin kinazı kodlayan protein) gibi genlerin ekspresyonunu indükler, tip A spermatogoninin nihai safhası olan $A_{aligned}$'in farklılaşmasına yol açar. Bunun aksine, spermatositlerin mayotik bölünmelere girişi muhtemelen Sertoli hücrelerinde ATRA sinyali ile üretilen fakat germ hücrelerinde üretilmeyen parakrin moleküllerin ifadesini gerektirir (Teletin ve ark., 2017).

Sertoli hücreleri seminifer tübüllerin bazal ve aduluminal bölmelerini ayıran oldukça seçici bir bariyer olan kan testis bariyerini oluşturur. KTB, sıkı bağlantılar (Tight junction-TJ) ve ektoplazmik spesifikasyonların (ES) yanı sıra desmozom benzeri bağlantıları ve gap bağlantılarını içerir. Bu tür hücre-hücre etkileşimleri, gelişmekte olan germ hücrelerinin bazal membrandan tubül lümenine doğru göçünü arttırır (Li ve ark., 2017, Mruk ve Cheng, 2015)

TJ'ler, Sertoli hücreleri arasında çözünen maddelerin ekstraselüler boşluğa geçmesini sınırlamak için oluşturulur ve germ hücrelerini immün sistemin saldırısına karşı koruyan seminifer tübüller içinde özel bir ortam oluşturur.

Germ hücreleri ilginç bir şekilde yapısal bütünlüğünü bozmadan TJ'lerin üzerinden geçebilir. Sertoli hücreleri, eski ve yeni TJ'ler arasında oluşan geçici bölmelerdeki germ hücrelerini engeller; eski TJ'lerin çözülmesi, KTB boyunca geçişlerini tamamlamak için hareketli germ hücrelerini adluminal bölmeye geçişini sağlar. Bu işlem sırasında, bir TJ proteini olan claudin 3 (CLDN3), geçici olarak yeni TJ içine dahil edilir ve ardından CLDN11 ile yer değiştirir. Germ hücrelerinin KTB üzerinden göçü bu nedenle TJ'ye bağlı proteinlerin internalizasynu ile kolaylaştırılır, böylece KTB geçici olarak çözülür. Testosteron, germ hücrelerinin aduluminal bölmeyi geçmek için bariyerden geçtikten sonra KTB'nin yeniden organizasyonunun gerçekleşmesine teşvik eder (Mruk ve Cheng, 2015).

1.8.Spermatogenezin Regülasyonu

Spermatogenez, hipotalamus-hipofiz-testis ekseninin hormonal etkileşimi sonucunda sürdürülmektedir (Meng ve ark., 2005, Dorrington ve ark., 1976, Mathur ve ark., 2011). Bu eksendeki fonksiyon bozukluğu kısırlığa yol açmaktadır (Sokol, 2009). Hipotalamustan salgılanan Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ön hipofizden lüteinize edici hormon (LH) ve Follikül uyarıcı hormon (FSH) salınmasını uyarmaktadır. Parakrin olarak, spermatogenez hipotalamik gonadotropin salınım hormonu (GnRH) salgısı ile kontrol edilir ve bu hormon follikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormonun (LH) salgılanmasını uyarır (McLachlan ve ark., 1998). LH Leydig hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanarak hormon reseptör kompleksinin bir yanıtı olarak testosteron üretimini sağlamaktadır.
Testosteron spermatogenezle ilişkili olan ve erkek sekonder cinsiyet karakterlerini belirleyen çok önemli bir hormondur. FSH, spermatogonyumdan itibaren sperm hücrelerinin çoğalması, canlılığı ve gelişiminden sorumludur. Diğer taraftan, fetal ve pubertal dönemlerde Sertoli hücrelerinin çoğalmasında da önemli rol oynamaktadır (Cooke ve ark., 1992, Cortes ve ark., 1987). Sertoli hücrelerinde sitokinlerin üretilmesini uyararak, spermatogonyumların gelişmesini sağlarlar (Cooke ve ark., 1992, Cortes ve ark., 1987, Ruwanpura ve ark., 2008).

FSH'nın infertilitede önemli role sahip olmasının yanı sıra, FSHR genetik anormallikleri normal üremeyi de etkilemektedir. FSHR'nin Ala189Val homozigot mutasyonu; indirgenmiş testis hacmi, yüksek FSH konsantrasyonu ve bozulmuş spermatogenez ile sonuçlanmaktadır (Tapanainen ve ark., 1997, Kirschner ve ark., 2009).
Ön hipofizde üretilen FSH, Sertoli hücreleri üzerinden androjen bağlayıcı protein (ABP) üretilmesini de sağlamaktadır. ABP testislerde testosteron konsantrasyonu için gereklidir ki bu da spermatogenezin etkili biçimde ilerlemesine aracılık etmektedir.

ABP testiste spermatogenezin devamlılığını sağlamasının yanı sıra testosteronun bağlanması için gerekli olan bir reseptör olarak görev almaktadır. Ayrıca, androjene

bağlanan ABP yapılan çeşitli çalışmalarda fertilite ve spermatogenezin düzenlemesine etkin rol oynadığı yönünde rapor edilmiştir (Mathur ve ark., 2011).

Seminifer epitelde gerçekleşen spermatogenezin devamlılığında rol oynayan çoklu intrinsik faktörler görev alır (Lacham-Kaplan, 2004). Bunlar arasında, örneğin, kök hücre yenilenmesi ve hücre canlılığına etki eden c-kit tirozin kinaz reseptörü ve bunun ligandı (Rossi ve ark., 2000) , BMP-4 (Ying ve ark., 2001) ve Creb / crem gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri (Don ve Stelzer, 2002), post-mayotik spermatidlerde ifade edilen tr-kit ve Oct3 / 4 örnek olarak verilebilir (Yeom ve ark., 1996).

DNA onarımı proteini olan E3 tipi ubiquitin ligaz Hr6B'nin (Baarends ve ark., 2003), gonadotropin ile düzenlenmiş testiküler ribonükleik asit (RNA) helikazın GRTH / Ddx25, Dmc1 (Tsai-Morris ve ark., 2004) ve apoptoz düzenleyicileri olan Bax, Bcl-2, Fas / FasL ve çeşitli kaspazların (Sinha Hikim ve ark., 2003) spermatogenik kalite kontrolünde ve apoptoz ile defektif spermatojenik hücrelerin yok edilmesinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle, bcl-w geninin testisteki somatik ve germ hücrelerinin hayatta kalmasında rolü olduğu tespit edilmiş ancak diğer dokularda bir fonksiyonu görülmemiştir (Print ve ark., 1998)

Moleküler şaperonlar (Eddy, 1999) ve substrata spesifik proteazlar (26S proteazom), testiste yoğun olarak ifade edilmektedirler (Sutovsky ve Schatten, 2000). Hücrenin polaritesini belirleyen hücre-hücre adezyon molekülleri, normal spermiyogenez için esas teşkil etmektedir (Gliki ve ark., 2004).

Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör (GDNF), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) süper ailesinin bir üyesidir (Li ve ark., 2011). Glikozil fosfatidil inozitol ankoraj hücre yüzeyi molekülü GFR-1α (GDNF ailesel reseptör 1-alfa) ve RET transmembran tirozin kinaz proteininden (Jing ve ark., 1996, Treanor ve ark., 1996) oluşan bir reseptör kompleksi aracılığıyla bir sinyal gönderir.

GDNF'nin bağlanması ve reseptör kompleksinin ardışık aktivasyonu birçok farklı sinyal yolunu aktive eder (Airaksinen ve Saarma, 2002). SRC ailesine ait kinazları ve

PI3-K / PKB, Smad2 / 3 ve Ras sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla sinyalizasyon spermatogonyal kök hücrelerin (SKH) çoğalmasını teşvik ettiği belirtilmiştir (He ve ark., 2009). GDNF'nin SKH'lerin devamlılığında *in vivo* ve *in vitro* rolü çok önemlidir (Kubota ve ark., 2004, Meng ve ark., 2000). GDNF'nin yokluğunda SKH'ler kendini yenilemekten kaçarlar ve farklılaşmaya başlarlar, buna karşılık GDNF aşırı ekspresyonu SKH'lerin aşırı birikmesine (teratom) ve seminomatöz bir tümör oluşumuna da neden olabilir (Meng ve ark., 2000, Creemers ve ark., 2002, Yomogida ve ark., 2003). GDNF sinyalizasyonunun transkripsiyonel hedefleri SKH'lerin devamlılığında gerekli olan faktörleri içerir. Bu faktörler; Erm (Ets ile ilgili molekül; (Chen ve ark., 2005, Oatley ve ark., 2007), Bcl6b (B hücresi CLL / lenfoma 6, üye B) ve Lhx1 (Oatley ve ark., 2006) (LIM homeobox 1;). fibroblast büyüme faktörü (FGF) reseptör-2'nin ekspresyonunu da uyarmaktadır (Hofmann ve ark., 2005).

Spermatogenez için gerekli olan ancak GDNF tarafından düzenlenmeyen, SKH'ye özgü bilinen iki faktör vardır: PLZF (Buaas ve ark., 2004, Costoya ve ark., 2004) ve TAF4B (TATA kutu bağlayıcı proteinle ilişkili faktör 4B)(Falender ve ark., 2005).
Sertoli hücrelerinde FSH dışında Gdnf ifadesi *in vitro* olarak lokal olarak üretilen FGF2 (fibroblast büyüme faktörü 2), IL-1β (interlökin-1beta) ve TNFa'ya (tümör nekroz faktörü alfa) bağımlıdır (Simon ve ark., 2009).

Testis gelişimi ve testis fonksiyonunun farklı evrelerinde Stem Cell Faktör (SCF) / c-KIT sinyal yolağının aktive edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Yetişkinlerde SCF/c-KIT sinyalizasyonunun önemi, her iki gen işlevinin yokluğunda spermatogenez defektleriyle vurgulanmaktadır (Besmer ve ark., 1993).

Sertoli hücrelerinde eksprese edilen SCF, 2 formda görev yapar. Bunlar; ya salgılanır ya da hücre zarına bağlanarak işlev görürler (Huang ve ark., 1992). Membrana bağlı formun, komşu germ hücrelerine doğru sinyal iletmesine aracı olduğu düşünülürken, salgılanan form, interstitiyuma mesaj taşımada görev alır. Sertoli hücrelerinde Scf mRNA'nın kararlı ekspreyon seviyeleri, sıçan seminifer epitel döngüsünün II-VI aşamalardaki en yüksek değerlerini göstermektedir (Hakovirta ve ark., 1999). II-VI

aşaması ayrıca, FSH'nin indüklediği SCF transkripsiyon aktivasyonuna cevap verir (Yan ve ark., 1999). SCF reseptörü c-KIT, testiste geniş bir hücre yelpazesiyle ifade edilir. SCF'nin germ hücrelerinde c-Kit'e bağlanması, canlılıkla ilgili genlerin upregulasyonuna ve pro-apoptotik genlerin de down regülasyonuna neden olur (Yan ve ark., 2000a). Bu bulgular bir takım çalışmada SCF'nin germ hücrelerini apoptozdan korumaya neden olduğu ile açıklanabilir (Yan ve ark., 2000b). Leydig, Sertoli ve peritubular miyoid hücrelerde bulunan androjen reseptörleri (AR) testosteronu bağlar (Bremner ve ark., 1994).

Testosteron, testisteki basit difüzyon ile hedef hücrelere ulaşan nispeten küçük ve yağda çözünen bir moleküldür. Ligand AR'yi dimerize ederek, sitoplazmadan nükleusa translokasyon yapar ve androjen duyarlı genlerin transkripsiyonunu doğrudan etkiler.

Ligand reseptör kompleksiyle ilişkili faktörlere bağlı olarak AR hedef genlerinin transkripsiyonunu indükleyebilir veya bastırabilir (Hirawat ve ark., 2003). Androjenin bu modu klasik testosteron sinyali olarak bilinir. Bununla birlikte, testosteronun hücresel etkilerinin, MAPK yolu da dahil olmak üzere hücre sinyal yolakları ile AR‘ne bağlı etkileşimi aracılığıyla aracılık ettiğini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır (Walker, 2009).

On yıllar boyunca androjenlerin spermatogenezdeki rolünü incelemek için birçok farklı model kullanılmıştır (Dym ve Raj, 1977, Awoniyi ve ark., 1990, Chandolia ve ark., 1991, Meng ve ark., 2005, Petrusz ve ark., 2005, Denolet ve ark., 2006, Eacker ve ark., 2007). Bu raporların ve diğerlerinin bulguları, testosteronun, testis mimarisinin geliştirilmesi ve sürdürülmesinde rol oynadığını göstermektedir. Yetişkinlerde testosteronun eksikliği, defektif spermatogenezise ve infertiliteye neden olur ki, niteliksel olarak normal spermatogenezi korumak için testosteronun muhtemelen en önemli tek faktör olduğu varsayılmaktadır.

1.8.1.Normal Spermatogenez

Testis hacminin %85’ten fazlasını, aşamalı olarak diferansiye olan germ

hücrelerinden oluşan seminifer tübüller ve onları destekleyen Sertoli hücreleri oluşturmaktadır. Geri kalan bölüm ise kan damarları ve interstisyel alanlardaki Leydig hücrelerinden oluşur.

Spermatogenez, bazal membranda spermatogonya ile başlayan, spermatositlerle devam eden ve tübüler lümene geldiğinde, haploid spermatozoa ile sonlanan çok basamaklı bir süreçtir. Tip A spermatogonya, spermatogonyal kök hücre bileşenini temsil eder ve diploid kromozoma sahiptir (2N). Bu hücreler mitoz bölünmeyle spermatogonyumlardan farklılaşır ve tip B spermatogonyayı oluşturur (2N). Üst üste geçirilen iki mayoz bölünme ile haploid kromozomlu spermatidler meydana gelir. Sonraki aşamada spermatidlerin maturasyonu ile önce yuvarlak, sonra elonge spermatidler ve son olarak da matür spermatozoa oluşur. İnsan testisinde, bir tübüler bölgede, spermatogenezin farklı evreleri izlenebilir.

Azoospermi durumunda, testiküler biyopsinin normal olması, duktus obstruksiyonu için kesin ayırt edici bir tespittir. Özellikle geçirilmiş vazektomi gibi obstrüksiyon durumlarında, fokal olarak hipospermatogenez ve maturasyon arresti alanları izlenebilirse de, bunlar obstrüksiyonun klasik bulguları değildir (Joshi ve ark., 1972).

1.8.2.Sertoli Cell Only (Germ Hücre Aplazisi)

Germ hücre aplazisi olarak da adlandırılan Sertoli hücresi sendromu, seminifer tübüllerinde yalnızca Sertoli hücrelerinin sıralandığı testislerin histopatolojik olarak sınıflandırıldığı bir gruptur. Sertoli hücreleri kan-testis bariyerinin oluşmasında etkilidir ve sperm üretiminde çeşitli hücresel sinyal yolaklarında önemli görev üstlenirler. Bu hücreler, hipotalamustan salınan follikül uyarıcı hormona (FSH) yanıt verir ve spermatogenezin devamlılığını sağlarlar (Koh ve ark., 2006, Anniballo ve ark., 2000).

Sertoli Cell Only sendromu (SCO) komplet veya fokal olarak gelişebilir. Seminifer tübüllerin sadece Sertoli hücreleri ile döşeli olması, hiç germ hücre bulunmaması komplet form olarak değerlendirilir. Fokal formda ise bazı tubüllerde germ hücreleri bulunabilir ancak spermatogenezde hem kalitatif hem de kantitatif bozulma söz

konusudur (Turek ve ark., 1995).

Fizik muayene bulguları çoğunlukla spesifiktir ve tanı testiküler biyopsi bulgularına dayanarak yapılır. SCO sendromunun nedeninin belirlenmesi için çeşitli araştırmalar devam etmektedir. Bu sürecin etyolojisi ve mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Genel popülasyonda SCO sendromunun yaygınlığı son derece düşüktür. ABD'de çiftlerinin yaklaşık % 10'unda infertilite şikayeti bulunmaktadır. Bu çiftlerin yaklaşık % 30'unun altta yatan nedeni erkek faktörlüdür, diğer % 20'sinde erkek ve kadın faktörünün birleşimi var. Bu infertil erkeklerin % 5-10'undan azında SCO sendromu vardır. SCO sendromu, infertilite şikayeti ile tedavi görmek isteyen çiftlerde azoospermi değerlendirilirken ortaya çıkar. Bu kişilerde infertilite genellikle tek semptom olarak görülmektedir (Singh ve ark., 2017, McDougal ve ark., 2011).

1.8.3.Hipospermatogenez

Hipospermatogenezde (HP), seminifer tübüllerdeki bütün germ hücre serilerinde hücre sayıları doğru orantılı olarak azalmış durumdadır. Buna karşılık hipospermatogenezde, spermatogenezin her evresi histolojik inceleme sırasında izlenebilmektedir (McDougal ve ark., 2011, Cheng ve ark., 2017), ancak elonge spermatidlerin sayısının orta derecede veya ciddi oranda azalmış ve seminifer epitelyumun bileşiminin eksik ve germ hücrelerinden dolayı seyrek olması ile karakterizedir (Johannisson ve ark., 2003). Hipospermatogenezde, spermatogonyanın mitotik aktivitesi azalış, germ hücresi dejenerasyonunu gösteren apoptotik indekste artış ile beraber immunohistokimyasal analiz sonucunda kaspazların ifadesinde artışın gözlemlendiği bildirilmiştir (Steger ve ark., 1998). Spermiyogenez sırasında, başarılı ICSI tedavisinin prognozuyla ilişkili olan protamin ekspresyonunun, erken dönem spermatidlerde azalmış olduğu bilinmektedir (Steger ve ark., 2001, Mitchell ve ark., 2005).

Hipospermatogenezisi olan çoğu hastada testis hacmi azalmış durumdadır. FSH ifadesi tüm hastalarda olmasa da çoğu hastada artmış durumdadır. Germ hücre aplazisi ile seminifer tübül oranı pozitif yönde korelasyona sahiptir (Bergmann ve

ark., 1994). Çeşitli çalışmalarda, inhibin B'nin hipospermatogenezde daha spesifik ve sensitif bir endokrin belirteç olduğu bildirilmiştir (Ballesca ve ark., 2000, Brugo-Olmedo ve ark., 2001). Ancak, inhibin B ve FSH'nin kombine ölçümü bile, çoklu testis biyopsilerinde sperm varlığı veya yokluğu konusunda kesin bir bilgi sağlayamamaktadır (von Eckardstein ve ark., 1999, Bohring ve ark., 2002).

1.8.4. Maturasyon Arresti

Maturasyon arresti tanısıyla analizi yapılan azoospermik bireylerin histopatoloji sonuçlarında, belirli bir aşamaya kadar normal spermatogenezin sürdüğü ancak belirli bir aşamadan sonra germ hücrelerinin bir sonraki spermatogenez basamağına ilerleme gösteremediği matürasyonun duraklaması gösterdikleri gözlemlenir. Maturasyon duraklaması primer spermatosit, sekonder spermatosit ya da spermatid evresinde görülebilmektedir (Kim ve ark., 1996). İdiyopatik olarak kabul edilen non-obstrüktif azoospermili hastalarda mayotik arrest, düzenli olarak bulunur. Normal spermatogenezise kıyasla, mayotik maturasyon arrestinde birkaç genin ekspresyonunun ifadesindeki eksikliği gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. BOULE proteini mayoz bölünme faktörü olarak bilinmektedir. Maturasyon arresti olan hastaların büyük bir bölümünün primer spermatositleri BOULE protein ekspresyonundan yoksundur (Luetjens ve ark., 2004). Maturasyon Arresti olan hastalarda DNA yanlış katlanma onarımında görev alan Y kromozomu (HSFY) (Sato ve ark., 2006) veya HSPA2 gibi ısı şok protein transkripsiyon faktörü eksik veya ifadesinde azalma mevcuttur (Terribas ve ark., 2010).

1.8.5.Testiküler Atrofi Ve Fibrozis

Testiküler atrofi ve fibroziste hastalarda daha çok incelmiş bazal membran, tübüler ve peritübüler skleroz gözlemlenmektedir. Testiküler atrofi olan hastalarda hem germ hücreleri hem de Sertoli hücreleri bulunmamaktadır. Bu hastalarda testisler bilateral olarak küçülmüş ve yumuşak kıvamlı olarak bulunmaktadır (Sciurano ve ark., 2009).

1.9.Spermatogonyal Kök Hücreler

Testis spermatogonyal kök hücrelerin gelişiminde çok önemli bir yere sahiptir. Primitif germ hücreleri, seminifer kordların da şekillenmesiyle gonosit olarak

adlandırılır. Seminifer kordların şekillenmesi esnasında gonositler seminifer kord içinde santral pozisyonda lokalize olmuş durumdadır. Gonosit hücreleri, tübüllerin periferine göç etmesiyle artık spermatogonyum olarak adlandırılır (Bellve ve ark., 1977, Wein ve ark., 2015). İnsanda embriyonal gelişimde epiblast tabakasından köken alan ve sonrasında vitellus kesesi duvarında gözlemlenen kök hücreler 'Primordiyal Germ Hücreleri' olarak adlandırılırlar. Bu hücreler dişilerde oositlerin öncüsü olan oogonyumları, erkekte olgun sperm hücrelerinin öncüsü olan spermatogonyumları oluştururlar (Moore ve Persaud, 1998). Primordial germ hücreleri (PGC) gelişimsel olarak ilk germ hücreleridir ve SKH'lerin öncüleridir. SRY, Sertoli hücrelerinin farklılaşmasını düzenleyerek testis gelişimini uyarır (Jamieson ve ark., 1998, Wilhelm ve ark., 2005, Oatley ve Griswold, 2017).

Gebeliğin 2. trimesterinde seminifer tübül başına düşen germ hücre sayısında önemli bir artış meydana gelir. Doğumdan sonraki 4.aya kadar germ hücre sayısında bir düşüş söz konusu olur. Germ hücrelerindeki bu azalma immature Sertoli hücrelerinin proliferatif aktivitesinden kaynaklandığı bilinmektedir (Hilscher ve Engemann, 1992). Gonositler iki farklı hücre popülasyonundan meydana gelmişlerdir. Birincisi, büyük ve yuvarlak nükleuslu, az miktarda mitokondriye sahip, bol mikrofilament içeren hücre grubudur. Bu hücre grubu tüm gestasyon boyunca görülebilir.

İkinci grup gonositler ise birinci grup gonositlere zıt olarak sitoplazmalarında bol mitokondri ve yoğun glikojen bulundururlar. Bu grup ise gestasyonun 10. haftasında kaybolur. Gonositler mitoz ile çoğalarak spermatogonyumları meydana getirirler. Gonositlerin de 4 yaşına kadar testiste varlığının devam ettiği bildirilmiştir (Anafarta ve ark., 2007).
Spermatogenezis, olgun testiste spermatogonyal kök hücrelerin mitoza girip farklılaşmaya giden bir spermatogonya türünü tetiklemesiyle başlatılır. Böylece, SKH'ler iki önemli görevi, farklılaşarak spermatogenezi ve kök hücre olarak kalarak kendilerine kesintisiz olarak kaynaklık etme görevini yerine getirirler.

Gonositlerden önce koyu sitoplazmalı spermatogonyum A_{dark}'lar oluşur. Bunlar mitozla çoğalarak bir yandan yeni Ad spermatogonyal kök hücreleri oluştururken,

diğer yandan da daha açık sitoplazmalı spermatogonyum A_{pale}'leri oluşturur. Spermatogonyum A_{pale}'ler pubertede FSH ve LH'nin etkileriyle 16 günde bir mitoz ile bölünerek B tipi spermatogonyumu oluşturur. Puberte öncesinde seminifer tübüllerin lümenleri oluşmamış durumdadır. Tübüllerde lokalize olmuş spermatogonyumlar ile İmmatür Sertoli hücreleri arasında yerleşmiş olarak bulunur (Anafarta ve ark., 2007)

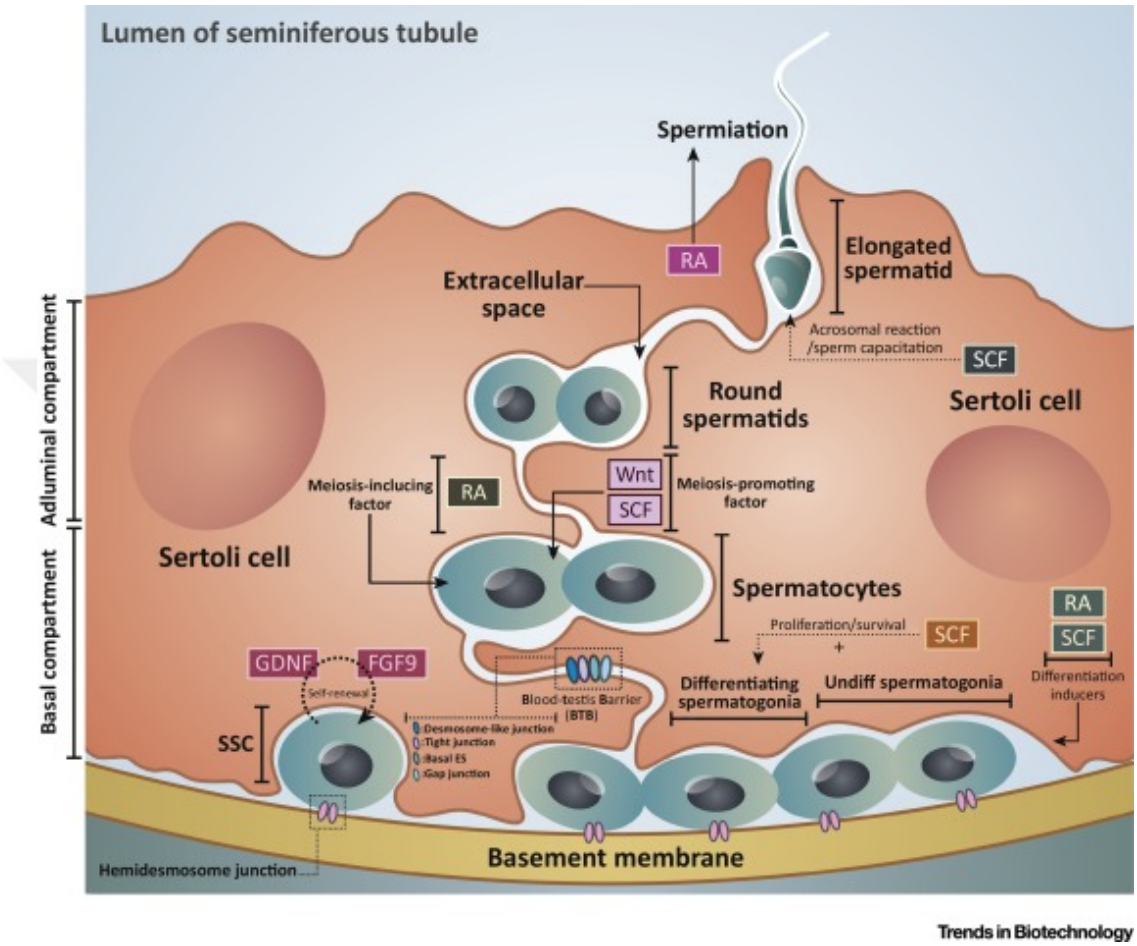
Spermatogonyum B'ler mitoz ile çoğalarak preleptoten spermatositlerini oluşturur. Bu hücreler seminifer tübüllerin bazal kompartmanında ve bazal membrana yakın yerleşmiş olup eş zamanda DNA duplikasyonu yaparlar. Sertoli hücreleri arasından lümene doğru ilerlerler (De Jonge ve ark., 2017).

Phillips ve ark. (2010) kemirgen testislerinde tanımlanan germ hücre biyobelirteçlerini çalışmışlardır. Şimdiye kadar insan dışı primatlarda SKH ve spermatogonya'nın özellikleri hakkında çok az şey biliniyordu (Phillips ve ark., 2010). Bununla birlikte, kemirgenlerde (GFRa1, PLZF, NGN3) SKH belirteçleri olarak kabul edilen proteinlerin ifadesi son zamanlarda Rhesus maymun testislerinde araştırılmıştır.
Rhesus maymunun ekspresyon profilinin, kemirgenlerin profiline benzediği gösterilmiştir. Primatlara benzer şekilde, insan testisinde hem A_{dark} hem de A_{pale} spermatogonya bulunur. Aktif A_{pale} spermatogonya'nın çoğalması, diferansiye olmuş B spermatogonya üretimini dengeleyerek ve A_{pale} havuzunu yenileyerek spermatogenezin devamlılığını sağlamaktadır. Spermatogonya A_{dark} hücrelerin kök hücrelerin yedek havuzu olduğu düşünülmektedir.

1.10.Spermatogonyal Kök Hücre Nişi

Spermatogonyal kök hücreler, seminifer epitelin taban bölümünde "niş" olarak adlandırılan özel bir mikro çevre ile yaşam boyu korunurlar. Spermatogonyal kök hücre niş'i, pluripotansi, kendini yenileme veya diferansiyasyon da dahil olmak üzere kök hücrelerin spesifik özelliklerini düzenler (de Rooij, 2009, Hermo ve ark., 2010, Kostereva ve Hofmann, 2008). Somatik hücreler SKH'lerin oluşumunda ve

işlev görmesinde önemli rol oynamaktadır. Niş, Sertoli hücreleri, peritubüler hücreler ve interstisyel Leydig hücreleri tarafından oluşturulur ve doku fizyolojisinin temel bir birimi olarak kabul edilir (Hofmann, 2008).



Esfandiari, F., et al. (2015). "Possibilities in Germ Cell Research: An Engineering Insight." Trends in Biotechnology **33**(12): 735-746.

Şekil 1.6. Sertoli hücreleri ile oluşturulan niş, spermatogenezin düzenlenmesinde çok kritik öneme sahiptir. Spermatogonial kök hücreler, seminifer tübüllerin taban zarında bulunur ve lümende sperm üretimi ve olgun spermlerin lümene salınması için Sertoli hücrelerinin komşuluğunda bir takım hücre bölünmelerini gerçekleştirir. SKH'ler niş faktörleri tarafından düzenlenen kendini yenileme ve farklılaşma dengesi içindedir. Örneğin, Sertoli hücreleri tarafından üretilen Glial türevi nörotrofik faktör (GDNF), fibroblast büyüme faktörü 9 (FGF9), retinoik asit (RA) ve kök hücre faktörü (SCF) SKH'de kendini yenileme, farklılaşma ve mayoz bölünme indüksiyonu da dahil olmak üzere farklı hücresel olayların gerçekleşmesinde rol oynar. **ES**: ektoplazmik spesifikasyon (Esfandiari ve ark., 2015).

Seminifer epitel içindeki somatik hücreler olan Sertoli hücreleri, SKH'lerin büyümesi ve kendini yenilemesi için gerekli GDNF, basic fibroblast büyüme faktörü

(bFGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü salgılar (Hofmann ve ark., 2005, Kostereva ve Hofmann, 2008, Kubota ve ark., 2004).

Sertoli hücrelerinin germ hüceleri üzerindeki direkt etkisinin yanı sıra, seminifer epitelden, peritubular miyoid hücrelerden, Leydig hücrelerinden ve aynı zamanda kan kaynaklı faktörler ile SKH'lerin ve spermatogonyanın oluşumunu kontrol ederler (de Rooij, 2009, Hermo ve ark., 2010, Kostereva ve Hofmann, 2008). Tüm bu dışsal sinyaller, kök hücrelerin akibetini kontrol etmede çok önemli bir role sahiptir. Seminifer tübüllerin bazal kompartmanındaki SKH'ler, adezyon molekülleri vasıtasıyla temel zarın elemanları ile bağlanır.

Kök hücre nişi, kök hücrelerin içinde bulunduğu ve kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini destekleyerek etkileşime girdiği bir mikro ortam olarak tanımlanır (Xie & Spradling 2000). Kök hücre nişine potansiyel olarak cevap veren hücreler hem doğal olarak hem de deneysel prosedürden sonra kök hücre transplantasyonu gibi niş dışında da varlıklarını sürdürebilirler. Progenitörlerin farklılaşmaya hedeflendiği bir hücre bölünmesine girmesi nişten ayrılmanın kesin bir işareti olarak kabul edilir.

Testis kök hücre nişinin temel bileşeni, kök hücre nişlerinin sayısını belirleyen ve dolayısıyla destekleyebilecekleri SKH'lerin popülasyon boyutunu sınırlayan Sertoli hücreleridir (Oatley ve ark., 2011). Moleküler seviyede, Sertoli hücresi kaynaklı GDNF (Meng ve ark., 2000) ve CSF-1 muhtemelen testis kök hücre nişinin en önemli regülatörüdür. Bu sitokinler, sırasıyla GFR1A ve CSF1R için reseptörler, farklılaşmamış spermatogonya tarafından ifade edilir (Meng ve ark., 2000, Hofmann ve ark., 2005, Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004, Kubota ve ark., 2004, Kokkinaki ve ark., 2009). Bununla birlikte, GFR1A'nın gerçek bir SKH markeri olup olmadığı (Buageaw ve ark., 2005, Ebata ve ark., 2005, Grisanti ve ark., 2009) hakkında çalışmalar halen devam etmektedir.

1.11. Spermatogonyal Kök Hücrelerin Regülasyonu ve Spermatogonya Fonksiyonları

Niş mikroçevresi tarafından SKH'lerin karakterleri korunmaktadır. Nişler, SKH'lerin kendi kendini yenilemesi ve hücre farklılaşması gibi hücresel olaylarda önemli bir rol oynamaktadır. SKH'ler, diferansiye olmuş hücreler, komşu hücreler ve hücre dışı matriksler arasında karmaşık etkileşimleri içermektedir (Dadoune, 2007, Hofmann, 2008). SKH'lerin ve spermatogonyaların fonksiyonlarının düzenlenmesi çok yönlü ve çok faktörlüdür ve günümüzde tam olarak anlaşılamamıştır.

İn vivo ve *in vitro* çalışmalar, SKH'lerin çoğalması ve farklılaşmasının GDNF kontrolü altında olduğunu göstermiştir. GDNF, FSH stimülasyonundan sonra Sertoli hücreleri tarafından üretilir (de Rooij, 2009, Hermo ve ark., 2010, Hess ve ark., 2006). SKH'lerin kendini yenilemesinin, RET tirozin kinaz / GRFα1 kompleksi aracılığıyla GDNF sinyaline bağlı olarak gerçekleştiği bilinmektedir (Dadoune, 2007, Hofmann, 2008, Meng ve ark., 2000, Oatley ve ark., 2007). Perinatal dönemde SKH'lerin akıbetinin GDNF (Naughton ve ark., 2006) sinyalleri tarafından düzenlendiği, pubertal ve erişkin testislerde ise Sertoli hücreleri tarafından salgılanan Ets-related molekülüne (ERM) bağımlı olduğu düşünülmektedir. Muhtemelen ERM, kan testis bariyer fonksiyonunun ve testiküler bağışıklığın korunmasında etkili olduğu varsayılmaktadır (Hess ve ark., 2006, Tyagi ve ark., 2009, de Rooij, 2009).

FGF2 reseptörü (FGFR2) yoluyla etki eden FGF2, Sertoli hücreleri tarafından üretilen başka bir büyüme faktörüdür. FGF2, SKH'lerin kendi kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki dengenin düzenlenmesinde yer alır (de Rooij, 2009). SKH'lerin farklılaşmasında rol alan bir diğer faktör de BMP4'tür. BMP4 gelişimden önce, organogenezde primordial germ hücrelerinin hayatta kalmasını ve genital köprülerdeki kolonizasyonu muhtemelen hücre göçü sırasında hücrelerin adhezif özelliklerinde meydana gelen değişiklikler yoluyla kontrol eder (Dudley ve ark., 2010).

In vitro çalışmalar ayrıca BMP4 ile indüklenen diferansiyasyonun adhezif özelliklerinde meydana gelen değişiklikler eşliğinde olduğunu göstermiştir. Ayrıca, BMP4'ün hücre farklılaşması için önemli bir faktör olan c-Kit-reseptörünün ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Carlomagno ve ark., 2010). SKH'ler c-Kit-R'yi ifade etmez, ancak diferansiye olmuş germ hücrelerinde ifade edildiği görülmüştür.

İn vivo çalışmalarda, seminifer epitelyumda SKH'lerin ve farklılaşmamış spermatogonyanın lokalizasyonu interstisyel dokuda kan damarlarının dağılımı ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Caires ve ark., 2010, de Rooij, 2009, Shetty ve Meistrich, 2007). Seminifer epitel, bir bireyden bir sonraki kuşağa genetik bilginin aktarılmasından sorumlu mevcut spermatogonyal kök hücrelerin varlığından dolayı yüksek bir rejeneratif potansiyele sahiptir.

İnsan spermatogonyalarının bazı fenotipleri kemirgenler ve maymun SKH'leri ve onların ataları ile benzer belirteçleri ifade eder. Hem fenotipe hem de spermatogonyanın spesifik belirteçlerine ilişkin detaylı bir analiz, testiste kök hücre düzenlenmesinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir.

Spermatogonyal kök hücreler (SKH), spermatogenez ve erkek infertilitesinin temelini oluşturmaktadır. Diğer dokuya özgü kök hücrelerde benzer şekilde diferansiye olacak hücrelerin temelini oluşturur. Ancak dokuya özgü kök hücrelere göre, SKH'ler nadir bulunurlar ve kemirgen testislerindeki SKH'ler tüm germ hücrelerinin sadece % 0.03'ünü temsil eder (Tegelenbosch ve de Rooij, 1993). Testiküler SKH'ler tipik olarak unipotent kök hücrelerdir. Ve sadece germ hücre soyunu ve nihayetinde spermatozayı oluşturmaktadır (Phillips ve ark., 2010).

SKH'ler diğer tüm kök hücreler gibi kendini yenileyen bölünmeleri dengeleme ve diferansiyasyon kabiliyetleri ile tanımlanır. Bu denge kök hücre havuzunu korur ve testisin proliferatif talebini her gün milyonlarca sperm üretmesi ile karşılar. SKH'ler için yapılan çalışmalar karmaşıktır, çünkü bu hücreler az sayıdadır ve şimdiye kadar spesifik tanımlayıcı belirteçler sınırlı sayıdadır.

1.12 Spermatogonyal kök hücre belirteçleri; CD133

Prominin-1 (CD133), 5 transmembran bölümden oluşan ve iki büyük glikozile ekstraselüler domaini içeren multispan membran protein ailesinin bir üyesidir (Weigmann ve ark., 1997, Fargeas ve ark., 2003a, Fargeas ve ark., 2003b).
Memelilerde prominin-1 paraloglarının genomik yapısı benzer şekildedir. Bunun yanında türler arasında kayda değer ölçüde korunmuş durumdadır (Fargeas ve ark., 2003b, Fargeas ve ark., 2007). Prominin-1 kodlayıcı bölgeler toplam 28 ekzondan oluşmuştur (Fargeas ve ark., 2003b). Shmelkov ve arkadaşları (2004), insan prominin-1'in, 5 alternatif promotordan oluştuğunu (P1-P5 olarak adlandırılır) göstermişlerdir. Bu alternatif promotorların üçü bir CpG adasında yer alır ve kısmen metilasyon ile düzenlenen alternatif promotörlerin kontrolü altında olduğunu bildirilmişlerdir (Shmelkov ve ark., 2004, Pleshkan ve ark., 2008).

Bazı kanserlerde prominin-1'in aşırı ekspresyonu için, bozulmuş DNA metilasyonu, önemli bir belirteç olarak kabul edilebilir (Yi ve ark., 2008, Baba ve ark., 2009). Kompleks gen düzenlenmesini vurgulayan, 5 ‘UTR - çevrilmemiş bölgede yer alabilecek en fazla 10 alternatif ekson tanımlanmıştır (Shmelkov ve ark., 2004). PROM1 geninde estradiol reseptörü için potansiyel bağlanma sekansı tanımlanmıştır (Campbell ve ark., 2006). Böylece fertilizasyonda implantasyon süreci sırasında uterin luminal epitelde geçici olarak upregüle olduğu tespit edilen PROM1 ‘in estrodiol ile olan ilişkisini daha iyi anlamamızı sağlamaktadır.

Fare embriyonik kök hücrelerinde (ES) diferansiyasyonla beraber prominin-1 ‘in upregüle olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, farklılaşmanın son aşamalarında, prominin-1 ifadesi baskın olarak tespit edilmemiştir (Kania ve ark., 2005). Bu benzersiz ekspresyon değişimi, prominin-1'i ES'den türetilen ve erken progenitör hücreleri tanımlamak için potansiyel bir araç haline getirebilir. İnsanlarda, ES hücre dizilerinde AC133 tespit edilmiştir (Hofmann ve ark., 2005, Kaufman ve ark., 2001), “embriyonid body”lerden türeyen hücrelerin prominin-1 transkriptlerini ifade ettiği

tespit edilmiştir (Shamblott ve ark., 2001, Levenberg ve ark., 2002) insan prominin-1 (AC133), çeşitli embriyonik epitellerde hem protein düzeyinde hem de gen transkripti düzeyinde tespit edilmiştir (Corbeil ve ark., 2000, Kosodo ve ark., 2004). Kısacası, fare ve insanda prominin-1 böbreklerde, kolonda, prostatta, pankreasta, karaciğerde, meme bezlerinde (laktifer kanallar), epididimal kanal boyunca epitellerde ekspresyonları tespit edilmiştir. İncelenen tüm prominin-1 pozitif epitel hücrelerinde, prominin-1 apikal plazma membran alanında lokalize olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, prominin-1'in diğer proteinler ve membran lipidleri ile ilişkisi ile ilgili olarak plazma membran dinamiklerinin ve membran bütünlüğünün sağlanmasında iskelet protein olarak işlev gördüğü kanıtlanmıştır (Fargeas ve ark., 2004, Karbanova ve ark., 2008, Fargeas ve ark., 2007, Gashaw ve ark., 2007, Jaszai ve ark., 2008, Corbeil ve ark., 2000, Florek ve ark., 2007).

1.12.1. CD133 splice varyantları

Prominin-1 geni, alternatif splice (Fargeas ve ark., 2003a, Shmelkov ve ark., 2004, Fargeas ve ark., 2004) varyantlarına sahiptir. Bu değişkenliğin işlevsel önemi henüz anlaşılamamıştır. Ancak bazı varyantların ortaya çıkışı ontogenetik olarak (Corbeil ve ark., 2009) ve/veya dokuya özgü olarak düzenlenmiş olduğu bilinmektedir (Fargeas ve ark., 2004, Yu ve ark., 2002). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, prom1 genininin açık okuma çerçevesini (ORF) etkileyen 12 adet alternatif splice varyantı, ekstraselüler domain ve intraselüler domainlerinde tanımlanmıştır (Fargeas ve ark., 2004, Fargeas ve ark., 2007).

1.12.2. CD133- Glikoformları

Genel olarak, N-bağlı glikozilasyonlar, prominin-1'in görünür moleküler kütlesinin (yaklaşık 112-120 kDa) yaklaşık olarak% 15-20'sini oluşturmaktadır (Weigmann ve ark., 1997, Miraglia ve ark., 1997, Corbeil ve ark., 2000, Fargeas ve ark., 2004). İnsan prominin-1'de N-glikan terminal kısımları sialilasyona tabi tutulurken (Zhou ve ark., 2010), polipeptidi herhangi bir O-bağlantılı glikan taşımadığı tespit edilmiştir (Sgambato ve ark., 2010).

Sialik asitler doku ve hücrelerin çözünebilir ve çözünemez bölümlerinin yapısal bileşenleridir. Sialik asitler nöraminik asitin asetillenmiş türevleri olarak bilinmektedir (Wang ve Brand-Miller, 2003). Asidik yapıları nedeniyle hücre yüzeyine negatif yük kazandırırlar ve hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinde önemli rol oynarlar. Ayrıca sialik asit rezidüleri spesifik hücresel tanıma bölgelerini maskeleme yeteneğine de sahip etki göstermektedir (Traving ve Schauer, 1998).

Araştırmalarda, ratların epididim ve testislerinde, prominin-1'in splice varyantlarının birkaç farklı glikoformda var olabileceği ileri sürülmektedir (Fargeas ve ark., 2004). Katalitik aktivitenin olmayışında veya prominin-1 tarafından direkt olarak modüle edilen bir sinyal yolağının yokluğunda, farklı posttranslasyonel modifikasyonların söz konusu olabileceği bildirilmektedir.

Örneğin, bağırsak hücrelerinin genel glikozilasyon yerleşiminin değiştirilmesi ile birlikte olan spontan enterositik diferansiyasyon üzerine Caco-2 hücrelerinde, AC133 immünreaktivitesinin bulunmaması, AC133'ün glikozilasyon durumu arasındaki bağlantıyı göstermektedir (Corbeil ve ark., 2000). Bu bağlamda CD133 geni üzerinde bulunan glikozilasyon bölgelerinin protein ifadesinde ve çeşitli hastalıklarla olan ilişkisinde çok önemli bir yeri bulunmaktadır. Benzer şekilde Hemmoranta ve ark.(2007) yaptıkları çalışmada, AC133 pozitif ve AC133 negatif hematopoietik kök ve progenitör hücrelerin glikozilasyon profillerinde farklılıklar gözlemlemişlerdir (Hemmoranta ve ark., 2007).

Genellikle, prominin-1, mikrovillus veya siliyum uçlarında yoğunlaşmış olarak görülmektedir (Weigmann ve ark., 1997, Dubreuil ve ark., 2007). Bu yoğunlaşmış görünüm karakterini gösteren diğer hücresel örnekler de:
(1) üropodda göç eden hematopoietik kök ve progenitör hücrelerin geriye doğru çıkıntı yapan bir yapısı (Giebel ve ark., 2004, Fonseca ve ark., 2010);
(2) oligodendrosit hücre gövdesinden gelişen miyelin kılıflarında (Corbeil ve ark., 2009); ve
(3) fotoreseptörlere bağlanan silyumdan çıkan plazma membranında şeklinde

sıralanabilir (Maw ve ark., 2000). Gurudev ve arkadaşları, Plazmalemma'nın düzlem bölgelerinden çıkıntı yapan membran yapılarında, prominin-1'i, direkt olarak membran kolesterolü ile etkileşime girdiğini ve tüm bunları bir membran mikrodomain ("lipid raft") oluşturması ile ilişkilendirmişlerdir (Florek ve ark., 2007, Janich ve Corbeil, 2007). Prominin-1'in, ekstraselüler-1 domaini içerisinde potansiyel bir gangliosid bağlama yeri taşıdığı bilinmektedir (Taieb ve ark., 2009). Plazma membran çıkıntılarında spesifik lokalizasyona ek olarak prominin-1, küçük zar vezikülleri ile birlikte çeşitli vücut sıvıları (iç ve dış) içinde salınabilmektedir (Marzesco ve ark., 2005).

1.12.3. CD133'ün İşlevi

İnsan PROM1 plazma membran çıkıntılarının hücresel regulasyonunda yer alan bir iskelet proteini olarak görev yapmaktadır. Prominin-1, diğer proteinlerle (sitoplazmik, membranöz ve / veya solubl) etkileşim içerinde olması, uygun adezyon / sinyal moleküllerinin oluşımuyla organize edebilmektedir.

Bu protein komplekslerinin dağılımını korumak için, prominin-1 içeren kolesterol-temelli membran mikrodomain sitoskeleton elementleri ile etkileşimi gereklidir. Prominin-1 sinyal yollarının regülatörü olarak, nöral (Kosodo ve ark., 2004) ve hematopoetik (Fonseca ve ark., 2008, Fargeas ve ark., 2007) sistemlerde veya kanserli kök hücrelerde (Lathia ve ark., 2011) bulunan kök hücre bölünmesindeki simetrik ve asimetrik dağılım, kök hücre özelliklerinin altında yatan kilit rollerinin anlaşılmasında önemli bir yeri vardır.

Benzer şekilde, progenitör hücrelerin farklılaşması ile birlikte bulunan membran vezikülleri ile birlikte hücre dışı salınımı (Marzesco ve ark., 2005, Bauer ve ark., 2011) yine prominin-1'in görevleri arasında bulunmaktadır. Prominin-1 içeren membran mikrodomainlerinin ve veziküllerin proteomik düzeyde karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Epitel hücrelerinde prominin-1, mikrovililerde ve apikal plazma zarının benzer çıkıntılarında yoğunlaşır ve hücre yüzeyinin düzlemsel alt domaininde daha az bulunmaktadır (Weigmann ve ark., 1997, Corbeil ve ark., 2000). Hematopoietik kök hücreler gibi epitel dışı hücrelerde, prominin-1 yine plazma membranı çıkıntıları bakımından zengin olarak eksprese edilmektedir (Corbeil ve ark., 2000). Araştırmacılar prominin-1'in epitel hücrelerinin plazma membran çıkıntılarında spesifik, lokalizasyonunun prominin-1'in kolestrol ile spesifik olarak etkileşime girdiği yeni bir zar mikrodomaini içerdiğini göstermişlerdir (Roper ve ark., 2000).

1.13. AMAÇ

Bu tez çalışmasında spermatogenez sürecinde germ hücre proliferasyonu, diferensiyasyonu ve hücre canlılığında rol oynayan spermatogonyal kök hücreleri tanımlayacak yeni biyobelirteçlerin araştırılması amaçlanmıştır. Histopatoloji sonuçlarına göre gruplandırılmış olan NOA (Hipospermatogenez, Maturasyon Arresti ve Sertoli Cell Only olan olgular) ve OA'lı bireylerde karşılaştırmalı olarak tanımlanan gen ifadelerinin belirlenmesi ve spermatogenez defektindeki rolleri araştırılmıştır.

Erkek infertilitesinde spermatogenez defektleri çok önemli bir yer tutmaktadır. Spermatogenez sürecinde halen bilinmeyen birçok nokta olduğundan, erkek infertilitesi ile ilgili daha fazla sayıda moleküler temelli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma spermatogenez sürecini daha iyi anlamamıza ve erkek infertilitesinin etyolojisinin aydınlatılmasına ve tedavisine yardımcı olacaktır.

Bu kapsamda bu çalışma ile

1- Erkek infertilitesinde seçtiğimiz kök hücre belirteçlerinin spermatogenez sürecindeki rollerinin araştırılması
2- Spermatogenez sürecinde Sertoli Cell Only, Maturasyon arresti ve Hipospermatogenezi olan NOA'lı bireylerde kök hücre ifade farklılıklarının gen transkripsiyonları düzeyinde belirlenmesi,

3- Ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı değişen gen ve/veya genlerin western blot tekniği ile protein düzeyinde ifadelerinin belirlenmesi
4- İstatistiksel olarak anlamlı belirlenen gen/genlerin alınan TESE doku kesitlerindeki lokalizasyonları ve tutulumlarının immunohistokimyasal olarak belirlenmesi,
5- Bu tez çalışması ile histopatoloji sonuçlarına göre gruplandırılmış hastalarda spermatogonyal kök hücre ifade farklılıkları belirlenerek, ileride yapılacak histopatoloji analizlerine moleküler temelli bir dayanak sağlanması,
6- Belirlenen kök hücre belirteçleri sayesinde hipospermatogenezi ve maturasyon arresti olan bireylerden elde edilecek germ hücrelerinin ileride yapılacak ko-kültür çalışmaları ile hücrelerinin diferansiyasyonunda etkin mekanizmaların aydınlatılması ve infertilite tedavisinde yeni gelişmelere kaynaklık etmesi hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme Ve Solüsyonlar

2.1.1. Hasta Materyali

Çocuk sahibi olmak isteyen, 1 yıldan fazla süre korunmasız ilişkiye ve düzgün bir cinsel birlikteliğe rağmen eşlerinde gebelik sağlayamama nedeniyle Ankara Üniversitesi Üreme Sağlığı Teşhis, Tedavi, Eğitim, Araştırma ve Uygulama merkezine (USAUM) ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan rutin tanı ve tedavi kapsamında semen, kan analizi ve sonrasında mikroTESE (Testislerden, mikroskop altında olgun sperm içeren, olası tubüllerin çıkarılması) (Ashraf ve ark., 2013) gerçekleştirilen ve TESE örneklerinin histopatolojik incelenmesi sonucu NOA ve OA olarak gruplandırma yapılan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. 60 NOA (20 Hipospermatogenez, 20 Maturasyon Arresti ve 20 Sertoli Cell Only Sendromu) ve 10 OA (obstrüktif azoospermi) olmak üzere toplam 70 infertil erkeğin, rutin teşhis ve tedavi için kullanılacak TESE dokusundan artan, atılacak olan artık dokusundan RNA ve protein izolasyonu yapılmıştır. OA tanısı, fiziki muayene, hormon değerleri, skrotal eksplorasyon ve testis biyopsisi sonuçları değerlendirilerek konulmuştur. Burada OA teşhisi konmuş hastalar spermatogenez süreçlerinin normal olması nedeniyle literatürdeki diğer çalışmalarda da olduğu üzere kontrol olarak değerlendirilmiştir (Li ve ark., 2016). Hastaların folikül stimule edici hormon (FSH) ve testesteron seviyeleri Kemilüminesans İmmunoassay yöntemiyle değerlendirilmiştir (Beckman Coulter UniCel DxI 800 System, USA).

Serum FSH ve testosteronu kapsayacak şekilde her hastanın hormon profilleri belirlenmiştir. Her hasta klinik muayene ve hormon analizine (FSH, Testesteron) göre değerlendirilmiştir. (FSH referans aralığı 1.0-10.5 mIU/mL ve testosteron referans aralığı 2.0-12 ng/mL). Semen örnekleri Dünya Sağlık Örgütü 2010 (Cooper ve ark., 2010) 'nun belirlemiş olduğu kriterlere göre değerlendirildi. 15 gün aralıkla tekrarlanarak ve gerekiyorsa 2 ay sonra yeniden yapılarak, ejekülatların mikroskobik

analizi sonrasında pellette hiç sperm bulunmaması durumunda bu olgular azospermi olarak değerlendirildi. Bu hastalarda Y kromozom mikrodelesyonu ve karyotipleri değerlendirilerek 46,XY normal karyotipli ve Y-mikrodelesyonu olmayan hastalar çalışmaya dahil edildi. NOA ve OA gruplarının histolopatoloji sonuçları, Johnsen skorlamasına göre gruplara ayrıldı. Testis biyopsilerinin değerlendirilmesi kantitatif olarak patoloji laboratuvar ında yapılmıştır. Günümüzde rutin patoloji değerlendirmede en çok kullanılan yöntem Johnsen skorlama metodudur (Johnsen, 1970). Testis biopsisindeki seminifer tübüler için spermatid, spermatozoa ve Sertoli hücrelerinin durumlarına göre bir skor verilir ve tübül sayısına oranlarak bir skor elde edilir ve bu skorlama ile NOA hasta grupları;

Hipospermatogenez
Maturasyon Arresti
Germ Hücre Aplazisi (Sertoli Cell Only Sendromu) olarak sınıflandırıldı.

2.1.2. 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, 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.

2.1.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinde Kullanılan Malzemeler

cDNA sentezi için 170-8841 iScirpt Reverse Transcription Supermix, (Biorad, Hercules, CA) 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.

2.1.4. 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: 1X TBE solüsyonu,

100 mlEtidyum 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).

2.1.5. Custom İnsan spermatogonyal Stem Cell PCR Array Ve Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitive RT-PCR) Yönteminde Kullanılan Malzemeler

Custom Human spermatogonyal Stem Cell PCR Array, Bio-Rad CFX 96 Real-Time PCR sistemikullanılarak yapıldı.

172-5274 SsoAdvancedUniversal SYBR Green Bio-Rad

1 Plate Custom Human Spermatogonyal Stem Cell Primer Library: Bu primerlerin listesi çizelge3.3'te verilmiştir.

2.2. RNA İzolasyonu

Trizol (Invitrogen, ABD), izolasyonu yapılacak dokunun ve/veya homojenizasyonu ile hücreleri parçalayıp, RNA bütünlüğünü sağlamaktadır.

2.2.1.Homojenizasyon

TESE dokularının PBS ile yıkama işlemi için, 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant kısım atıldı. Doku peleti üzerine (en az 50 mg dokuya 1 ml Trizol) Trizol ilave eildi.

2.2.2. Faz Ayrımı

Homojenize olan dokular oda ısısında yaklaşık 5 dk inkübe edildi. Her tüpe 200µl kloroform(Merck, Almanya) ilave edildi. Tüpler 10-15 sn. çalkalandı. Daha sonra yine oda ısısında 10 dk inkübe edildi. 12,000 x g.'de soğutmalı santrifüjde, 15 dk $+4^0$C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 3 faz oluşumu gözlemlendi. Dikkatli bir şekilde, üst faz yeni bir tüpe alındı.

2.2.3. RNA Presipitasyonu

Yeni tüpe alınan süpernatant üzerine 500 µl izopropil alkol (Merck, Almanya) ilave edildi. Sonrasında oda ısısında 10dk inkube edildi. 12,000 x g.'de soğutmalı santrifüjde, 10 dk $+4^0$C'de santrifuj edildi.

2.2.4. RNA Yıkaması

Santrifüj sonrası dikatli bir şekilde, süpernatant atıldı, pellet üzerine 1 ml %75'lik etanol (Merck, Almanya) ilave edildi. Örnekler çok hafif vorteklendi ve 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüj edildi.

2.2.5. RNA'nın sulandırılması

Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet oda sıcaklığında bekletilerek kurutma işlemi yapıldı. Sonrasında RNA, 50 µl RNaz içermeyen DEPC'li (Applichem, Almanya) su içerisinde çözüldü.

2.2.6. RNA Kantitasyonu

RNA'ların miktarı ve saflığı spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerlerine göre belirlendi.

2.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Pronase) jel deneyde kullanılacak materyale göre hazırlanır. Bu çalışmada RNA ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. %1'lik agaroz jel için 1 g agaroz tartılıp, TBE 1X solusyonu ile 100 ml'ye tamamlandı.

TBE 1X solusyonu; TBE 10X solusyonunun 1/10 oranında ddH_2O ile seyreltilmesiyle hazırlanır.

TBE 10X solusyonunun hazırlanışı;

108 g TrizmaR (Biobasic, Kanada),

55 g Borik asit (Amresco, USA),

40 ml 0,5 M EDTA (Merc, Almanya)
ve deiyonize su (ddH_2O) ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır.

Hazırlanan jel, uygun taraklar kullanılarak jel tankına döküldü. Jelin donması için yaklaşık 25- 30 dk beklendi. Jel donduktan sonra elektroforez tankına düzgün bir şekilde yerleştirildi. Elektroforez solüsyonu TBE 1X ile tank hacmine göre ilave edildi. Her kuyucuğa, 2 µl RNA alınarak, 2 µl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Amresco, USA) ile karışım hazırlayıp kuyucuklara yüklendi. 120 V akımda 20 dk elektroforezde yürütme işlemi yapıldı. Elektroforezde yürütülen örnekler Quantum-ST4 100/26MX, Vilber/Courmat jel görüntülüme cihazında görüntülendi (Şekil 3.2).

2.3. RT² Profiler ™ PCR Dizi Sistemi

PCR Array, 96 kuyucuklu, tabakada hastalık odaklı genlerin ve yolakların analizinin yanı sıra, uygun bir RNA kalite kontrolü için, optimize gerçek zamanlı qRT-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 hasta örneklerinden RNA izole edilerek cDNA sentezi yapılmış ve 10 spermatogonyal kök hücre belirteci ile 2 referans genin ifadelerinin analizi yapılmıştır. Protokol çizelge 2.2'de net bir şekilde açıklanmıştır.

İlk olarak TESE dokularından izole edilen RNA örneklerinden en az 1000 ng kullanılarak) 170-8841 iScirpt Reverse Transcription Supermix Reaksiyon Buffer (5X) *ile* c-DNA sentezlendi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. c-DNA sentez protokolü

Master Mix Hazırlanışı:		
Komponentler	**Hacim**	**Final Konsantrasyon**
170-8841 iScirpt Reverse Transcription Supermix Reaksiyon Buffer (5X)	4µl	1X
RNA	Değişken	En az 1000 ng
RNAse free ddH_2O	Değişken	16-RNA miktarı
Toplam Hacim 20 µl		
25^oC' de 5 dk ---- inkubasyon		
48^oC' de 30 dk ---- inkubasyon		
95 ^oC' de 1 dk ---- revers transkriptaz inaktivasyon		

qRT-PCR uygulamalarında kullanılan hedef genler ve Housekeeping (Housekeeping/referans gen: Her dokuda hücre canlılığını devam ettirebilmesi için mutlaka ifade edilen genlerdir) genlere özgü primerler (Real Time Primers, USA), doğruluğu hem primer BLAST hem de "Perl Primer" programı kullanılarak doğrulandı. ″SYBR Green″ (Roche, Almanya) floresans boyası kullanılarak primerlerin optimize edildiği sıcaklık olan 58^oC'de kantitasyon (Eş Zamanlı PCR) yapıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. qRT-PCR protokolü

Master Mix Hazırlanışı:	
Komponentler	**Hacim**
H_2O, PCR-grade	3µl
Primer (10x konst) (Forward)	0.5µl
Primer (10x konst) (Reverse)	0.5µl
Sybr Green (2xkonst)	5µl
c-DNA	1µl
Toplam Hacim: 10µl	

qRT-PCR Programı:	
Denaturasyon	95^{o}C 5 dak
Amplifikasyon	95^{o}C 30 sn
	58^{o}C 30 sn 45 siklus
	72^{o}C 30 sn
Melting	95^{o}C 10 sn
	65^{o}C 1 dak
	95^{o}C continuous
Cooling	40^{o}C 10 sn

Etidyum bromür hazırlanışı;

Steril dH_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 tamamlandı. Vorteks yapılarak karıştırıldı.

2.4. Protein İzolasyonu

Laboratuvara soğuk zincir ile taşınan mikro-TESE dokuları steril koşullarda analiz için 1x1x1 $cm^{3'}$lik parçalara bölündü. Kalan dokular -80°C dondurucuda saklandı. Protein eldesi için öncelikle analiz için ayrılan dokuların homojenizasyonu, ardından proteinlerin birincil yapılarına getirmek üzere kaynatma işlemi yapıldı.

2.4.1. Homojenizasyon

1. 50ml falkon tüplere alınan dokular 1ml PBS (fosfat buffer tampon çözeltisi) ile yıkandı.
2. Hazır olarak temin edilen 1x RIPA lysis buffer ve 1x proteinaz inhibitörü dokular üzerine eklendi.
3. Tüpler buz üzerine alınarak dokular homojenizatör yardımıyla ile parçalandı.
4. Parçalama işleminin ardından 30 sn vorteks, sonrasında 20dk soğutmalı santrifüjde $+4^0$C'de 16000 rcf'te (eppendorf centrifuge 5415R, Almanya) santrifüj edildi

2.4.2. Protein Kaynatma

Yeni tüpe alınan süpernatantlarda Bradford yöntemiyle protein miktar tayini yapıldı. Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue boyası ile örnek arasındaki bağlanma kapasitesine bağlı olarak protein miktarı tayini için kullanılan bir yöntemdir. Tayin için önceden hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda standartlar kullanıldı.

Standart hazırlamak için BSA (bovin serum albümin) ve dH_2O kullanıldı.0mg/ml, 0.25mg/ml, 0.50mg/ml, 0.75mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.5mg/ml, 2.0 mg/ml konsantrasyon aralıklarında standartlar kullanıldı.

96'lik kuyucuklu tabakanın her bir kuyusuna 98µl Coomassie Brilliant Blue ve 2µl standart/örnek karışımı eklendi. Karanlık ortamda yaklaşık 10 dk karıştırıcıda (Biosan multİ-bio 3D, Letonya) inkübe edildi. İnkübasyonun ardından spektrofotometre ile 595 nm'de absorbans değeri ölçüldü ve standart eğrisi çizilerek absorbans denklemi elde edildi.

Proteinleri eşit konsantrasyonlarda kaynatabilmek için protein miktar tayininde elde edilen sonuçlar kullanıldı. Kaynatma işlemi öncesinde total karışımın 40 µg olması için kullanılacak protein, dH_2O, LSB (Laemmli 2x sample buffer, Sigma) ve β-Merkaptoetanol (2-Mercaptoethanol, Sigma) miktarı hesaplandı. Karışımlar kısa vortekslendi ve 96°C'de ısı bloğunda (Grant QBD2) 7dk kaynatıldı. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra proteinler -80°C dondurucuda saklandı.

Protein kaynatma işleminin amacı proteinlerin jel içinde eşit ve kolay yürümeleri için denatüre edilerek primer yapıda olmalarını sağlamaktır. Bu sebeple ikincil yapı oluşumuna neden olan disülfit bağları LSB ve β-Merkaptoetanol ile indirgenir. Proteinler, negatif yük ile yüklenir ve primer yapı korunmuş olur.

2.5.Western Blot

Western blot özgün bir proteinin analiz yöntemidir. Bu yöntem ile analiz edilen bir çok proteini içeren hücre / dokuda özgün bir proteinin varlığı ve miktar kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilir.

2.5.1. Jelin Hazırlanması ve Proteinlerin Yürütülmesi

Resolving ve stacking solüsyonlarından oluşan hazır jel kiti (Bio-rad TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit %10, USA) kullanılarak jeller hazırlandı. İlk kuyucuğa 5µl marker (Color protein standard broad range, Biolabs) diğer kuyucuklara da TESE örneklerinden izole edilen ve kaynatılan proteinler toplam 15µl olarak yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra proteinler 45 dk 150 V'da yürütüldü.

2.5.2.Transfer

Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin antikor ile işaretlenebilmesi için proteinler jelden nitroselüloz membrana (Bio-rad, CA) transfer edildi.
İlk olarak transfer buffer hazırlandı. Ardından membranların aktifleştirilmesi sağlandı. Membranlar aktifleştirildikten sonra transfer cihazının (Trans-blot turbo,

Bio-rad) kasetine yerleştirildi. 30 dk 2,5A 25V'ta jelde ki proteinlerin membrana transferi sağlandı.

2.5.3. Bloklama

Transfer işleminin başarıyla gerçekleşmesi ile özgün olmayan bağlanma bölgelerinin bloklanması gerekir. Bloklama işleminin amacı antikorların yanlış bağlanmasını engellemektir. Bloklama için 1gr yağsız süt tozu- 40ml 1x TBST karışımı kullanıldı. Membranın kurumasına fırsat vermeden 10 ml bloklama solüsyonuna kondu ve bloklanması için 1 saat shakerda oda ısında inkübe edildi.

2.5.4. Antikor ile Muamele

Bloklama işlemini takiben 1/1000 oranında primer antikor hazırlandı, gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bu işlem ile özgün proteine primer antikor bağlanır. Ertesi gün oda sıcaklığında primer antikor karışımı membranlardan uzaklaştırılıp, yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi 1x TBST ile 4 kez 7'şer dakika ara ile yapıldı. Yıkama işleminin amacı özgün proteine bağlanmamış ortamda bulunan fazla antikorların uzaklaştırılmasıdır. Ardından membranlar 1/5000 oranında hazırlanan primer antikora uygun sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 1x TBST ile 7'şer dakika ara ile yıkama yapıldı.

2.5.5. Görüntüleme

Görüntüleme için Clarity Western ECL-substrate luminol/enhancer solüsyonları (Bio-rad) kullanıldı. Tüm görüntüleme işlemleri karanlık ortamda yapıldı. Membran ECL solüsyonu ile muamele edilerek, HRP - Hidrojen Peroksit - Luminol arasındaki kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi beklendi. Membranlardaki proteinler ChemiDoc-Mp görüntüleme sistemi (Bio-rad) ile görüntülendi (Şekil 3.4).

2.5.6. Hesaplama

Görüntüleme ile elde ettiğimiz bantların hesaplaması Image Lab (Bio-rad) programı kullanılarak yapıldı. Hesaplama işleminin amacı bandı oluşturan protein miktarının kantitatif olarak ifadesini elde etmektir.

SDS-PAGE Resolving Jel (%10) Hazırlanması (2X)

10ml Resolver A

10ml Resolver B

100 µl APS(%10)

10 µl TEMED

SDS-PAGE Stacking Jel Hazırlanması (2X)

3,5 ml Stacker A

3,5 ml Stacker B

35 µl APS(%10)

7 µl TEMED

10x Running Buffer Hazırlanması

10.8 g SDS

30.3 g Tris

144g Glisin

1L'ye kadar dH_2O tamamlanır.

Transfer Buffer

75ml Metanol

5,4 gr Glisin

1,14 gr Tris

300 ml'ye kadar dH_2O tamamlanır.

2.6.İmmünhistokimyasal Yöntem

Mikro TESE yapılan hastalara ait parafin bloklardan 5 mikronluk kesitler hazırlandı. Kesitler polilizinli lamlar üzerine alındı. Lam üzerine alınmış parafin kesitler 75° C'de 20 dakika inkübe edildi. Sonrasında deparafinizasyon işlemi farklı çözücülerde 5'er dk bekletilerek gerçekleştirildi. Sonrasında lamlar distile sudan geçirildi. Sonrasında, endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Bloke işlemi sonrasında PBS ile lamlar yıkandı. Sonrasında UltraV block (Cat: TA-125-UB, Lot: AUB100129, Lab Vision, Thermo Scientific) ile non-spesifik bağlanmaların engellenmesi gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra lamlar yıkanmadan 1/10 oranında hazırlanan anti-CD133 antikoru (CD133/1 - W6B3C1 Miltenyi Biotec GmbH, Germany) ile +4 ^{0}C 'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında lamlar yine PBS ile yıkandı. Sonrasında biotinli sekonder antikor (goat anti-mouse polyvalent Lab Vision, Thermo Scientific) ile inkübasyonu sağlandı. PBS ile yıkama işlemi sonrasında, enzim-biotin kompleksinin sağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim (Lab Vision, Thermo Scientific) ile inkübe edildi. Yine PBS yıkama işlemi sonrasında, ortama diaminobenzedin (DAB) substratı (Ultra vision DAB, Spring Bioscience) içeren kromojen DAB eklenerek yaklaşık 5-10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer"in hematoksilen"i kullanıldı. DAB ile boyanan lamlar azalan alkol serilerinden geçirildi. Sonrasında 20 dakika ksilolde bekletilerek lamel entallan ile kapatıldı. Kesitler mikroskop altında görüntülendi ve fotoğrafları çekilerek değerlendirildi.

2.7.Sertoli hücre kültürü

Ticari olarak satın alınan Sertoli hücreleri (HSeC-Human Sertoli Cells, Lonza Walkersville, MD**)** protokole uygun bir şekilde SeBM Sertoli Cell Basal Medium içerisinde, % 5 FBS ve % 1 Penicilin olacak şekilde besleme işlemi yapıldı. Hücreler 35 ^{0}C 'de % 5 CO_2 altında büyütüldü. Hücrelere en fazla 3 pasaj yapılabildi. 6'lık plakalarda hücrelere gün aşırı besleme işlemi yapıldı. Hücreler çözündükten yaklaşık 1 hafta sonra immunfloresan boyama işlemine tabi tutuldu.

2.8.Lazer tarmalı Konfokal Mikroskopta İmmunfloresan görüntüleme

Sertoli hücrelerinin immunfloresan boyaması: Cover slip kaplanmış 6'lı well plate içerisine her kuyucukta en az $3x10^5$ hücre olacak şekilde Ticari Sertoli hücrelerinin ekimi gerçekleştirildi. 24 saat sonra kuyucuk tabanında konfluent olan hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi ve hücrelerde 3 kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerin yıkama işlemi sonrasında 30 dk FBS ile bloklama işlemine tabi tutuldu. Bloklama aşamasından sonra tekrar 3'er kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında 1/50 oranında konjuge CD133-PE antikoru (CD133-PE, 130-080-801 Miltenyi Biotec GmbH, Germany) ile oda ısısında 2 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon işlemi sonrasında PBS ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında DAPI çekirdek boyası ve mitotraker FM mitokondri boyası ile muamele edilerek tekrar bir yıkama işlemi sonrasında lamel ile kapatıldı. Görüntüler LSM 800 Zeiss Lazer taramalı Konfokal mikroskopta (Zeiss LSM800, GmbH, Germany) analiz edildi. İzotip IgG boyama işlemide aynı protokolle gerçekleştirildi.

Sağlıklı sperm hücrelerinin immunfloresan boyanması:

Sağlık bireyden alınan semen örneği oda ısısında 30 dk likefikasyon işlemi için beklendi. Likefikasyon sonrasında örnek 20 dk 1500 rpm 'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sperm pelleti 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında konjuge anti-CD133, mitotoraker ve DAPI boyamaları gerçekleştirildi. İzotip IgG-PE boyamasıda aynı protokolle gerçekleştirildi. Görüntüler LSM 800 Zeiss Lazer taramalı Konfokal mikroskopta (Zeiss LSM800, GmbH, Germany) analiz edildi.

2.9.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 karşılaştırmada Kruskal-Wallis testinden 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. Histopatoloji Sonuçlarına Göre Hastaların Değerlendirilmesi

MikroTESE'ye alınan olguların yaş aralıkları 25-50 ve yaş ortalamaları 33 olarak saptandı. Hormonal değerlendirilmeleri yapılan hastaların serum FSH ve Testesteron değerleri çizelge 3.1' de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Histopatoloji sonuçlarına göre gruplandırılmış hastaların yaş, FSH ve Testesteron değerleri

		Yaş	Serum FSH Değeri (IU/L)	Serum Testesteron Değeri (ng/ml)
	N	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)
OA	10	32,5 (26,0-35,0)	4,95 (2,0-22,0)	350 (200-700)
HP	20	32,0 (25,0-43,0)	15,0 (2,0-58,0)	300 (173-908)
MA	20	32,5 (26,0-50,0)	5,5 (0,6-52,0)	300 (50-866)
SCO	20	34,0 (29,0-48,0)	18,0 (0,7-60,0)	275 (82-800)
p Değeri		*p > 0,05*	*p < 0,05*	*p > 0,05*

OA: *Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez* ***MA:*** *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

SCO grubundaki hastaların FSH değerleri hem kontrol olarak değerlendirilen OA grubundan hem de MA ve HS grubundaki hastaların FSH değerinden daha yüksek olduğu gözlemlendi. Testesteron değerlerinin tüm gruplarda birbirine yakın olduğu tespit edildi.

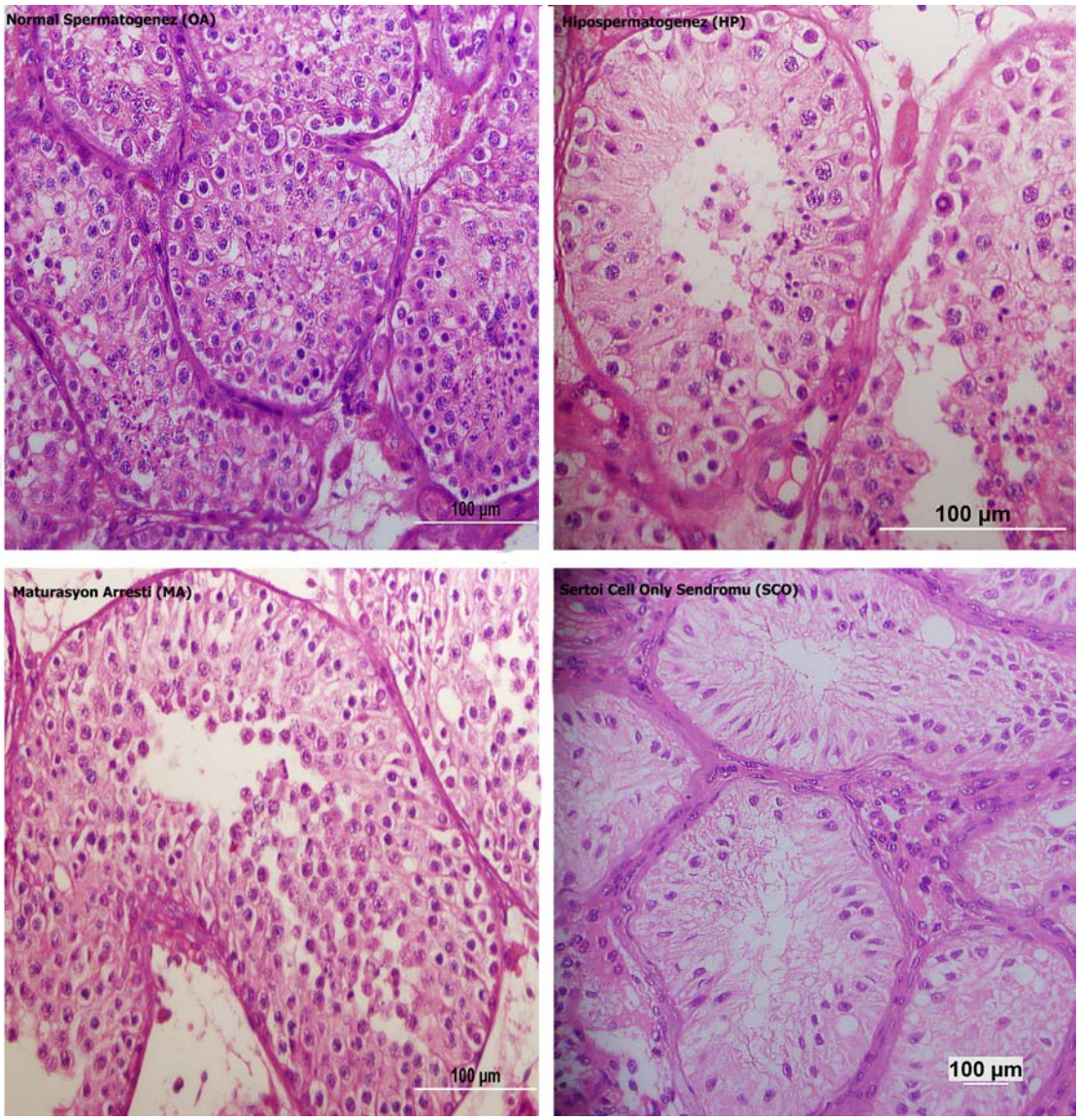
Gruplar histopatoloji sonuçlarına göre sınıflandırılmadan OA ve NOA olarak kıyaslandığında, serum FSH değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 4,95 IU/L ve 11 IU/L olarak tespit edilirken, Testesteron değerlerinde istatistiksel olarak farklılık tespit edilmemiştir (**Çizelge 3.2**)

Çizelge 3.2. OA ve NOA grubu hastaların yaş, FSH ve Testesteron değerleri

		Yaş	Serum FSH Değeri (IU/L)	Serum Testesteron Değeri (ng/ml)
	N	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)
OA	10	32,50 (26,0-35,0)	4,95 (2,00-22,00)	350 (200-700)
NOA	60	33,00 (25,0-50,0)	11,00 (0,60-60,00)	300 (50-908)
p Değeri		*p > 0,05*	*p < 0,05*	*p > 0,05*

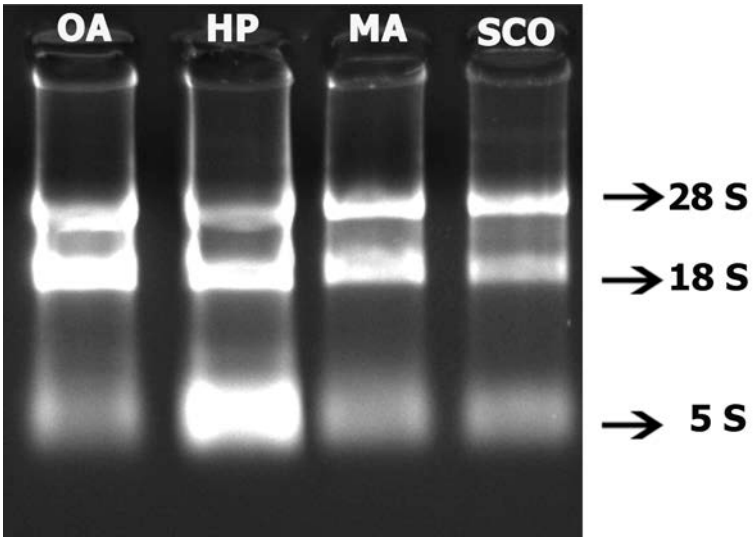
OA: *Obstrüktif Azoospermi* ***NOA:*** *Non-Obstrüktif Azoospermi*

NOA ve OA'lı gruplardanalınan doku kesitleri ışık mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. TESE biopsilerinin histopatolojik görüntülenmesi; Obstruktif azoospermi, Hipospermatogenez, Maturasyon Arresti, Sertoli Cell Only Sendromu

TESE dokularından trizol ile RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların kantitasyonu spektrofotometrede hesaplandı. RNA'ların görüntülenmesi %1'lik agoroz jelde elektroforez yöntemi ile yapıldı. Hastalara ait RNA görüntüleri şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. TESE dokularından elde edilen RNA örneklerinin %1'lik agoroz jel elektroforez görüntüsü. ***OA:*** *Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez* ***MA:*** *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

3.2. Spermatogonyal Kök Hücre Gen İfadelerinin Analizi

OA ve NOA (Hipospermatogenez, Maturasyon Arresti ve Sertoli Cell Only Sendromu) hastalarından farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerinden başlangıç miktarı 1000 ng olacak şekilde cDNA sentezi yapıldı.

cDNA sentezi yapıldıktan sonra bu cDNA'larda Custom Human Spermatogonyal Kök Hücre panelinde bulunan 10 adet gen ve 2 adet referans houskeeping genlerinin qRT-PCR analizi yapıldı (Çizelge 3.3)

Çizelge 3.3. Tez çalışmasında analizi yapılan Spermatogonyal Kök Hücre belirteçleri

GEN-ID(NCBI GEN)	GEN SEMBOL	GEN ADI
7070	CD90	CD 90 Molecule (Thy-1 cell surface antigen)
3815	CD117	C-kit (KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase)
3688	CD29	ITGB 1 (integrin subunit beta 1)
8842	CD133	CD133 Molecule (prominin 1)
3400	ID1	İnhibitor of DNA binding-1 ID1
100133941	CD24	CD24 molecule
3655	ITGA6	integrin subunit alpha 6

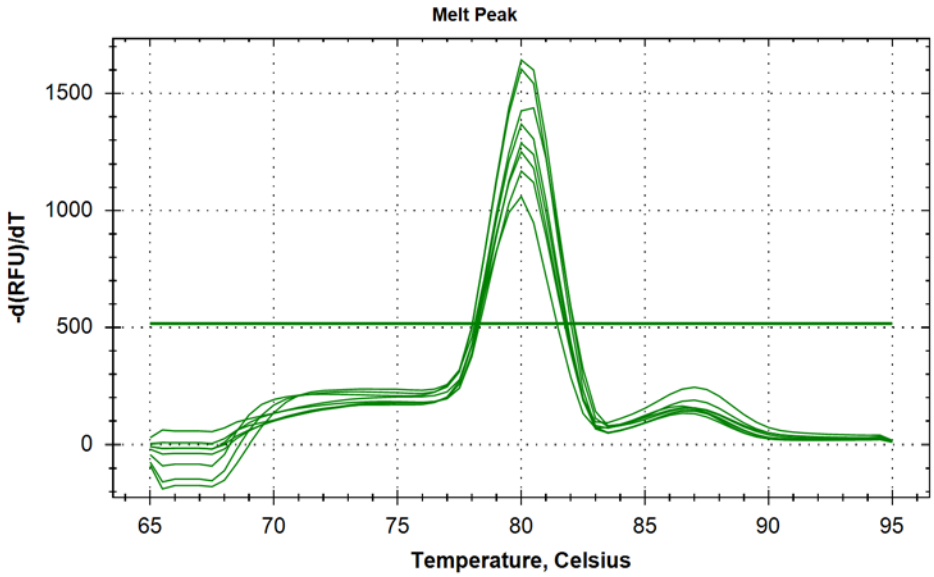
1759	DNM-2	Dinamin 2
38639	LİN28A	lin-28 homolog A
5460	POU5F1	POU class 5 homeobox 1, OCT3/4
6141	RPL18	Ribosomal protein L18
2597	GAPDH	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase

Analiz 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

$$R = \frac{(\mathrm{E}_{\ \mathrm{hedef}})^{\ \Delta \mathrm{CP}\ \ \mathrm{Hedef}(\mathrm{kontrol-örnek})}}{(\mathrm{E}_{\ \mathrm{Ref}})^{\ \Delta \mathrm{CP}\ \ \mathrm{Ref}(\mathrm{kontrol-örnek})}}$$

formülü kullanılmıştır. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları log2 tabanına çevrilerek gen ifadelerindeki artış/azalışlar kat olarak verilmiştir. (R: Oran, E: Ekspresyon, Ref: Referans, CP: Kesişme Noktası)(Livak ve Schmittgen, 2001)

Histopatoloji sonuçları göz ardı edilerek, NOA ve OA grubu hastalarının da analizi gerçekleştirildi. NOA grubu, OA grubuna göre kıyaslandı ve 1'e karşı test edildi. Yapılan her qRT-PCR analizinin ardından, analizi yapılan bölgenin hedef bölge olduğunu, non-spesifik bir bağlanmanın olmadığını gösterme amacıyla (melt curve) erime eğrisi analizleri yapılmıştır (**Şekil 3.3).**



Şekil 3.3. Yapılan RT-PCR analizinde yapılan erime eğrisi analizi. Hedef bölgenin doğruluğu ve farklı bir pik vermemesi nedeniyle doğru bölgenin analizinin yapıldığı gözlemlenmiştir.

3.2.1.CD90 (THY-1) Gen İfadelerinin Analizi

CD90 gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 1,20±0,21 ($p>0,05$) kat artış gösteriyorken, MA grubunda 0,40±0,05 ($p<0,001$) kat azalış göstermektedir, SCO grubunda ise CD90 gen ifadesi 4,73±1,03 ($p<0,001$) kat artış göstermektedir (**Çizelge 3.4).**

Çizelge 3.4. CD90 (THY1) gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	CD90 (THY-1) Mean ± SD	*p*
HP	20	1,20±0,21	*p > 0,05*
MA	20	0,40±0,05	*p < 0,001*
SCO	20	4,73±1,03	*p < 0,001*
NOA	60	2,17 ±0,43	*p < 0,05*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu (p<0,001), HP - SCO (p<0,01) ve MA- SCO (p<0,001) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda CD90 gen ifadesi 2,17 ±0,43 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. (p<0,05)

3.2.2. CD117 (c-Kit) Gen ifadelerinin analizi

CD117 gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; Hipospermatogenez hastalarında 2,42±0,66 (p<0,05) kat, MA grubunda 1,50±0,28 (p>0,05) kat, SCO grubunda ise CD117 gen ifadesi 6,23±1,43 (p<0,05) kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (**Çizelge 3.5).**

Çizelge 3.5. CD117 (c-Kit) gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	CD117 (C-Kit) (Mean ± SD)	*p*
HP	20	2,42±0,66	*p < 0,05*
MA	20	1,50±0,28	*p > 0,05*
SCO	20	6,23±1,43	*p < 0,05*
NOA	60	3,45 ±0,60	*p < 0,001*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu (p>0,05) arasında istatistiksel olarak anlam bulunmazken, HP - SCO (p<0,05) ve MA- SCO (p<0,05) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda CD117 gen ifadesi 6,23 ±1,43 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (p<0,001).

3.2.3.CD29 (ITGβ-1) Gen ifadelerinin analizi

CD29 gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 0,08±0,01 ($p<0,001$) kat, MA grubunda 0,85±0,10 ($p>0,05$) kat azalış gösteriyorken, SCO grubunda ise CD29 gen ifadesi 2,10±0,47 ($p<0,05$) kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (**Çizelge 3.6).**

Çizelge 3.6. CD29 (ITGβ1) gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	CD29 (ITGB1) (Mean ± SD)	*p*
HP	20	0,08±0,01	*p < 0,001*
MA	20	0,85±0,10	*p > 0,05*
SCO	20	2,10±0,47	*p < 0,05*
NOA	60	1,06 ±0,20	*p > 0,05*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu ve HP-SCO grubu ($p<0,001$) arasında istatistiksel olarak anlamlılık varken, MA - SCO ($p>0,05$) grupları arasında istatistiksel olarak anlam tespit edilememiştir.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda CD29 gen ifadesinde 1,06 ±0,20 bir değişim gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$).

3.2.4. CD133 (PROM 1) Gen ifadelerinin analizi

CD133 gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 0,80±0,34 ($p>0,05$) kat, MA grubunda 0,04±0,01 ($p<0,001$) kat azalış gösteriyorken, SCO grubunda ise CD133 gen ifadelerinin transkripsiyon

seviyeleri 50 siklus döngüdeki real-time analizinde tespit edilememiştir (**Çizelge 3.7).**

Çizelge 3.7. CD133 (PROM1) gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	CD133(PROM1) (Mean ± SD)	*p*
HP	17	0,80±0,34	*p > 0,05*
MA	20	0,04±0,01	*p < 0,001*
SCO	20		*N/A*
NOA	37	0,39 ±0,16	*p < 0,001*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA ($p<0,001$) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda CD133 gen ifadesinde 0,39 ±0,16 kat azalış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,001$).

3.2.5. ID1 (Inhibitor of DNA-1) Gen İfadelerinin Analizi

ID1 gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 2,26±0,50 ($p<0,05$) kat artış gösteriyorken, MA grubunda 0,84±0,14 ($p>0,05$) kat azalış göstermektedir, SCO grubunda ise ID1 gen ifadesi 2,86±0,55 ($p<0,001$) kat artış göstermektedir (**Çizelge 3.8).**

Çizelge 3.8. ID1(Inhibitor of DNA 1) gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	ID1 (Mean ± SD)	*p*
HP	20	2,26±0,50	*p < 0,05*
MA	20	0,84±0,14	*p > 0,05*

SCO	20	2,86±0,55	*p < 0,05*
NOA	60	1,99 ±0,27	*p < 0,001*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu ve HP-SCO grubu (p>0,05) arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmazken, MA – SCO (p<0,001) grupları arasında istatistiksel olarak anlam tespit edilmiştir.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda ID1 gen ifadesi 1,99 ±0,27 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (p<0,05).

3.2.6. CD24 Gen İfadelerinin Analizi

CD24 gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 1,59±0,31 (p>0,05) kat artış gösteriyorken, MA grubunda 0,54±0,08 (p<0,001) kat azalış göstermektedir, SCO grubunda ise CD24 gen ifadesi 1,55±0,35 (p>0,05) kat artış göstermektedir (**Çizelge 3.9).**

Çizelge 3.9. CD24 gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	**CD24 (Mean ± SD)**	***p***
HP	18	1,59±0,31	*p > 0,05*
MA	20	0,54±0,08	*p < 0,001*
SCO	20	1,55±0,35	*p > 0,05*
NOA	60	1,23 ±0,17	*p > 0,05*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu ve MA-SCO grubu ($p<0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunurken, HP – SCO ($p>0,05$) grupları arasında istatistiksel olarak anlam değişiklik yoktur.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda CD24 gen ifadesi 1,23 ±0,17 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$).

3.2.7. CD49f (ITGα6) Gen İfadelerinin Analizi

CD49f gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 0,65±0,15 ($p<0,05$) kat, MA grubunda 0,22±0,03 ($p<0,01$) kat azalış gösteriyorken, SCO grubunda ise CD49f gen ifadesi 1,67±0,37 ($p>0,05$) kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (**Çizelge 3.10).**

Çizelge 3.10. CD49f (ITGα6) gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	CD49f(ITGA6) (Mean ± SD)	*p*
HP	19	0,65±0,15	*p < 0,05*
MA	20	0,22±0,03	*p < 0,001*
SCO	20	1,67±0,37	*p > 0,05*
NOA	60	0,87 ±0,15	*p > 0,05*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu ($p>0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmazken, HP-SCO ve MA-SCO ($p<0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmaktadır.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda CD49f gen ifadesinde 0,87 ±0,15 bir değişim gösterdiği tespit edilmiştir (p>0,05).

3.2.8. DNM-2 (Dinamin 2) Gen İfadelerinin Analizi

DNM2 gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 1,60±0,30 (p>0,05) kat artış gösteriyorken, MA grubunda 0,28±0,05 (p<0,001) kat, SCO grubunda ise DNM2 gen ifadesi 0,86±0,18 (p>0,05) kat azalış gösterdiği tespit edilmiştir (**Çizelge 3.11).**

Çizelge 3.11. DNM2 (Dinamin 2) gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	DNM2(Dinamin 2) (Mean ± SD)	*p*
HP	20	1,60±0,30	*p > 0,05*
MA	20	0,28±0,05	*p < 0,001*
SCO	20	0,86±0,18	*p > 0,05*
NOA	60	0,90 ±0,13	*p > 0,05*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu (p<0,05) arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunurken ve MA-SCO grubu ve HP – SCO (p>0,05) grupları arasında istatistiksel olarak anlam değişikliği yoktur.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda DNM2 gen ifadesinde 0,90 ±0,13 bir değişim gösterdiği tespit edilmiştir. (p>0,05)

3.2.9. LİN28A Gen İfadelerinin Analizi

LİN28A gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 1,02±0,17 ($p>0,05$) kat artış gösteriyorken, MA grubunda 0,22±0,04 ($p<0,001$) kat azalış göstermektedir, SCO grubunda ise Lin28A gen ifadesi 8,71±1,78 ($p<0,001$) kat artış göstermektedir (**Çizelge 3.12).**

Çizelge 3.12. LİN28A gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	LİN28A (Mean ± SD)	*p*
HP	20	1,02±0,17	*p > 0,05*
MA	20	0,22±0,04	*p < 0,001*
SCO	20	8,71±1,78	*p < 0,001*
NOA	60	3,44 ±0,79	*p < 0,05*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu ($p<0,05$), HP - SCO ($p<0,05$) ve MA- SCO ($p<0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda Lin28A gen ifadesi 3,44 ±0,79 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,01$).

3.2.10. POU5F1 (OCT3/4) Gen İfadelerinin Analizi

POU5F1 gen ifadesindeki kat artış/azalışlar gruplarda sırasıyla; HP hastalarında 0,83±0,24 ($p>0,05$) kat, MA grubunda 0,16±0,02($p<0,001$) kat azalış gösteriyorken, SCO grubunda ise POU5F1 gen ifadesi 3,56±0,68 ($p<0,001$) kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (**Çizelge 3.13).**

Çizelge 3.13. POU5F1 (OCT3/4) gen ifadelerinin RT-PCR analizi

	N	POU5F1(OCT3/4) (Mean ± SD)	*p*
HP	20	0,83±0,24	*p > 0,05*
MA	20	0,16±0,02	*p < 0,001*
SCO	20	3,56±0,68	*p < 0,05*
NOA	60	1,56 ±0,31	*p > 0,05*

NOA: *Non-Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez*
MA: *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

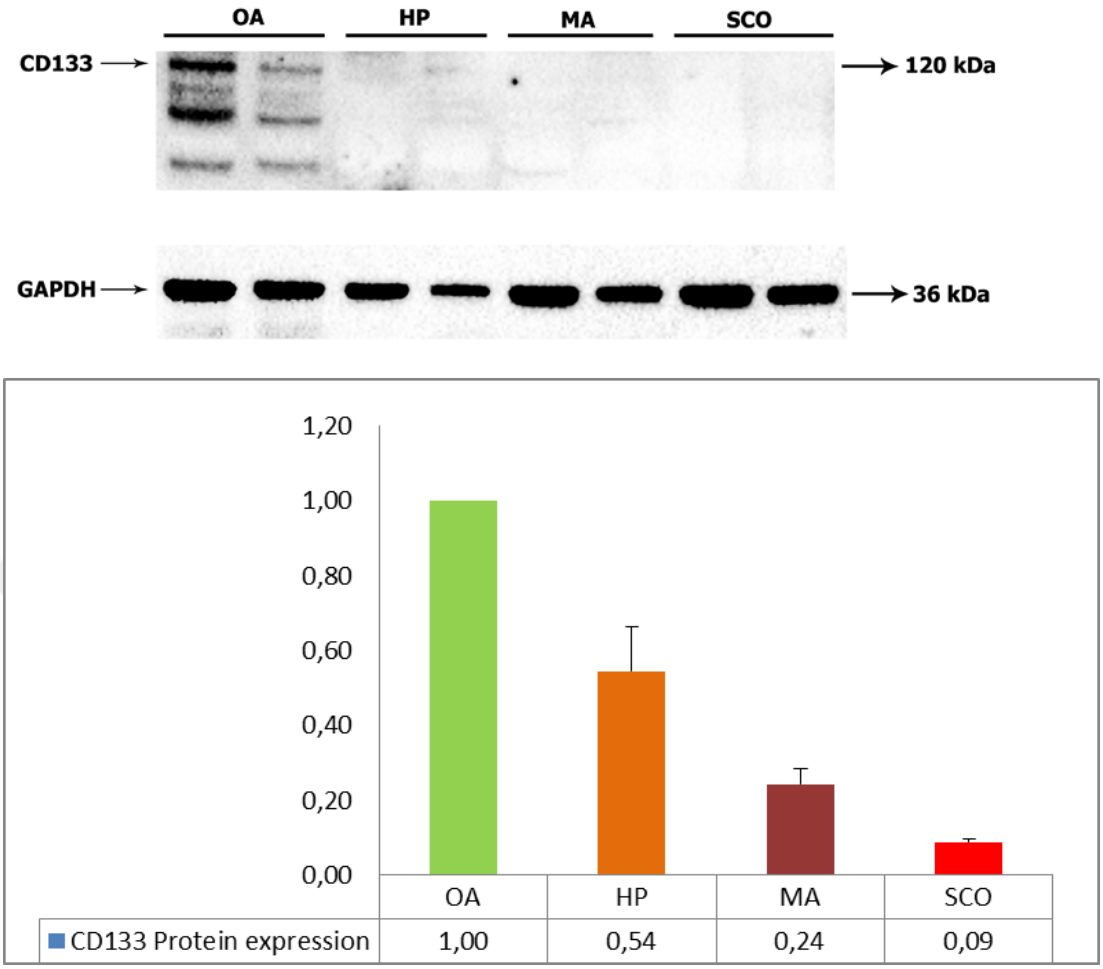
Kruskal-Wallis test analizine göre gruplar arasında anlamlılıkları test edildiğinde HP - MA grubu ($p<0,05$), HP - SCO ($p<0,05$) ve MA- SCO ($p<0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Hasta grupları histopatolojik ayrıma tabi tutulmaksızın NOA ve OA grupları olarak kıyaslandığında NOA grubunda POU5F1 gen ifadesinde 1,56 ±0,31 bir değişim gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Yapılan gen ifadeleri analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı değişen CD133 geninin protein düzeyinde doğrulanması western blot analizi ile gerçekleştirildi.

3.3. CD133 geninin Western Blot Analizi ile protein ekspresyonlarının analizi

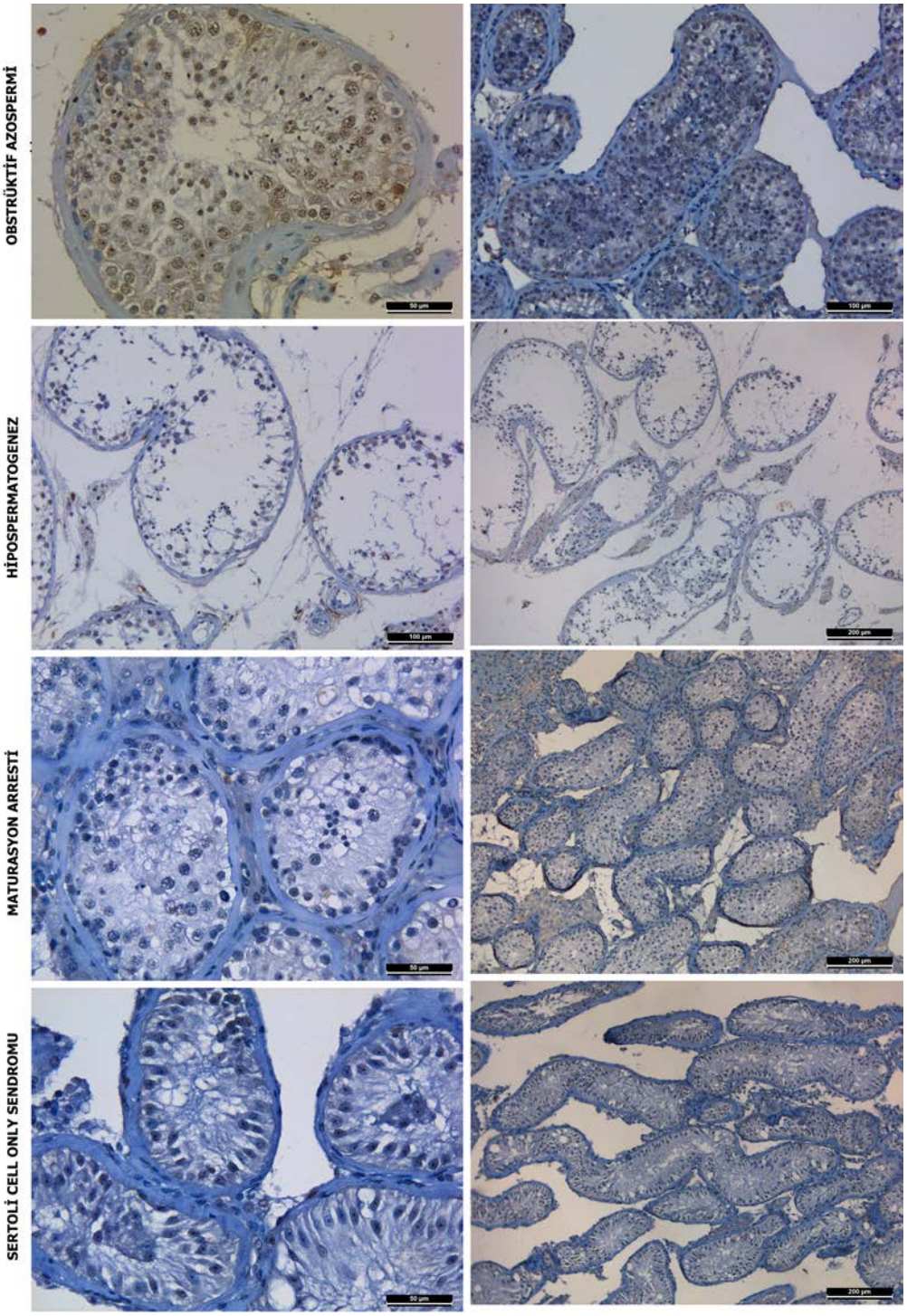
Hasta TESE örneklerinden protein izolasyonu yapıldı. Western blot analizine göre tüm gruplar kontrol olarak değerlendirilen OA grubuna göre kıyaslandı ve kat artışları/azalışları tespit edildi. HP, MA ve SCO gruplarında OA'ya göre CD133 protein ekspresyonları sırasıyla 0,54±0,12 kat, 0,24±0,04 kat ve 0,08±0,01 kat azalış gösterdiği tespit edilmiştir (**Şekil 3.4).**



Şekil 3.4. CD133 ve GAPDH protein ifadelerinin western blot analizi ***OA:*** *Obstrüktif Azoospermi* ***HP:*** *Hipospermatogenez* ***MA:*** *Maturasyon Arresti* ***SCO:*** *Sertoli Cell Only Sendromu*

3.4. İmmunohistokimyasal Analiz

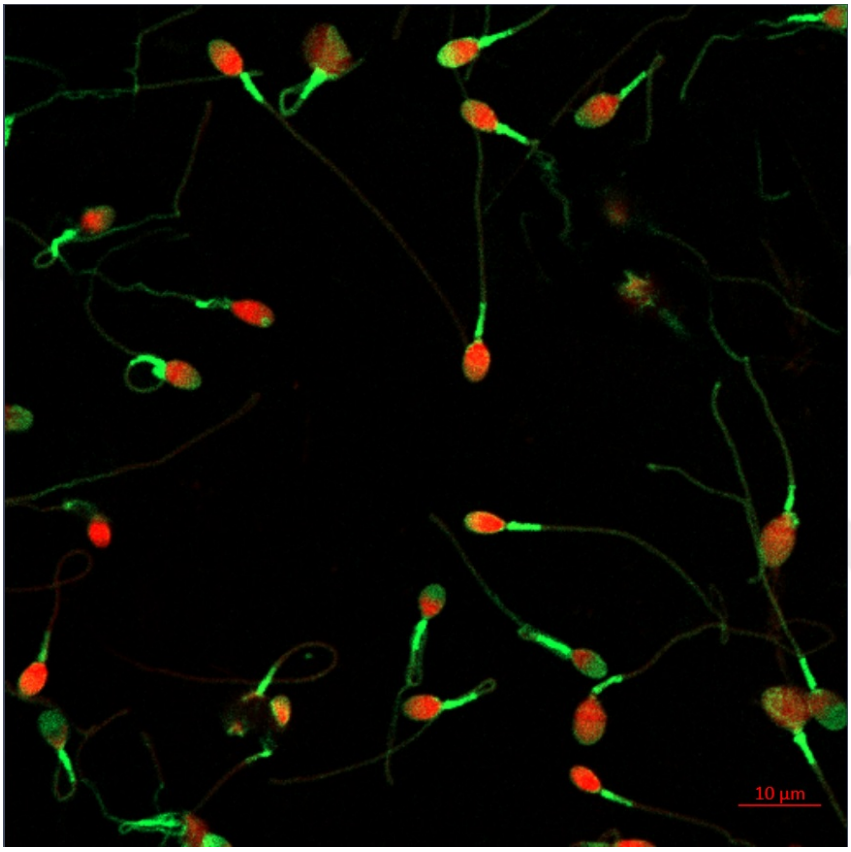
İmmunohistokimyasal olarak TESE doku boyaması yapıldı. OA, HP, MA ve SCO grubuna ait hastaların seminifer tübül kesitlerinde CD133 boyaması gerçekleştirildi. OA grubunda germ hücrelerinde geniş bir yayılım ile tutulum gösterdiği tespit edildi. Hipospermatogenez grubunda OA grubuna göre nispeten daha az bir hafif tutulum gösterdiği tespit edildi. MA grubunda çok az tutulum gözlemlenirken, SCO grubunda CD133 tutulumu tespit edilmemiştir. OA grubunda kısmen Sertoli hücrelerinde de boyama gözlemlenirken, SCO ve MA grubunun Sertoli hücrelerinde CD133 boyaması tespit edilmemiştir (**Şekil 3.5).**



Şekil.3.5. CD133'ün İmminohistokimyasal analizi. OA grubunda orta düzeyde geniş yayılımlı tutulum, HP grubunda çok hafif tutulum, MA ve SCO grubunda tutulum görünmemektedir.

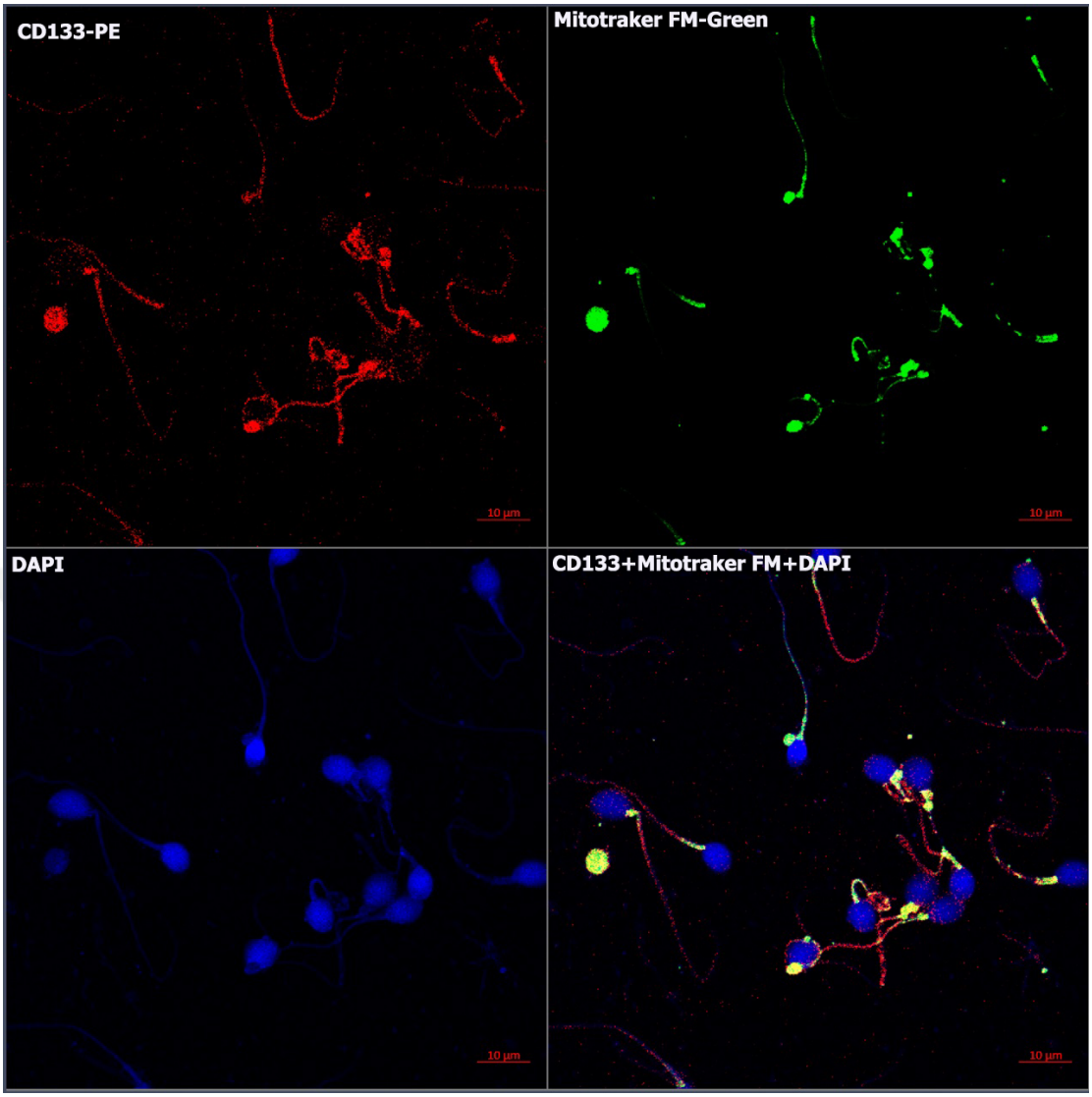
3.5. İmmunfloresan Boyama

Sağlıklı sperm hücresindeki CD133 proteininin varlığı ve lokalizasyonu lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntü altına alınmıştır. Sağlıklı spermde hem DAPI hem de Mitotraker FM boyaması da yapıldı (Şekil 3.6).



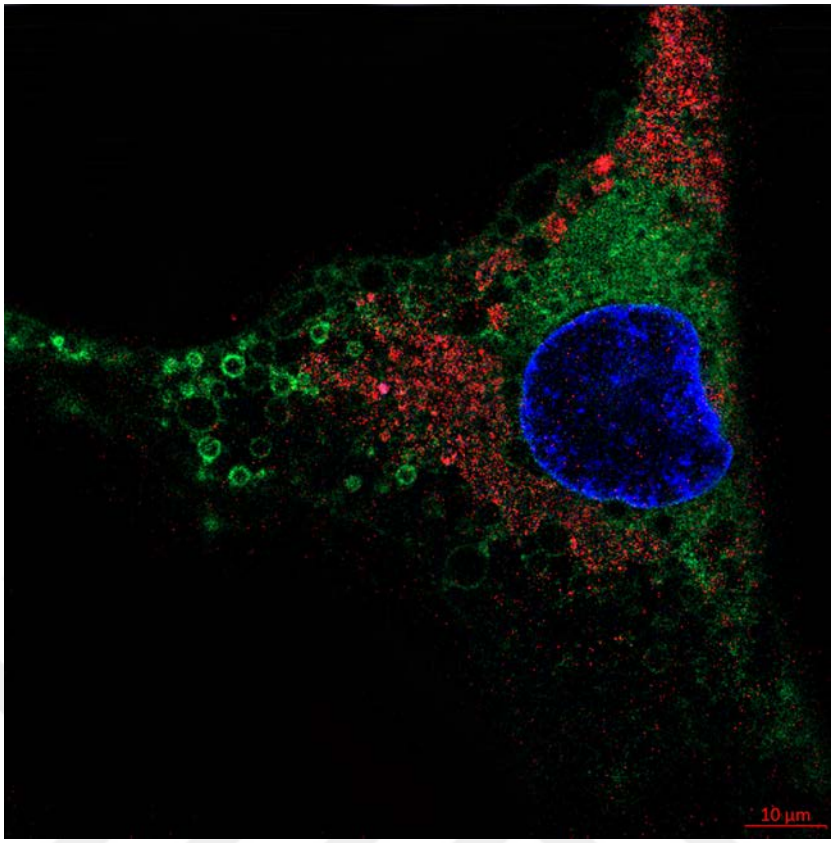
Şekil 3.6. Sağlıklı spermde nükleus (Kırmızı) ve mitotreaker (Yeşil) boyaması.

CD133 proteinleri yoğun olarak sağlıklı spermin kuyruk kısmında ve kısmen sperm baş kısmında var olduğu gözlemlendi (**Şekil 3.7).**



Şekil 3.7. Sağlıklı sperm hücrelerinde CD133 Lazer taramalı konfokal mikroskop immunfloresan görütüsü. **CD133-PE**: Kırmızı, Mitotreaker **FM:** Yeşil, **DAPI:** Mavi

Ticari olarak satın alınan sağlıklı Sertoli hücrelerinin kültürü gerçekleştirildi. Sertoli hücrelerinin yapılan immunfloresan görüntülemesinde DAPI, mitotraker FM ve CD133 boyaması gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde yoğun bir şekilde CD133 ifade edildiği tespit edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Sağlıklı ticari Sertoli hücrelerinde yapılan lazer taramalı konfokal mikroskop görüntü analizi. ***CD133-PE: Kırmızı Mitotraker FM:*** *Yeşil,* ***DAPI:*** *Mavi*

4. TARTIŞMA

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücrelerin spermatozoaya dönüşümlerini kapsayan ve memeli canlıların çoğunda, erişkin ömürleri boyunca devam etmekte olan kompleks ve karmaşık bir süreçtir. Spermatogenez, spermatogonyumların kendi kendini yenilemesi (self-renewal), proliferasyonu ve farklılaşması (diferansiyasyon) esasına göre devam etmektedir.

Spermatogenez süreci boyunca germ hücreleri, yavaş yavaş bazal membrandan lümene doğru olgun spermatozoa haline gelerek, serbest bırakılmak üzere hareket etmekte ve olgunlaşma safhasını tamamlayarak epididime geçmektedirler. Birçok gen/protein bireysel olarak spermatogonyal hücre tiplerindeki özelleşmiş ekspresyon profilleri ile tanımlanmıştır. Ancak, spermatogenez ile ilgili moleküler mekanizmalar hala tam olarak bilinmemektedir. Spermatogenez aşamasında etkin hücresel mekanizmalar incelendiğinde spermatogonyal kök hücreler çok önemli bir role sahiptir. Bu bağlamda son yıllarda yapılan çalışmalarda spermatogonyal kök hücrelerin tanımlanması ve spermatogenez evrelerine etkisi bulunan belirteçlerin araştırılması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, insan spermatogonyal kök hücreleri (SKH) ve bunların fenotipi üzerine yapılan çalışmalar, normal insan testisinin endikasyonsuz incelenmesinin etik olarak sorunlu olması nedeniyle sınırlı sayıdadır.

Spermatogonya ve progenitörleri için ifade edilen birçok belirtecin ifadesinin kemirgenlerde ve insanlarda benzer olduğu bildirilmiştir. Bu belirteçler çalışmalarda, spermatogonyal kök hücrelerin izolasyonu ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, insanlarda α6-integrin, THY-1, GFRα1 gibi yüzey belirteçleri, manyetik olarak aktive edilmiş hücre ayrımı (MACS) ile spermatogonyaları seçmek için kullanılmıştır (Dym ve ark., 2009). He ve ark.(2010) MACS ile insan spermatogonyalarının hem A_{dark} hem de A_{pale} alt popülasyonlarının saf bir şekilde izole edilmesi ve saflaştırılması için GPR125'i bir belirteç olarak kullanmışlardır (He ve ark., 2010). İnsan SKH'leri olduğu tanımlanmış GPR125 pozitif spermatogonyaların *in vitro* koşullar altında proliferatif özellik gösterdiği

bildirilmiştir. İnsan SKH'leri kemirgen SKH'lerine benzer şekilde, ITGA6, THY1 ve GFRα1'i birlikte ifade etmektedirler. Bu nedenle, bazı spermatogonyal belirteçlerin kemirgenler ve insanlar arasında korunduğu öne sürülmektedir.

Son çalışmalarda SKH tanımlanması ve spermatogenezdeki rollerinin araştırılması, SKH'lerin sağkalım, kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma çalışmaları için önemli bir araç olduğu varsayılmaktadır. Bu bağlamda bu tez çalışmasında 10 adet spermatogonyal kök hücre belirteci olarak seçilen aday genin spermatogenezdeki rolleri araştırılmıştır. Özellikle histopatolojik olarak gruplandırılmış olan, Hipospermatogenez, Maturasyon arresti ve Sertoli Cell only sendromlu hastalarda spermatogonyal kök hücrelerin ifadelerindeki farklılıklar ve spermatogenez gelişim aşamalarında kök hücrelerin kendilerini yenilemesi, proliferasyon ve diferansiyasyonda aldıkları roller araştırılmıştır.

Spermatogenezde etkin hücresel biyobelirteçler olarak; CD90, CD117, CD29, CD133, ID1, CD24, ITGA6, ITGB1, DNM2, LİN28A ve POU5F1 genleri çalışıldı.

Tüm çalışma grupları birlikte ele alındığında hipospermatogenez (HP) grubunda Obstrüktif Azoospermi (OA) grubuna kıyasla anlamlı olarak artan/azalan gen ifadelerinden; CD117 ve ID1 genleri sırasıyla 2,42 ve 2,26 kat artış gösterdiği ($p<0,05$) saptandı. CD29, ITGA6 ifadelerinin ise sırasıyla 0,08 kat ($p<0,05$) ve 0,65 kat azalış gösterdiği tespit edildi. CD90, CD133, DNM2, LİN28A, CD24 ve POU5F1 gen ifadelerinin, OA grubuna benzer bir profil çizdiği HP grubu için anlamlı bir değişiklik göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$).

Maturasyon arresti (MA) grubunda CD90, CD133, CD24, ITGA6, DNM2, LİN28A ve POU5F1 gen ifadelerinde sırasıyla 0,40, 0,04, 0,54, 0,22, 0,28, 0,22 ve 0,16 kat azalış göstererek istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gerçekleştirdiği tespit edilmiş iken ($p<0,05$), CD117, CD29 ve ID1 genlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi ($p>0,05$).

Sertoli Cell Only (SCO) grubunda CD90, CD117, CD29, ID1, LİN28A ve POU5F1 gen ifadelerinin sırasıyla 4,73, 6,23, 2,10, 2,86, 8,71 ve 3,56 kat artışı gösterdiği ve bu değişikliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,05$). CD24, ITGA6,

DNM2 gen ifadelerinde herhangi bir istatistiksel anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi ($p>0,05$).

CD90 (THY-1)

Yapmış olduğumuz çalışmada CD90 gen ifadeleri HP grubunda 1,20±0,21 ($p>0,05$) kat, SCO grubunda 4,73±1,03 ($p<0,001$) kat artarken, MA grubunda ise 0,40±0,05 ($p<0,001$) kat azalış gösterdiği tespit edildi

CD90 (THY-1), hücre yüzey membran glikoproteinlerinlerindendir. İlk olarak farelerde beyin ve timüs dokularında tanımlanmıştır (Reif ve Allen, 1964). Thy-1 T hücreleri yanı sıra, insanda fibroblastlarda, nöronlarda, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde, endotel hücrelerinde ifade edilmektedir. Thy-1 yaygın immünolojik olmayan fonksiyonlara da sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle nörit büyüme inhibisyonu, apoptotik sinyal iletimi, hücre adezyonu ve migrasyonu, tümör süpresyonu, fibroblast proliferasyonu ve migrasyonunda görevleri olduğu bildirilmiştir. Bu görev ve işlevler birlikte ele alındığında, Thy-1'in hücre-hücre etkileşiminin önemli bir regülatörü olduğu ve hücre-matriks etkileşimleri için kilit role sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda astrositler üzerinde Thy-1 ‘in bağlandığı integrin ligandları tespit edilmiştir (Dreyer ve ark., 1995). İntegrinler astrositler üzerindeki Thy-1 ile bağlandığında hücre içerisinde bir takım bağlantıları aktive etmektedir. Fokal adezyon kinazı (fokal adhezyon kinazı F-aktin (FAK), P130Cas, RhoA aktivasyonu ve paxillin, vinculin ifadelerindeki artış ile hücre adezyonu ve migrasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Leyton ve ark., 2001, Avalos ve ark., 2004). Yapılan bir çalışmada malign fare T lenfoma CS-21 hücreleri anti-Thy-1 antikoru ile muamele edildiğinde hücre içi serbest kalsiyum seviyelerinde artış meydana gelerek, apoptozisin gerçekleştiği gösterilmiştir (Fujita ve ark., 1996). Başka bir çalışmada 2 farklı Thy-1 antikorunun timositlerde apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Fujita ve ark., 1997). Thy-1’ in hücre ölümünü indüklemesi herzaman apoptoz yoluyla gerçekleşmemektedir, nekrotik hücre ölümüne de neden olduğu bildirilmiştir (Mosley ve ark., 2000).

Yaptığımız çalışma sonuçlarından da görüleceği üzere MA grubunda CD90 ifadelerinin anlamlı olarak 0,40 kat ($p<0,05$) azaldığı tespit edildi. Bu durum olgunlaşma safhasında yeterli sıkı bağlantıları sağlayamayan germ hücrelerinin ileri diferansiyasyonunu gerçekleştiremeyerek, olgunlaşma aşamasında blokaja uğradığını düşündürmektedir. Sertoli cell only sendromu grubunda bu gen ifadesindeki 4,73 kat artışı, genin ifadesinin Sertoli hücreleri kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Sonuçlarımız, sıkı bağlantı dinamizminde çok önemli rolü bulunan CD90 geninin, Sertoli hücrelerinin yoğun olduğu SCO olgularında seminifer tübüllerde ifade edildiğini, ortamda germ hücresinin yokluğu nedeni ile herhangi bir negatif feedback mekanizmasının da devreye girememesiyle sürekli yüksek ifade edildiğini düşündürmektedir.

CD90'nın, insan spermatogonyasında (He ve ark., 2010) lokalize olduğu ve spermatogonyal kök hücrelerinin izolasyonunda kullanılan bir belirteç olduğu bilinmektedir (Conrad ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada erkek fetus gelişimi sırasında, THY1 ve KIT (C-Kit) belirteçlerinin gonositler için geçici olduğunu bildirmişlerdir. KIT ekspresyonu sadece gonositlerde tespit edilmesine rağmen, THY1 ekspresyonu gonositlere ek olarak fetal testislerin somatik bileşeninde de tespit edilmiştir. Gebeliğin üçüncü trimesterinde THY1 ifadesi, sadece postnatal olarak somatik hücrelerde saptanmaya devam edilen testislerin somatik hücrelerinde de ifade edilmektedir (Altman ve ark., 2014).
Bu veriler çalışmamızı doğrular nitelikte olup, SCO grubunda THY-1 gen ifadesinin artmasının nedenleri arasında somatik hücrelerdeki gen ekspresyonlarından kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

Literatürde yapılan çalışmalarda CD90 gen ifadesinin apoptozis ile olan ilişkisi göz önüne alındığında SCO grubunda germ hücrelerinin apoptoza indüklenmesiyle germ hücre kayıplarına uğramış olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.
Thy-1 hücre-hücre ve hücre matriks interaksiyonu ve hücre migrasyonunu da içeren birçok biyolojik etkiye sahip bir GPI ankoraj proteinidir, Thy-1'in iyi tanımlanmış etkilerinden biri hücre ölümünün regulasyonudur (Rege ve Hagood, 2006). Thy-1 ifadeleri fibroblastların diferansiyasyonunda, migrasyonunda proliferasyonunda ve

morfolojisinin gelişiminde etkilidir. Thy-1 ayrıca, over kanserinde tümör süpressör olarak fonksiyon göstermesine rağmen, melonomada mestastaz ve migrasyondan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Rege ve Hagood, 2006). Böylece, Thy-1 ifadesi gelişimde, doku hasar yanıtlarında ve onkogenezde önemli role sahip olduğu söylenebilir. Yapılan başka bir çalışmada CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve CD166'nın multipotent mezenkimal hücreler için karakteristik belirteçler olduğu bildirilmiştir (Chui ve ark., 2011, Dominici ve ark., 2006, Liu ve ark., 2008a). GATA4 (Khan ve ark., 2011) ve Sox9 (Chang ve ark., 2008)'un bazı mezenkimal kök hücre popülasyonları tarafından ifade edildiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, CD90'nın ayrıca insan Sertoli hücreleri tarafından da ifade edildiği ve bu nedenle, spermatogonyal kök hücrelerin saf bir popülasyonu için seçici olamayacağını belirtmişlerdir (Chui ve ark., 2011). Elde ettiğimiz veriler CD90 gen ifadesinin spermatogonyal kök hücrelere spesifik bir belirteç olmadığını göstermektedir.

CD117 (c-Kit)

Yapmış olduğumuz çalışmada CD117 gen ifadelerinde gruplara göre değişken ekspresyonlar tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı birşekilde HP ve SCO grubunda sırasıyla 2,42 kat ve 6,23 kat artışı gözlemlendi ($p<0,05$). MA grubunda ise CD117 geninin 1,50 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

CD117, spermatogonyal kök hücrelerin diferasiyasyonunda rol aldığı için gruplardaki artış, literatürle uyumludur. Yapılan çalışmalar, ilginç bir şekilde, hem pituiter hem de gonadal hormonların SCF/c-KIT'in ekspresyon düzeylerini düzenlediğini ortaya koymaktadır (Correia ve ark., 2014, Diallo ve ark., 2006, Majumdar ve ark., 2012).

CD117, transmembran bir tirozin kinaz reseptörü olarak görev yapmaktadır. CD117 özellikle trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve stem cell faktör (SCF) ile sıkı

ilişki içerisindedir (Philo ve ark., 1996, Yarden ve ark., 1987). Bazı hücrelerde CD117'lerin intrasitoplazmik sinyal iletiminin düzenlenmesinde önemli rolleri bulunmaktadır. SCF, CD117'nin esas ligandı olarak bilinmektedir. Bu liganda bağlanması ile CD117'nin fosforillenmesi gerçekleşir ve aktivasyonu sağlanmış olur. Reseptörün aktivasyonu hücre içerisinde bir dizi fosforilasyon zincirini harekete geçirir. Farklı hücre tiplerinde değişik transkripsiyon faktörlerinin devreye girmesiyle apoptozis, hücre diferansiyasyonu, proliferasyon ve hücre adezyonunun düzenlenmesi sağlanır (Yuzawa ve ark., 2007, Mauduit ve ark., 1999, Ronnstrand, 2004).

CD117 daha çok hematopoetik kök hücreler, mast hücreleri, derinin bazal hücreleri, memenin epitelyal hücreleri, melanositler, spermatogonyal kök hücreler ve intestinal trakttaki Kajal hücrelerinde eksprese edilir (Arber ve ark., 1998, Kruger ve ark., 2005, Sun ve ark., 2008). c-Kit ifadesinde gerçekleşecek anormal gen ifadeleri; eritropoez, cilt pigmentasyonu, fertilite ve gastrointestinal motilite gibi CD117 bağımlı fonksiyonların bozulmasına yol açar.

Öte yandan gelişmekte olan germ hücreleri, germ hücresi popülasyonunun sağlam bir belirteci olarak gösterilen c-KIT reseptörünü (Unni ve ark., 2009) spesifik olarak ifade etmektedir (Gaskell ve ark., 2004, Sá ve ark., 2013). Bu nedenle, c-Kit'i ifade eden germ hücreleri, plazma zarında SCF'yi ifade eden somatik Sertoli hücreleri tarafından etkilenir (Correia ve ark., 2014, Unni ve ark., 2009). Yaptığımız çalışmada, SCO grubundaki c-KİT ifadesindeki artışın somatik hücrelerin özellikle Sertoli hücrelerinden kaynaklanabileceğini ve c-KİT ifadelerinin ekspresyonlarını etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Germ hücreleri ile Sertoli hücre bağlantılarına aracılık eden SCF/c-KIT kompleksi, germ hücrelerinin hayatta kalmasını belirleyen güçlü bir mekanizma olarak gösterilmiştir (Bokemeyer ve ark., 1996, Yan ve ark., 2000b, Yan ve ark., 2000a). CD117 mutasyonuna bağlı patolojik aktivasyonu ise CD117 pozitif hücrelerin neoplazilerine yol açabilmektedir.

c-KIT'in SCF ile olan interaksiyonu reseptörün dimerizasyonuna neden olur, sonrasında tirozin kinaz aktivasyonuna ve hücre içi sinyal iletiminin başlamasına yol açar (Blume-Jensen ve ark., 1991).

Yapılan çalışmalarda, SCF/c-KIT sisteminin, çeşitli biyolojik sistemlerin düzenlenmesi yoluyla melanogenez, hematopoez ve gametogenezde (Nishikawa ve ark., 1991, Sato ve ark., 2012) hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon ve apoptozis gibi çok önemli fonksiyonlarda rol oynadığı gösterilmiştir (Farini ve ark., 2007, Ronnstrand, 2004). Dahası, SCF ve c- KIT'in anormal ekspresyon seviyeleri üreme bozuklukları ve infertilite ile ilişkilendirilmiştir (Blume-Jensen ve ark., 2000, Ciraolo ve ark., 2010). İnsan fertilitesi, germ hücrelerinin üretimini yöneten karmaşık hormonal regülasyonu da dahil olmak üzere çeşitli psikolojik, fiziksel ve biyokimyasal faktörlere bağlıdır. Spermatogenez ve oogenez, sırasıyla erkek ve dişi gametlerde meydana gelen hücresel süreçler, bir takım hormonlar ve parakrin faktörler tarafından koordine edilmektedir (Figueira ve ark., 2014).

SCF ile c-KIT'in aktivasyonu, germ hücrelerini apoptozdan koruyan önemli bir olaydır (Yan ve ark., 2000b) ve spermatogenezin başlangıcı ve ilerlemesi için de gereklidir (Guerif ve ark., 2002, Sato ve ark., 2012). c-KIT reseptörü, seminifer tübüller arasındaki interstisyumda bulunan ve testesteron sekresyonundan sorumlu diğer bir somatik hücre tipi olan Leydig hücrelerinde de ifade edilmektedir (Muciaccia ve ark., 2010, Unni ve ark., 2009). Buna ek olarak, SCF / c-Kit'in Leydig hücrelerinin steroidojenik aktivitesini stimüle ettiği ve testosteron üretimini arttırdığı öne sürülmüştür (Rothschild ve ark., 2003).

Ergenlik döneminde ve üreme yıllarında GnRH, gonadotropik hormonları, follikül uyarıcı hormonu (FSH) ve lüteinizan hormonu (LH) salgılamak için anterior hipofizi uyarır. FSH, spermatogenez ve foliküler gelişimin başlangıcı için önemli hormon olarak kabul edilir (Richards ve ark., 2002). Testisde, FSH'ın etkileri Sertoli hücrelerinde bulunan FSH reseptörleri vasıtasıyla yanıta dönüştürülür ve SCF/c-Kit ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirir (Rossi ve ark., 2000, Yan ve ark., 1999). Transkripsiyon inhibitörü aktinomisin ve translasyon inhibitörü sikloheksimid kullanılan çalışmalarda, SCF ekspresyonunun *de novo* protein sentezinin FSH

regulasyonunda, bağımsız olarak transkripsiyonel düzeyde gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Yan ve ark., 1999).

SCF ekspresyonunu uyaran FSH hormonunun etkisi Sertoli hücrelerinin olgunlaşma evresine bağlıdır. Ayrıca, artmış SCF ekspresyonunun spermatogonyumların farklılaşmasına ve olgunlaşmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Feng ve ark., 2000). Kemirgenlerin yenidoğan Sertoli hücrelerinde ifade edilemeyen, prepubertal Sertoli hücrelerinde ifade edilen SCF'nin mRNA ekspresyonunu arttırarak FSH'a pozitif yanıt verdiği gösterilmiştir (Bhattacharya ve ark., 2012, Rossi ve ark., 2000). Maymunlarda yapılan bir çalışmada, Sertoli hücrelerinde SCF ekspresyonunu indükleyen FSH uygulamasının, pubertal testislerin yenidoğan testislerle karşılaştırıldığında, pubertal testislerde 5-10 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Majumdar ve ark., 2012). FSH seviyelerini arttıran metoksi-asetik asit ile *yapılan in vivo* uygulamada SCF'nin mRNA ekspresyonu da arttırdığı gösterilmiştir (Plotton ve ark., 2006). Sertoli hücreleriyle ko-kültürü yapılan tavuk germ hücrelerinin FSH uygulaması sonrası, c-KIT ifadelerinin upregüle olduğu tespit edilmiş ve eşzamanlı olarak germ hücrelerinin proliferasyonunu başlattığı görülmüştür (Mi ve ark., 2004).

Yan ve ark. (1999) spermatogenez sırasında SCF'nin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici faktörleri araştırmak için önce östrojenlerin SCF/c-KIT sisteminin testiküler ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Araştırmacılar E2'nin 10^{-8} M doz kullanılması, *in vitro* kültürü yapılan rat seminifer tübüllerinde SCF ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığını göstermişlerdir (Yan ve ark., 1999). Son zamanlarda, benzer bir deneysel yaklaşım kullanılarak, E2'nin SCF' ekspresyonunu arttırırken (Correia ve ark., 2014), 10^{-7} M doz E2'nin c-KIT ekspresyonunda bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Dahası, SCF/c-KIT sisteminin değişken ekspresyonu ile apoptozun artması ve germ hücrelerinin proliferasyonunun azalması ile sonuçlandığını göstermişlerdir (Correia ve ark., 2014). Testis fizyolojisini c-KIT ekspresyonunun regülasyonu yoluyla kontrol eden östrojenler erkek infertilitesinde önemli bir yere sahiptir. Dikkat çekici olarak, subfertil ve infertil erkeklerin testisinde (Feng ve ark., 2000, Plotton ve ark., 2006, Bialas ve ark., 2010) SCF ve c-KIT'in düzensiz ifade edildiği bildirilmiştir

(Sandlow ve ark., 1996). c-KIT, Leydig hücrelerinde de ifade edilmektedir. Spermatogenez bozukluğu olan testislerde c-KIT düzeylerinde anormal ifadeler, germ hücre kayıplarına neden olabilmektedir.

c-Kit reseptörü ile ilgili, germ hücrelerinin kaybına karşı koruyucu bir mekanizma olarak spermatogenezis bozulma derecesine göre Sertoli hücrelerinde c-Kit reseptör gen ifadesinde bir artış söz konusu olabilmektedir (Sandlow ve ark., 1996, Feng ve ark., 2000). Elde ettiğimiz sonuçlar, bozulmuş spermatogeneze sahip SCO grubunda c-Kit gen ifadelerindeki kat artışının, böyle bir koruyucu mekanizmanın varlığı nedeniyle gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

ITGB1-ITGA6-OCT4

Bu çalışmada ITGA6 ve ITGB1 gen ifadelerinin ortak bir şekilde ifadeleri HP grubunda sırasıyla 0,65 ($p<0,05$) ve 0,08 kat azaldığı ($p<0,05$), MA grubunda ise gen ifadelerinin sırasıyla 0,22 ($p<0,05$) ve 0,85 kat azaldığı tespit edildi. SCO grubunda da gen ifadeleri sırasıyla 1,67 ve 2,10 kat bir artış ($p<0,05$) söz konusudur.

İntegrinler kalsiyum bağımlı hücre-hücre ve hücre-matriks interaksiyonunu sağlayan yüzey membran reseptörleri olarak görev yapmaktadırlar. Bir başka deyişle, ekstraselüler matriks ile intraselüler ortam arasında integrasyonu sağlayan hücre yüzey glikoproteinleridir (Takada ve ark., 2007). İntegrinler, hücre dışı matriks ligandlarına, hücre yüzeyi ligandlarına ve solubl ligandlara bağlanabilen, kalsiyum bağımlı hücre adezyon reseptörlerinin süper ailesidir. İntegrinlerin alfa (α) ve beta (ß) alt üniteleri bulunmaktadır (Shimizu ve ark., 1999). İntegrinlerin aktif forma dönüşebilmeleri için hem alfa hemde beta alt ünitelerinin varlığı gereklidir. (Hynes, 1992).

ß1 integrinler daha çok lökosit hücrelerinin endotel hücreleri ile ilgili interaksiyonunda ve ekstraselüler matrikse bağlanmasında rol almaktadır. İntegrinler, insan metabolizmasında çok geniş yelpazede ifade edilmektedir. İntegrinler aktif hale geçtiğinde, hücre sitoplazmasına bir sinyal iletimi sağlanır ve sonrasında hücre

yüzeyindeki integrin kendi ligandına affinitesini arttırır ve böylece hücre içerisinden hücre dışına sinyal iletimi gerçekleşir. Adezyon molekülleri arasında bir tek integrinlerde görülen bu özellik sayesinde hücrelerin ekstraselüler matriks ile etkileşiminde önemli görevleri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda integrinlerin hücresel sinyal iletiminde, ligandın integrine bağlanması ile bu defa hücre dışından hücre içine hücresel aktiviteyi yönlendirebilecek apoptozis, proliferasyon, diferansiyasyon gibi birçok işlevin gerçekleşmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Frenette ve Wagner, 1996).

Spermatogonya ve Sertoli hücreleri bazal laminada yerleşik durumdadır. Sertoli hücreleri germ hücrelerini destekleyici ve besleyici hücrelerdir. Spermatogonyal kök hücrelerle, iç içe girmiş ve germ hücreleri ile sıkı bağlantıları bulunmaktadır.
Yapılan bir çalışmada (Riboldi ve ark., 2012) azoospermik hastaların TESE dokularındaki CD49f + hücrelerin ayırımı yapılmış, OA'da % 5,45, NOA'da % 2,36 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı TESE örneklerinden SCF, rGDNF, WT1, GATA-4 ve vimentin için pozitif Sertoli hücreleri de izole edilerek birlikte ko-kültürü yapılmıştır. Sertoli hücreleriyle birlikte NOA hastalarının TESE örneklerinden SKH'lerin *in vitro* ko-kültürü yapılmasıyla bir süre sonra hücrelerin mayoz bölünmeye girdiğini ve haploid hücre oluşumuyla sonuçlandığını tespit etmişlerdir. Seminifer tübüllerin bazal kompartmanında spermatogonyalar yer alırken, adluminal bölgede, mayoz bölünme ve spermiyogenez meydana gelmektedir. İntegrinler fizyolojik süreçlerde hücrelerin ekstraselüler matrikse veya çevreleyen hücrelere bağlanmasına aracılık ederler (Sá ve ark., 2013). İmmünositokimya ve immünhistokimya çalışmalarından elde edilen verilere göre, ITGA6 (Conrad ve ark., 2008, He ve ark., 2010, Izadyar ve ark., 2011) ve integrin beta 1 (ITGB1) (Virtanen ve ark., 1997) insan seminifer epitelyumda spermatogonyumlarda ifade edildiği bildirilmiştir. Farelerde de ITGB1 ve ITGA6, spermatogonyaların yüzey belirteci olarak tanımlanmıştır (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004).
In vitro çalışmalar için spermatogonyaların zenginleştirilmesinde MACS ve FACS ile bu belirteçler kullanılarak seçilmesi gerçekleştirilmiştir (Shinohara ve ark., 2000, Kubota ve ark., 2004, Phillips ve ark., 2010).

SKH'lerin bazal laminanın lamininine yapışması, SKH yüzeyinde bulunan glikoprotein reseptörleri (integrinler) ile gerçekleşir. İki reseptörün laminine bağlandığı bilinmektedir: integrinα6 (CD49f) ve integrinβ1 (CD29), bu reseptörlerin hücrelerin çoğalması, farklılaşması, hayatta kalması ve migrasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (Aponte ve ark., 2005, Hermo ve ark., 2010, Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004, Phillips ve ark., 2010).

Literatür verileri göz önünde bulundurulduğunda seminifer tübülde spermatogenezde sıkı bağlantı dinamizmi ve hücre içi sinyal yolaklarından Src kinazlar, Erk ve JNK yolağını aktive ederek hücrenin maturasyonunda, migrasyonunda ve adezyonunda görevli olan ITGB1 ve ITGA6 genlerinin ifadelerindeki azalma spermatogenezdeki defekti göstermektedir. SCO grubundaki artışlar ise yine bu CD29/CD49f integrin kompleksinin hücre içerisinde NF-KB ve Kaspaz 3 bağımlı apoptozis yolağını aktif etmesiyle anormal artışlar ile muhtemelen germ hücre ölümlerine neden olarak germ hücre aplazisi ile sonuçlandığı göstermektedir.

Ayrıca, yapmış olduğumuz çalışmada POU5F1 gen ifadeleri HP ve MA gruplarında sırasıyla 0,83 kat ve 0,16 kat ($p<0,05$) azaldığını tespit ettik. POU5F1 gen ifadelerinin varlığı hücrenin "self renewal" veya diferansiyasyon basamakları için kök hücreler hakkında bilgi vermektedir. Literatür bilgileri ışığında bu genin ekspresyonundaki azalış, diferansiyasyonun varlığı olarak belirtilir. Hipospermatogenez ve maturasyon arresti olgularında bu genin ifadesindeki azalış spermatogonyal kök hücrelerin mayoza girmiş ve farklılaşma yönünde bir değişim göstermiş olduğu şeklinde yorumlanmaktadır ki bizim sonuçlarımız da bu bilgi ile uyumlu olacak şekilde hipospermatogenez ve maturasyon arresti olgularında genin düşük ifade edildiğini doğruladı. SCO grubunda ise bu gen ifadesinin 3,56 kat artış ($p<0,05$) gösterdiği tespit edildi.

Oktamer bağlama transkripsiyon faktörü 4 (OCT4), insanlarda POU5F1 geni tarafından kodlanmaktadır (Takeda ve ark., 1992). Memelilerde, OCT4, erken gelişim sırasında hücrelerin farklılaşmamış evresinin korunmasında önemli bir moleküldür ve germ hücresi farklılaşmasının önemli bir regülatörü olarak kabul

edilmektedir (Pesce ve ark., 1999). İnsanlarda OCT4 ifadesi, blastosistlerin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücrelerde (Hansis ve ark., 2000, Reubinoff ve ark., 2000), fetal dokudan izole edilen embriyonik germ hücrelerinde (Rajpert-De Meyts ve ark., 2004) bulunmaktaır. Ayrıca insan yetişkin testisindeki spermatogonyal kök hücre dizileri gibi (Kossack ve ark., 2009) erişkin kök hücre tiplerinde de bulunabilmektedir.

OCT4 bu nedenle insan erkek germ hücrelerindeki spermatogonyal progenitör hücrelerinin olası bir belirteci (Conrad ve ark., 2008, Izadyar ve ark., 2011, Liu ve ark., 2008a) olarak görülmektedir. Embriyonel gelişimde blastosit evresinde POU5F1 gen ekspresyonunun varlığı bilinmektedir, bu genin ifadesi diferansiyasyonu takiben giderek azalmaktadır. Embriyonel kök hücrelerin farklılaşması POU5F1 ifadelerine bakılarak tahmin edilebilmektedir, gelişim döneminde ifadeleri bu nedenle değişkenlik göstermektedir. Embriyonik kök hücrelerin gelişiminde bu transkripsiyon faktörününün ifade seviyesinin 2 önemli etkisi gözlemlenmektedir: Oct-4 ifadesindeki artış, hücrelerin primitif endoderm ve mezoderm yönünde farklılaşmasına neden olmaktadır. Düşük seviyede ifade edildiğinde ise; hücreler pluripotent özellikte kalmakta ve farklılaşma olmamaktadır.

Spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüllerin en alt tabakasında VSEL olarak adlandırılan hücre grupları yer almaktadır. Bu hücre gruplarında Oct-4 ifadelerinin varlığı bilinmektedir. Oct-4 fonksiyonel rolü gereği VSEL hücre grubu hücrelere “self renewal” özellik katar ve hücrelerin asimetrik olarak bölünmeye girmesini sağlar (Zheng ve ark., 2016).

Pluripotansi belirleyicisi, POU5F1'in ifade seviyeleri, erken embriyogenez sırasında uygun diferansiyasyonu sağlamak için sıkı bir şekilde regüle edilir. POU5F1 ayrıca farelerde spermatogonyal kök hücre / progenitör hücre popülasyonunda bulunur ve spermatogenez ilerledikçe ifadeleri downregule edilir.

Yapılan bir çalışmada SKH'lerin farklılaşması için POU5F1 downregülasyonunun gerekli olup olmadığı test edilmiştir. POU5F1’i eksprese eden transgenik farelerde

POU5F1 downregülasyonunun spermatogenezisin ilk aşaması sırasında spermatogonyal genişleme ve mayoz görülebilen farklılaşmış spermatogonya üretimi için gerekli olduğunu bulmuşlardır (Zheng ve ark., 2016).

Yapmış olduğumuz çalışmanın verileride göz önünde bulundurulduğunda, spermatogonyaların farklılaşması aşamasında POU5F1 gen ifadelerinin downregülasyonu, spermatogenezin ilerlemesi için gerekli bir adım olduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık, SCO grubundaki yükseklik spermatogenezdeki defekt hakkında bilgi verebilir.

CD133

Yapmış olduğumuz çalışmada, CD133 geninin ifadesinin hem HP grubunda hem de MA grubunda sırasıyla 0,80 kat ve 0,04 kat azalış ($p<0,05$) gösterdiğini tespit ettik. İlginç olarak SCO grubunda RT-PCR analizinde gen ifadesi 50 siklus analizde tespit edilemedi. Western blot analizinde protein düzeyinde, gen ekspresyonuna benzer bir profil göstererek HP, MA ve SCO gruplarında sırasıyla 1,83 kat, 4,11 kat ve 11,4 kat azalan protein ifadeleri tespit edildi ($p<0,05$). İmmunohistokimyasal analiz sonuçlarında da OA grubuna ait hastaların boyamalarında CD133 tutulumu gözlenirken, HP grubunda daha az tutulum göstermiştir. MA grubunda ise çok az tutulum gerçekleştiği tespit edilmiştir. SCO grubunda immunhistokimyasal bir boyanma gözlemlenmedi. Bu sonuçlar RT-PCR ve western blot analizlerinin birbiriyle uyumlu olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, ticari olarak satın alınan normal spermatogeneze sahip Sertoli hücrelerinde konfokal mikroskopta immunfloresan görüntülemesi gerçekleştirildi. Elde edilen görüntülerde sağlıklı Sertoli hücrelerinde CD133 ifadelerinin yoğun bir şekilde bulunduğu **literatürde ilk kez** bu çalışma ile tespit edildi (Şekil 3.8).

Lazer taramalı konfokal mikroskopta immunfloresan görüntülenmesinde sağlıklı spermde CD133 proteininin, spermin yoğun olarak kuyruk kısmında, kısmende baş kısmında lokalize olduğunu tespit ettik. Tüm bu sonuçlar literatür bilgileri ışığında incelendiğinde, CD133 proteinin spermatogenezde ve özellikle germ hücrelerinin maturasyonunda rol oynadığı, olgunlaşma basamağının son evresi olarak kabul

edilen kuyruk oluşumuna katkı sağlayarak erkek infertilitesinde önemli bir görevi üstlendiği şeklinde yorumlanabilir. Yapılan çalışmalarda CD133'ün fare epididiminde, streosiliaların oluşumunda görevli olduğu bildirilmiştir. Yapmış olduğumuz **bu çalışmada literatürde ilk kez** histopatolojik olarak gruplara ayrılmış infertil NOA hasta gruplarında CD133 ifadeleri çalışıldı ve ekspresyonları hem gen hem de protein düzeyinde gösterildi.

Memelilerde, prominin-1 çeşitli embriyonik ve yetişkin epitel hücrelerinde eksprese edilir (Weigmann ve ark., 1997, Corbeil ve ark., 2000) bunun yanı sıra epitel dışı hücrelerde, özellikle rod fotoreseptör hücrelerinde (Maw ve ark., 2000) de ifade edilmektedir. Prominin-1, hematopoietik ve merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan kök hücrelerin tanımlanması ve izole edilmesi için kullanışlı bir hücre yüzeyi belirteci olarak görülmektedir (Yin ve ark., 1997, Bhatia, 2001).

Fargeas ve ark.(2003) farelerde Prom-1 alternatif sitoplazmik C-ucu ile yeni prominin-1 splice varyantlarının saptanması ve erkek üreme sisteminde prom1'in hücresel biyolojik karakterizasyonunu araştırmışlardır.

Prominin, plazma-membran çıkıntılarının düzenleyicisi olarak davranır. Prominin-1'in spesifik splice varyantları, epididimal epitelyum stereosiliyasında ve gelişen spermatozoa'nın flagelyal kuyruğunda (seminifer tübüllerde bulunduğu zaman) ifade edildiği gösterilmiştir. Bu bağlamda prominin-1'in sperm morfogenezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Fargeas ve ark., 2003b).

Prominin-1'in yeni splice varyantlarını tanımlamak için (Weigmann ve ark., 1997) araştırmacılar fare böbreklerinden türetilen prominin-1 genini çalışmışlardır (Fargeas ve ark., 2003b). Fargeas ve ark. (2003) yapmış olduğu çalışmada, ratların erkek üreme sisteminde, spesifik prominin-1 varyantlarının epididimal kanal boyunca farklı bir ekspresyon profili gösterdiği biyokimyasal ve morfolojik olarak gösterilmiştir. 89 kDa prominin-1.s6 varyantının ağırlıklı olarak epididimde ve testiste sentezlendiğini ortaya çıkarırken, 92-kDa varyantı s6 varyantından daha düşük seviyelerde sadece

epididimde bulunduğunu göstermişlerdir. Dahası, epididimdeki immünblotlama ile gözlemlenen geniş prominin-1 bantları, epididimideki s6 varyantı gibi belirli bir splice varyantının birkaç farklı glikoformda var olabileceğini düşündürmektedir.

Bazı çalışmalarda prominin-1'in, protein-lipid ve protein-protein etkileşimlerinde bulunduğu, ayrıca kolesterol-bağımlı membran mikrodomaine gömüldüğünde hücre yüzeyinde ifadesinin maskelenebileceği öngörülmektedir. Prominin-1'in en önemli biyolojik özelliği, etrafındaki ekstraselüler matrikse çıkıntı yapan kıvrımlı plazma zar alt alanları ile spesifik ilişki içerisinde olmasıdır. Prominin-1'in, mikrovillüs, primer ve hareketli silia ve midbody gibi polarize epitel hücrelerinin apikal alanından çıkan çeşitli plazma membran çıkıntılarında spesifik olarak lokalize olduğu tespit edilmiştir (Weigmann ve ark., 1997, Corbeil ve ark., 2000, Karbanova ve ark., 2008, Dubreuil ve ark., 2007, Florek ve ark., 2007).

Prominin-1'in sperm akrozom bölgesinde membran lipit raftlarının zona pellicuda ile etkileşiminde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu etkileşim özellikle kolesterolün efluksu sonrasında hücre içerisinde gerçekleşen birtakım olayların başlamasıyla sağlanır.

Membran lipid raftları genel olarak hücresel süreçlerin bölümlendirilmesine hizmet eden küçük ve heterojen alanlar olarak tanımlanır (Pike, 2006). Özellikle membran proteinlerinin dağılımını, reseptörlerin aktivasyonunu ve sinyal basamaklarının başlatılmasını düzenlemektedir (Brown ve London, 1998, Simons ve Ikonen, 1997, Simons ve Toomre, 2000). Membran lipit raftları, kolestrolün esnek olmayan steroid omurgasına bağlı olarak son derece kararlı yapılardır (Martinez-Seara ve ark., 2008). Spermde, membran lipit raftları, CD59 ve SPAM1, glikosilfofatidilinositol (GPI) ankoraj varlığına bağlı raft afinitesi olan GM1 gangliosidleri, aracılığı ile tanımlanmıştır (Nixon ve ark., 2009, Sleight ve ark., 2005). Özellikle, membran lipit raftlarının sperm membranı içindeki dağılımı, hücrelerin kapasitasyon durumundan önemli ölçüde etkilenmektedir. Nitekim kapasitasyon gerçekleşmemiş spermatozada gözlemlenen lipit raftlarının üniform olarak lokalizasyonu, kapasitasyonun indüksiyonu ile sperm baş kısmında peri-akrozomal bölgesi içinde lokalizasyonunu

değiştirerek akrozom reaksiyonunun ve kapasitasyonun tamamlanmasında önemli bir rol oynar (Boerke ve ark., 2008, Nixon ve ark., 2009). Bu ilginç durum, membran lipit raftlarının spermatozoa'nın işlevsel yeterliliğinin koordine edilmesinde önem taşıdığını ortaya çıkarmaktadır (Bou Khalil ve ark., 2006). Bu bağlamda, son çalışmalarda, lipit raftlarının homolog oositlerin zona pelusidasına yüksek derecede afinite ve spesifisite ile bağlanabildiğini (Bou Khalil ve ark., 2006, Nixon ve ark., 2009, Nixon ve ark., 2011) ve bu zar parçalarının, sperm-zona pellucida etkileşimlerinde yer alan birkaç ana molekülüde içerdiği gösterilmiştir (Nixon ve ark., 2011, Nixon ve ark., 2009, Bou Khalil ve ark., 2006, Sleight ve ark., 2005).
Lipit raftlarının oluşmasıyla spermde kolesterol efluksunun yanı sıra, hücre içi HCO_3- iyonlarının konsantrasyonunun artması ve hücre içerisinde bir takım fosforilasyon olaylarının başlamasıyla sperm akrozom reaksiyonu gerçekleşir (Urner ve Sakkas, 2003).

Prominin-1 içeren membran veziküller, fare ve insan serebrospinal sıvılarında (BOS), tespit edilmiştir (Florek ve ark., 2007, Marzesco ve ark., 2005, Huttner ve ark., 2008). Bu yaygın dağılım, çeşitli epitellerde prominin-1'in genel ifadesini göstermektedir. Henüz tam olarak aydınlatılamamış olan işlevleri ne olursa olsun, bunların saptanması bazı hastalıkların prognozunun aydınlatılmasında oldukça yararlı olabilir.

Huttner ve ark. (2008), insan BOS sıvısnın prominin-1 taşıyan zar parçacıkları içerdiğini ve bunların sağlıklı erişkinler ve glioblastoma hastaları arasında düzeylerini değiştirdiklerini ve bu da kanser dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi hastalıklarını incelemek için araştırmacılara yeni perspektifler sunduğunu göstermektedir (Huttner ve ark., 2008).
Kemirgenler, primatlar ve diğer türlerde, prominin-1 yaşamın her aşamasında fizyolojik olarak ifade edilmiştir. Erken fare embriyolarında, prominin-1, trofoblast hücrelerde eksprese edilir, ancak embriyonik kök (ES) hücrelerin öncü hücreleri olan iç hücre kütlesi içinde bulunmadığı bildirilmiştir (Kania ve ark., 2005).

Epididimal kanalda, spermin taşınması, olgunlaşmasında önemli rol oynayan farklı bölgeler bulunur. Bu işlevlerin moleküler temeli tam olarak anlaşılamamış ancak kanaldaki bölgesel farklılıklar sadece hücre morfolojisindeki değişikliklerle değil aynı zamanda belirli düzenleyici mekanizmalarla belirli genlerin ifadeleri ile de ilişkilidir (Kirchhoff, 1999).

Prominin-1'in fare epididim ve testisinde subselüler lokalizasyonu ile ilgili olarak iki temel gözlem yapılmıştır. İlk olarak, prominin-1, başlıca hücrelerin apikal mikrovillileri / stereosilialar da gözlemlenmiştir. İkincisi, prominin-1, seminifer tübüllerde mevcut olduğunda spermatozoa kuyruğunda yoğunlaşmıştır. Bu veriler, plazma membran çıkıntılarının düzenleyicisi olarak prominin-1'in varsayılan fonksiyonu ile uyumludur. Prominin-1'in, epididimal stereosilia'nın oluşumunda ve / veya stabilizasyonu ile spermatozoa'nın kuyruklarında ifade edildiğini göstermektedir. Kapasitasyon mekanizmasında sperm membran polarizasyonunun sağlanmasında lipid raftlarının çok önemli yeri bulunmaktadır. Özellikle bu çalışmada CD133 proteinini sağlıklı spermin akrozom ve kuyruk kısmında tespit ettik. Bu veriler yapmış olduğumuz çalışmayı doğrular nitelikte bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla, erkek üreme sistemindeki prominin-1, sperm oluşumunda ve epididimal kanala geçiş sırasında ortaya çıkan olgunlaşmalarda ikili bir rol oynayabilir. Açıkçası, bu süreçlerdeki prominin-1'in rolünü açıklığa kavuşturmak için daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır ki bunlar erkek fertilitesi için oldukça önemlidir.

Fertilizasyon için bu kadar önemli bir basamakta rol alan membran lipit raftlarının bir düzenleyicisi olarak aday gösterilebilecek CD133'ün yapmış olduğumuz çalışmada gen ifadesinde, protein ekspresyonunda ve dokulardaki immunohistokimyasal analiz sonuçlarında spermatogenezi normal kabul edilen OA grubunda ifadesi yüksek seyrederken, NOA grubundan MA ve SCO grubunda yok denecek kadar az ifade edildiği saptandı. Sağlıklı Sertoli hücrelerinde yoğun bir şekilde bulunduğunu ve sağlıklı spermde ise yoğun olarak özellikle spermin akrozom ve kuyruk kısmında lokalize olduğunu immunfloresan analizlerle gösterdik. SKH'lerin en önemli niş kaynağının Sertoli hücreleri olduğu bilinmektedir. Bu

bağlamda yaptığımız çalışmada, CD133 ifadelerinin SCO grubunda ifadesinin gözlemlenmemesi ve sağlıklı Sertolilerde yoğun bir şekilde var oluşu spermatogenezde çok etkili ve maturasyon basamaklarında görevli olabileceğini gösteren bir bulgudur. Özelikle CD133, lipit raftlarının oluşumundaki etkileri ve hücresel arası etkileşimdeki fonksiyonu sonucu, germ hücrelerinin diferansiyasyonu ve canlılığında etkili bir kök hücre belirteci olabileceği kanaatindeyiz.

Elde ettiğimiz veriler, membran lipit raftlarının oluşumunda önemli görevleri olan CD133'ün özellikle akrozom reaksiyonunda da görev alarak, fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu nedenle sonuçlarımız CD133'ün erkek infertilitesi açısından çok önemli bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

CD24

Yapmış olduğumuz çalışmada CD24 ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MA grubunda 0,54 kat azalış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). HP ve SCO gruplarında ise anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

CD24 proteini yoğun bir şekilde glikozile protein içeren ve hücre membranında yer alan bir hücre yüzey proteinidir. CD24'ün hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ve hücre-hücre etkileşiminde rol oynadığı, adezyon molekülü olarak fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir (Kristiansen ve ark., 2004, Lim ve Oh, 2005).

Birçok hücre tipinde, CD24 mRNA ve protein düzeyinde dinamik olarak eksprese edildiği bilinmektedir. Özellikle hücre maturasyonunda, olgunlaşmasını tamamlamış hücre tiplerinde daha çok ifade edildiği, gelişmekte olan veya gelişim sürecindekilerde çok az ifade edildiği veya hiç ifade edilmediği bildirilmiştir (Tan ve ark., 2016).
Hücre hücre etkileşiminde görevleri bulunan, L1 hücre adhezyon molekülü (L1CAM), CD24'ün en iyi bilinen ligandıdır (Aigner ve ark., 1997, Kadmon ve ark., 1995, Kleene ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalarda CD24'ün hem cis hem de trans etkileşimler gerçekleştirebildiği gösterilmiştir. CD24, P-selektin molekülü ile etkileşim içerisinde olarak hücre migrasyonunda da etkilidir (Friederichs ve ark., 2000). Nöronlarda, L1CAM-CD24 etkileşimlerinin hem cis hem de trans oluştuğu gösterilmiştir ve nöral hücre adezyon molekülü (NCAM1) ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Kadmon ve ark., 1995).

Doğumdan sonra gelişen, yetişkin erkek germ hücreleri olan spermatogonyal kök hücrelerin yaşam süresi boyunca kendini yenileme, proliferasyon ve diferansiyasyon özellikleri ile erkek infertilitesinde çok önemli rolleri bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalarda spermatogonyal kök hücrelerin uygun kültür koşulları altında pluripotansi özelliği kazanabildikleri bildirilmişitir. Kültür ortamında pluripotansi belirteçlerini ifade eden hücreler, nude farelere transplante edildiklerinde teratom oluşturan multipotent germline kök hücrelerine (mGSCs) dönüşebildikleri gösterilmiştir. CD24 bu pluripotansi belirteçlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada sinir hücrelerinin prekürsörü olarak bilinen CD24 geninin ifade edildiği germ line kök hücrelerden nöronal öncü hücrelerin diferansiyasyonunun sağlandığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2015).

Elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde yapılan çalışmalarda hücre migrasyonunda ve adezyonunda rolü olduğu bildirilen CD24'ün, MA grubunda germ hücrelerin maturasyonunda var olan blokaj ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde özellikle normal hücre maturasyonunda ifadelerinin yükseldiği, gelişim veya gelişmekte olan hücrelerde ifadesinin düşük olduğu bildirilmiştir. Bu veriler çalışmamızı doğrular niteliktedir. **Literatürde ilk kez** bizim çalışmamızda erkek inferilitesinde spermatogonyal kök hücre belirteci olarak kullanılmış olup, spermatogenezdeki rolleri değerlendirildiğinde, gelişmekte olan ancak blokaja uğramış hücre grubunda bu gen ifadesinin anlamlı bir şekilde düşük olduğu tespit edildi.

Bir adezyon molekülü olarak işlev gören CD24 protein ifadesinin çeşitli tümörlerde prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pei ve ark., 2016). CD24'ün servikal kanser dokularında upregüle olduğu ve servikal kanserdeki MAPK sinyal yolunu etkileyerek

hücre canlılığında etkili olduğu gösterilmiştir (Pei ve ark., 2016). Bazı çalışmalarda CD24, P-selektin için alternatif bir ligand olarak tanımlanmıştır (Aigner ve ark., 1998) CD24'ün fonksiyonel olarak, P-selektin yoluyla tümör hücrelerinin metastazında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Lim ve Oh, 2005).

Elde ettiğimiz sonuçlar, hücre hücre etkileşiminde, hücre migrasyonunda rolü olan CD24 ifadesinin, erkek infertilitesinde, spermatogenez sürecinde germ hücrelerinin maturasyonunda önemli olabileceğini düşündürmektedir. Sonuçlarımızın daha ileri başka çalışmalarla desteklenmesi, CD24'ün erkek infertilitesindeki rolünün teyit edilmesi ve detaylandırılmasına katkı sağlayacaktır.

DNM2

Spermatogonyal kök hücre belirteçlerinden olan DNM2 gen ifadelerinin, yapmış olduğumuz çalışmada HP grubunda 1,60 kat arttığı, MA ve SCO grubunda sırasıyla 0,28 ($p<0,05$) ve 0,86 kat azaldığı tespit edildi.

Dinamin 2 (DNM2), geniş GTPaz süper ailesine aittir. Bu aile içerisinde 3 klasik dinamin ve birkaç dinamin benzeri protein yer almaktadır. Memelilerde 3 adet klasik dinamin geni vardır bunlar; Dinamin 1, Dinamin2 ve Dinamin 3'tür. Dinamin 1 yoğun olarak nöronal dokularda eksprese edilir, sinaptik veziküllerin geri dönüşümünde etkili olduğundan kritik öneme sahiptir (Ferguson ve ark., 2007, Nakata ve ark., 1991, Cook ve ark., 1994). DNM2, vücudun her yerinde eksprese edilir. Bunlar çok geniş hücresel fonksiyonlarda yer alan proteinlerdir. Üç klasik dinaminden biri olan DNM2'nin, rat karaciğeri ve beyin dokularında ifade edildiği gösterilmiştir. Bu karmaşık spermatogenez sürecine dahil olan birçok protein arasında, büyük GTPazlardan olan dinamin ailesinin spermatozoa gelişiminde, mitotik hücre diferansiyasyonunda ve spermatogonya ampflifikasyonunda önemli rolleri olduğu bilinmektedir (Cook ve ark., 1994, Ferguson ve ark., 2009, Liu ve ark., 2008b).

Dinaminler bu rolleri kritik membran fizyon ve füzyon olaylarını düzenleyerek yerine getirmektedir. Bu tür fonksiyonlarda, kısmen dinaminler, tomurcuklanan bir vezikülün boynundaki sarmal polimerlerde yoğun olarak bulunur. Dinaminler aracılığıyla, oluşan vezikülün boğumlanması gerçekleştirilir (van Dam ve Stoorvogel, 2002). Sonrasında, serbest endositosik vezikül oluşturmak için dinamindeki GTP hidroliz bağımlı konformasyonel değişiklikler tubüler membran fizyonunu gerçekleştirir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, dinaminlerin hücre bölünmesi aşamasında sitokinezin kontrolünün yanında mikrotübül instabilitesi ve fonksiyonlarının düzenlenmesi ve mikrotübül bağlayacı protein olarak görev yaptığı bildirilmiştir. Testiste dinaminlerin hem germ hücrelerinde hem de Sertoli hücrelerinde farklı şekilde lokalize olduğu gösterilmiştir. DNM1 ve DNM2 round spermatidlerin akrozom bölgelerinin gelişiminde ve pakiten spermatositlerin senkronize bir şekilde gelişiminde rol oynamaktadırlar. Buna ek olarak hem DNM2 hem de DNM3, kan-testis bariyeri ile ilişkilendirilerek, bazal membrandan adluminal kısıma geçişte endositosik spermatosit migrasyonunun gerçekleşmesinde kolaylık sağlamaktadır (Redgrove ve ark., 2016).

DNM2'nin gen ifadesindeki yokluk veya azalmanın germ hücresi gelişimine olan etkisini araştıran bir çalışmada, DNM2 “knockout” edilmiş fare testislerinde hücre döngüsü belirteçlerinin yokluğu veya azalması nedeniyle önemli bir şekilde germ hücrelerinin azaldığı açıkça görülmüştür. Buna benzer fenotip, immortalize edilmiş embriyonik kök hücrelerde DNM2 delete edildiğinde gerçekleşmiştir(Redgrove ve ark., 2016). Zhou ve ark.'nın yaptıkları çaışmada dinamin protein ailesinin, membranda yeniden modellenme ve endositoz olaylarında önemli düzenleyici rol oynadığı saptanmıştır (Zhou ve ark., 2017). Bu çalışmadaki verilerin bizim çalışmamızı doğrular nitelikte olduğu gözlemlenmektedir. Yaptığımız çalışmada da DNM2 ifadelerinin MA olan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 0,20 kat azaldığını gösterdik. DNM2 gen ifade azalışı, bize klinik olarak DNM2 ifade eksikliğinin, maturasyon arrestine neden olabileceğini düşündürmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, spermatogenez sürecinde, DNM1 ve DNM2'nin sperm akrozom oluşumu ve fonksiyonunun gerçekleşmesinde oldukça

etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu proteinlerin testiküler germ hücrelerinin gelişimindeki rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir (Redgrove ve ark., 2016).

DNM2'nin spermatogenezdeki rolünü araştıran bir çalışmada DNM2 germ hücresine özgü nakavt modeli fareler kullanılmıştır. Erken spermatogenezdeki DNM2 ablasyonunun, mayozun I. evresi boyunca germ hücresi arresti ile sonuçlandığını, ardından tüm post mayotik germ hücrelerinin kaybedildiğini ve bununla birlikte sterilitenin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Ayrıca DNM2'nin spermatogonya'da CDK1 kinaz ile fosforilasyon ve mayoz ve post-mayotik spermatogenez sürecinde, fosfataz PPP3CA ile defosforilasyon yoluyla geçici olarak regüle edilebileceğini de göstermişlerdir (Redgrove ve ark., 2016). Redgrove ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmadan anlaşılmaktadır ki, yaptığımız çalışmada olduğu gibi, tüm NOA'lı olgularda DNM2 geninin ifadelerindeki azalma spermatogenez defektlerine yol açabilmektedir. Bu veriler bizim yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarını doğrular niteliktedir.

HP grubunda istatistiksel anlamlı olmayan artışın, az sayıdaki sperm hücre differansiyasyonunu, matür hale gelen spermatozoaların lümene geçişini sağlamak ve hipospermatogenezin indüklediği spermatogonya amplifikasyonunu gerçekleştirmek üzere pozitif feedback nedeniyle olabileceği şeklinde yorumlamak mümkün gibi görünse de, DNM2 ile ilgili insan spermatogenez sürecindeki fonsiyonlarını araştıran ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

ID1

Yapmış olduğumuz çalışmada ID1 gen ekspresyonlarının HP ve SCO gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olarak sırasıyla 2,26 ve 2,86 kat artış gösterdiğini tespit ettik ($p < 0,05$).

ID1 proteini, bHLH (beta-heliks loop heliks) transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanmasını inhibe etme özelliğine sahiptir. ID1 proteinleri, heliks-loop-heliks proteinlerinin daha büyük ailesinin ayrı bir alt sınıfını temsil eder ve bHLH3

transkripsiyon faktörlerinin dominant negatif düzenleyicileri olarak işlev görür. ID proteinlerinin, memelilerde, balıklarda, Xenopus ve Drosophila ifade edildiği bildirilmiştir. DNA'yı temel domainlerden homo- ve/veya heterodimerler olarak bağlayan bHLH transkripsiyon faktörlerinin aksine, ID proteinleri böyle bir temel domaine sahip değildir ve bu nedenle DNA'yı bağlayamazlar.

Bununla birlikte, ID proteinleri, bHLH proteinleri ile heterodimerler oluşturarak DNA'yı bağlama yeteneklerini engeller. bHLH proteinlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu (veya baskılanmasının) antagonize eden bu tür etkileşim, *in vitro* çeşitli model sistemlerde ve *in vivo* olarak hücre farklılaşmasının inhibisyonuyla sonuçlanır. Buna ek olarak, ID1 proteinleri hücre döngüsü ilerlemesi sırasında düzenlenir, hücrenin çoğalmasını ve aynı zamanda hücre farklılaşmasını olumsuz şekilde düzenlediği bilinmektedir.

ID proteinlerinin ifadesinin baskılanmasıyla Sertoli hücrelerinde mitoz duraklatılarak, spermatogenez için gerekli genlerin ve Sertoli hücrelerinin hedef genlerinin ifadelerinin upregüle edildiği bildirilmiştir (Chaudhary ve ark., 2001). Düzensiz ID-protein ekspresyonu, tümör büyümesi, vaskülarizasyon, invazyon, metastaz, ilaç direnci ve adezyon ile birlikte çeşitli gelişimsel bozukluklar ve hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Norton, 2000, Ling ve ark., 2014).

ID1 proteinlerinin rolleri, tümörigenezisde, hücre döngüsü ve senesensin - yanı sıra transformasyon büyüme faktörü b (TGFb) ve (BMP) sinyal yolaklarında da etkilidir. Yapılan bir çalışmada Id1'in aşırı ekspresyonunun, hücresel senesensin bilinen bir mediatörü olan p16 kodlayan genin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir.

Aynı çalışmada Id1, Id2, Id3 ve Id4'ün farklı şekilde düzenlendiği ve farklı işlevleri olabileceği bildirilmiştir (Chaudhary ve ark., 2001). Id1, Sertoli hücre büyüme potansiyelini korumak için hareket ederken, Id2 ve Id4'ün ise Sertoli hücrelerinin farklılaşmasında ve hormon düzenlenmesinde aldığı bildirilmiştir. Sertoli hücrelerinin postmitotik popülasyonlarında Id proteinlerinin seviyeleri düşük bulunmuştur, terminal farklılaşmış hücre popülasyonu ile ise Id ifadelerinin doğru

orantılı olarak değiştiği bulunmuştur. Sıçan Sertoli hücrelerinin yetişkin popülasyonunda, insan Id1 ve Id2 geninin aşırı ekspresyonu indüklenerek postmitotik sıçan Sertoli hücrelerinin proliferasyonu sağlanmıştır (Chaudhary ve ark., 2001).

TGFb ailesinin üyeleri, hücre büyümesi, farklılaşma ve diferansiyasyonunun düzenlenmesinde çok önemli olan pleiotropik sinyal moleküleridir. BMP'leri de içeren TGFb'ye bağlı büyüme faktörleri, sinyallerini fosforile Smad transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla aktarırlar (Clark ve Coker, 1998, Massague ve ark., 2000). BMP'ler nöronal ve miyojenik hücre büyümesini ve farklılaşmasını baskılayabilir ve bu düzenleyici aktivite, ID proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu upregüle etme yeteneklerine bağlıdır (Nakashima ve ark., 2001, Maeda ve ark., 2004).

Yapılan bir başka çalışmada ID1'in, mayotik bölünmeye giren MI/MII spermatositlerde eksprese edildiğini göstermişlerdir. ID4 proteini A1 spermatogonyanın sitoplazmasında, geç paktien ve diploten evresindeki spermatositlerde gözlemlenmiştir. ID1, ID2, ID3, ID4 proteinlerinin, spermatogenezin farklı evrelerinde spesifik bir şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir. ID3, Sertoli hücre sitoplazmasında ifade edilmektedir (Chaudhary ve ark., 2001, Chaudhary ve ark., 2005). Malign seminoma hücrelerinde tüm ID proteinlerinin, subselüler dağılımında eşlik eden değişikliklerle birlikte bol miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Sablitzky ve ark., 1998). Post proliferatif Sertoli hücrelerinde ve spermatidlerde ve mayozun belirli aşamalarında ID proteinlerinin gözlemlenmesi, spermatogenez sırasında bu transkripsiyonel regülasyonunun önemini ortaya koymaktadır. ID proteinlerinin ifadesinin baskılanmasıyla spermatogenez için gerekli genlerin ve Sertoli hücrelerinin hedef genlerinin ifadesinin upregüle edildiği bildirilen çalışmanın sonuçları bizim verilerimiz ile uyumludur. Çalışmamızda, NOA grubunda saptadığmız istatstiksel olarak anlamlı, ID1 ekspresyon seviyesindeki 1,99 kat $p<0,001$ artışı, spermatogenez için gerekli genleri ve Sertoli hücrelerinin hedef gen ifadelerini baskılayarak, spermatogenez sürecini olumsuz yönde etkilediğini teyit eder niteliktedir. ID1 ifade seviyesinin spermatogenez sürecindeki hangi genlerin ifadesini etkilediği ile ilgili yapılacak ileri

çalışmaların sürecin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

LİN28A

Yapmış olduğumuz çalışmada LİN28A gen ifadelerini HP ve MA grubunda sırasıyla 0,83 kat ve 0,16 ($p<0,05$) kat az ifade edildiğini tespit ettik. SCO grubunda ise 3,56 kat ($p<0,05$) ifadesinin yüksek olduğunu gösterdik.

OCT4 ve NANOG gibi 'klasik' pluripotent transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, birkaç faktörün daha, uyarılmış pluripotent stem (iPS) hücre üretimi esnasında önemli rolleri olduğu bildirilmiştir. Bu transkripsiyon faktörleri arasında SALL4 KLF4 (Jiang ve ark., 2008) ve RNA-bağlayıcı protein LİN28 olduğu bildirilmiştir.

Lin 28'in ilk araştırıldığı Caenorhabditis elegans'da, bu proteinin ifadesinin gelişim sırasında sıkı şekilde düzenlendiği ve proteinin belirli zamandaki ifadeleri larvaların normal gelişiminde esas teşkil ettiği gösterilmiştir (Moss ve ark., 1997). Ayrıca, C. elegans lin-28'in fare ortologu, farelerde gelişim süresince spesifik ifadeler sergilemektedir (Moss ve Tang, 2003). Son zamanlarda, LIN28'in primordial germ hücresi (PGC) spesifikasyonunu (West ve ark., 2009) düzenleyen faktörler kaskadının tepesinde etkili olduğu ve yetişkin fare testislerinde LIN28'in farklılaşmamış spermatogonya'da ifade edildiği gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2009). Buna karşın, yapılan bir çalışmada ergenlik sonrası 50'den fazla sağlıklı insan kontrol testislerinde LIN28'in ifadesindeki ciddi bir azalma olduğunu bildirirken, buna zıt olarak insan testiküler germ hücreli tümörlerde güçlü bir şekilde LIN28 ifadesi varlığının tespit edildiği bildirilmiştir (Cao ve ark., 2011).

Yapılan başka bir çalışmada yetişkin testislerde LIN28'in bulunmaması veya çok az ekspresse edilmesi, Gillis ve arkadaşları tarafından doğrulanırken, fetal insan testislerinde LIN28'in gonosit spesifik ekspresyonu tespit edilmiştir (Gillis ve ark., 2011). LIN28'in insan iPS hücre üretimini önemli derecede arttırdığı gösterilmiştir (Yu ve ark., 2007, Warren ve ark., 2010). Bu faktör somatik hücrelerin iPS hücre

formuna geçişinde tamamen yeniden programlanması için gereklidir (Tomioka ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada, LIN28'in yetişkin fare spermatogonyalarında kuvvetli bir şekilde ifade edildiği göstermiştir. İlginç bir şekilde, aynı araştırmacılar tarafından LIN28'in, aynı zamanda çok küçük bir maymun spermatogonya alt popülasyonunda da ifade edildiği bildirilmiştir (Aeckerle ve ark., 2012).
DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörleri olan diğer birçok yeniden programlama proteinlerinin aksine, LIN28, iki spesifik alanı birleştiren tek bilinen memeli proteini olduğu için eşsiz moleküler özellikler sergileyen iyi korunmuş bir RNA bağlayıcı proteindir. LİN28 özellikle soğuk şok alanı, tek sarmallı nükleik asitlere ve sistein / histidin çinko finger motifine bağlanır. Sistein / histidin çinko finger motifi retro virüslerin nükleokapsid proteinlerinden bilinir. Viral RNA'nın virüs parçacıklarına paketlenmesine katılır (Moss ve Tang, 2003). Dolayısıyla, LIN28 bir RNA-bağlayıcı proteindir ve bu nedenle spermatogonyaların sitoplazmasında lokalizedir. Qiu ve ark (2010) yapmış olduğu bir çalışmada LIN28'in, insan ES hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalmasıyla ilgili olan OCT4 de dahil olmak üzere mRNA'lara bağlandığı ve bu translasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Qiu ve ark., 2010, Peng ve ark., 2011).

Kemirgen testisinde, LIN28-pozitif hücrelerin yüzdesinin gelişim boyunca sürekli olarak azlmakta olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın, doğum sonrası fare testisinde, LIN28 eksprese eden hücrelerin, yani gonositlerin ve olgunlaşmamış spermatogonya popülasyonunun doğum sonrası testis gelişiminin ilk günlerinde hızla arttığı gösterilmiştir. Özetle, LIN28, erişkin maymun ve insan testislerindeki spermatogonyaların yalnızca çok küçük bir popülasyonunda ifade edilir. Lin28'in pluripotent kök hücrelerdeki işlevsel rolü göz önünde bulundurulduğunda, LIN28'in SKH'lerde eksprese edildiği ve dolayısıyla insanda yeni SKH'ler için bir belirteç olarak görev görebileceği düşünülmektedir.

Epigenetik olarak, LIN28A ekspresyonu, miR125a ve miR125b mikroRNA'lar tarafından düzenlenir. İki korunmuş miRNA, miR-125a ve miR-125b, Lin28a'nın

UTR'sinde bulunur; böylece miR-125b'deki bir artış, Lin28a mRNA transkriptlerinin down regülasyonuyla sonuçlanır. Bu down regülasyon hem translasyonel seviyede hem de mRNA ifadelerindeki azalmayla gözlemlenir (Wu ve Belasco, 2005). LIN28A da let-7 ailesindeki diğer mikroRNA'ları düzenlemekle görevlidir. Let-7 familyasından gelen mikro RNA'ların biyosentezi, pri-miRNA'ların olgun miRNA'lara geçişinin engellenmesi nedeniyle LIN28A tarafından engellenir, LIN28A ve let-7 ailesi arasındaki bu negatif feedback mekanizması özellikle embriyonik gelişim sırasında son derece önemlidir. Azalan LIN28A düzeyleri ile let-7 indüksiyonu, farklılaşmamış hücrelerin kendiliğinden yenilenmesini engeller ve farklılaşmayı sağlamakla görevlidir (Melton ve ark., 2010, Thornton ve Gregory, 2012).

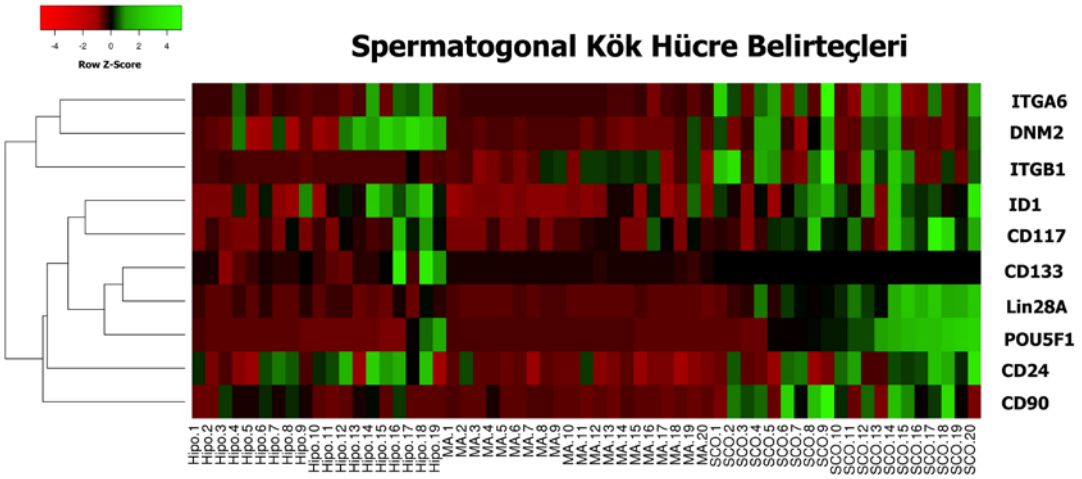
Yapılan bir çalışmada (Werler ve ark., 2014), germ hücre kayıplarının altında yatan transkripsiyonel düzenleyici mekanizmaları tanımlamak için, PGC'lerde eksprese edilen SKH belirteçleri olan Lin28a (Lin28), Pou5f1 (Oct4), Utf1, Ddx4 (Vasa), Dazl ve Fapb1'in (Sycp3) mRNA ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiş ve XXY farelerinde Lin28a düzenleyen miRNA'ların disregulasyonu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada intrauterin dönemde başlayan germ hücre kaybı için, neonatal dönemde, azalmış spermatogonya sayısıyla SKH marker ekspresyonu da azaldığı ve postnatal ilk haftasında bu azalışın devam ettiği ve SKH popülasyonundaki hayatta kalan hücrelerin kök hücre özelliklerinde bozulmaya neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Dolayısıyla, mayoza girdikten sonra tüm germ hücre hattında genellikle bir kayıp yaşanabileceği ifade edilmiştir (Werler ve ark., 2014).

Embriyonik gelişmeden kansere, inflamasyona ve metabolik süreçlere kadar uzanan Lin28 / let-7 ekseni, uygun hücre kaderini korumada ve hücresel düzeyde çoğalma, büyüme ve enerji kullanımının yanı sıra büyüme, gelişim, doku homeostazı ve bunun gibi metabolik olaylarda önemli roleri bulunmaktadır Let-7 miRNA'ların Lin28 tarafından düzenlenmesi ile ilgili çalışmalar, hızla büyüyen bir alandır ve memeli biyolojisinin farklı alanlarındaki küçük RNA metabolizmasının önemine işaret etmektedir (Heo ve ark., 2008).

Çalışmamız ile Lin28A ve let-7 miRNA'larının gelişim, doku homeostazı/rejenerasyonu ve spermatogenez sürecinde gen ifade seviyelerini korumaya nasıl yardım ettiğinin ve bu düzenleyici yolun kullanım yollarının geliştirilmesi ile özellikle erkek infertilitesinde aydınlatılamamış birçok olayın açığa kavuşmasına yardımcı olacağını düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışmada MA ve HP grubundaki LİN28 gen ifadelerindeki azalma, literatür verileri ışığında kök hücre özelliklerindeki bozulma neticesinde germ hücre hattında yaşanan kayıpları göstermektedir. LİN28 gen ifadelerinin miRNA'lar tarafından kontrol edildiği göz önünde bulundurulduğunda SCO grubundaki miRNA profilinin farklı olabileceği ön görülmektedir. Bu konuyla ilgili bir sonraki çalışmamızda hasta gruplarında miRNA profillerinin çıkarılması planlanmaktadır.

Seminifer tübüllerin somatik bileşenini oluşturan Sertoli hücreleri, memeli testislerinin önemli somatik hücre bileşenidir. Sertoli hücreleri seminifer tübüllerde 'hemşire hücreler' olarak bilinir ve testis işlevleri için çok önemli olan, germline kök hücrelerin düzenli gelişimini ve korunmasını sağlayan çok sayıda faktör salgılar (Van Saen ve ark., 2015). Bundan dolayı SCO'da, testis dokusundaki seminifer tübüller normal testis dokularına göre daha fazla Sertoli hücresi içerir, ancak germ hücreleri içermezler. Azoospermik hastalarda FSH seviyeleri bizim yaptığımız çalışmada da OA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifade edildiği gözlemlenmiştir. Kontrol olarak değerlendirilen OA grubunda FSH seviyelerinin normal olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda da SCO grubundaki birçok kök hücre belirtecinin ifadesinin arttığını yapmış olduğumuz biyoinformatik analiz olan heatmap analizi ile gösterdik **(Şekil 4.1).**



Şekil 4.1. Spermatogonyal kök hücre belirteci için gen ekspresyonlarının NOA grupları arasındaki dağılımını gösteren heatmap analizi. Z-skoru satırından etkilenen renkler, genlerin spesifik kat artışları veya azalışlarındaki profili göstermektedir. Kırmızı / yeşil renklenme, gruplar arasında kök hücre belirteçlerin gen ifadelerindeki kat artışlarının daha yüksek / düşük ifade edildiğini gösterir.

Yapılan bir çalışmada Klinefelter sendromlu (KS) germ hücre aplazisi olan hastalarda melanoma antijen ailesi A4 (MAGE-A4), ubiquitin karboksil-terminal esteraz L1 (UCHL1), oktamer-bağlayıcı transkripsiyon fakör 4 (OCT4), stage-spesifik embryonik antijen-4 (SSEA4), homeobox protein NANOG, INHA, anti-Müllerian hormon, androjen reseptor (AR), SOX9 ve STAR gibi bazı transkripsiyon faktörleri ve kök hücre belirteçlerinin ifadelerinin analizi yapılmıştır. INHA, SOX9, UCHL1 ve STAR gen ifadelerini genel olarak germ aplazisi olan hastalarda daha yüksek tespit etmişlerdir (Van Saen ve ark., 2015).

KS hastalarında testiküler çevrenin değiştiği, bununla birlikte, germ hücresi kaybının, germ hücresi içsel bozukluğun bir sonucu olup olmadığı ya da değişmiş somatik ortamdan ya da her ikisinden dolayı olduğu hala net anlaşılmış değildir. Bu gruptaki gen ekspresyonların ifadelerinin yüksekliğini, gerçekleşen germ hücre ölümleri sonrası Sertoli hücrelerinin, hücre ölümü geçiren germ hücrelerinden gelen aşırı proteinin uzaklaştırılmasıyla meşgul olması ile açıklanabilir.

SCO hastalarında, germ hücrelerinin yokluğu ve Sertoli hücrelerinin yoğun olarak germ hücre canlılığına ve diferansiyasyonuna katkı sağlama açısından gönderdiği parakrin faktörler ortamda bulunmaktadır. Bu faktörler nedeniyle tıpkı azoospermili

hastaların FSH ifadelerindeki yükseklik gibi bu gen ifadelerinde de buna benzer bir artışın söz olduğu söylenebilir. Bu ilginç konunun daha ileri araştırmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Yapmış olduğumuz gen ifadelerinin analizlerini histopatolojik ayrıma tabi tutmaksızın, TESE sonucuna göre OA ve NOA olarak değerlendirdik. OA grubuna göre kıyasla CD90, CD117, ID1 ve LİN28A gen ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 2,17, 3,45, 1,99, 3,44 kat arttığı ve CD133 geninin 0,39 kat azaldığı tespit edildi. CD29, CD24, ITGA6, DNM2, POU5F1 genlerinde sırasıyla 1,06, 1,25, 0,87, 0,90, 1,56 kat değişim göstererek istatistiksel anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.

Yapılan bir çalışmada, floresanla etkinleştirilmiş hücre ayırma yöntemi olan FACS ve MACS uygulanarak, insan SKH'leri OA ve NOA hastalarından izole edilmiş ve sonuç olarak hem kontrol grubunda hem de NOA grubunda GFRα1, integrin α6 ve integrinβ1 gibi iyi tanımlanmış belirteçlerin ortak ifade edildiği bildirilmiştir. Özellikle SKH'lerde, *in vitro* olarak yüksek canlılık ve düşük apoptoz oranları sergilemiş ve bu parametrelerde azoospermik hastalar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (Lim ve ark., 2010). Bu veriler bizim çalışmamızı doğrular niteliktedir. Yaptığımız çalışmada OA ve NOA grubu arasında ITGB1 ve ITGA6 genleri için bir farklılık olmadığını gösterdik. Ancak Lim ve ark (2010) yaptığı çalışmada hangi NOA grubu için analiz edildiğinin ayrımı yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında ITGA6 ve ITGB1 gen ifadelerinin istatiksel olarak anlamlı bir şekilde ifadeleri HP grubunda sırasıyla 0,65 ve 0,08 kat azaldığı, ITGA6'nın MA grubunda 0,22 kat azaldığı, SCO grubunda ise gen ifadelerinde sırasıyla 1,67 ve 2,10 kat bir artış olduğu söz saptandı. Bu nedenle spermatogonez belirteçleri hakkında yapılacak çalışmalarda NOA grubunun da histolojik alt gruplara ayırılıp değerlendirilmesinin daha doğru olacağı sonucuna varıldı.

Sonuçlar klinik olarak değerlendirildiğinde TESE biopsilerinde yapılabilecek bu gen analizleri dikkate alındığında, hücre çıkma durumları ve tedaviye yanıt verebilecek grupların değerlendirilmesinde çok değerli olacağı kanaatine varıldı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmada spermatogenez sürecinde etkin olan ve hücresel mekanizmalarda önemli rolleri olan biyobelirteçler ve spermatogenez defektleri ile olan ilişkisi detaylı bir şekilde araştırıldı. HP grubunda CD117 ve ID1 genleri sırasıyla 2,42 kat ve 2,26 kat artış gösterdiği ($p<0,05$), CD29 genininde 0,08 kat ($p<0,05$) azalış gösterdiği tespit edildi. MA grubunda spermatogonyal kök hücre belirteçlerinde CD90, CD133, CD24, ITGA6, DNM2, LİN28A ve POU5F1 gen ifadelerinde sırasıyla 0,40, 0,04, 0,54, 0,22,0,28, 0,22 ve 0,16 kat azalış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). SCO grubunda CD90, CD117, CD29, ID1, LİN28A ve POU5F1 gen ifadelerinde sırasıyla 4,73, 6,23, 2,10, 2,86, 8,71 ve 3,56 kat artış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). SCO grubunda CD133 gen ifadelerinin tespit edilmediği gösterildi.

Yapılan analizler sonucunda CD133'ün protein düzeyinde western blot analizi gerçekleştirildi. HP, MA ve SCO gruplarında sırasıyla 1,83, 4,11 ve 11,4 kat azalan protein ifadeleri tespit edildi ($p<0,05$). mikroTESE yapılan hastaların doku kesitlerinde CD133'ün immunohistokimyasal analizi gerçekleştirildi. OA grubunda geniş yayılımlı bir tutulum gözlemlenirken, HP grubunda kısmen bir tutulum gözlemlendi. MA ve SCO grubunda tutulum tespit edilmedi. CD133'ün sağlıklı spermdeki lokalizasyonu lazer taramalı konfokal görüntü analizi ile gerçekleştirildi. Sağlıklı sperm hücresinin yoğun olarak kuyruk ve kısmen baş kısmında ifade edildiği gösterildi. Spermatogenezde germ hücrelerinin diferansiyasyonunda ve spermatogonyal kök hücrelere mikroçevre ortamı sağlayan Sertoli hücrelerinde CD133 ifadelerinin analizi yine lazer taramalı konfokal görüntü analizi ile gerçekleştirildi. Sağlıklı ticari Sertoli hücrelerinde ve OA'lı bireylerin Sertoli hücre kültürlerinde CD133 ifadesinin yoğun bir şekilde olduğu tespit edildi. Özellikle SCO grubunda Sertoli hücrelerinde ifadesi gözlemlenmeyen CD133'ün, sağlıklı Sertoli hücrelerindeki ifade edildiği saptandı. Bu bulgu CD133'ün, spermatogenezin devamlılığında ve germ hücrelerin gelişimindeki etkisini ortaya koymakta olup, **literatürde ilk kez gösterilmiş olması nedeniyle çok önemlidir**.

CD133'ün plazma-membran çıkıntılarına, özellikle kolesterol açısından, uygun bir lipid kompozisyonu sağlama özelliği bulunmaktadır. Etrafındaki ekstraselüler matrikse çıkıntı yapan kıvrımlı plazma zar alt alanları ile spesifik ilişki içerisinde olan CD133, membran lipit raftlarının oluşumunda da çok önemli görevleri vardır. Kapasitasyon mekanizmasında sperm membran polarizasyonunun sağlanmasında lipid raftlarının önemli bir yeri bulunmaktadır. Membran lipit raftlarının sperm membranındaki dağılımı, hücrelerin kapasitasyon durumu ile çok sıkı ilişki içerisindedir. Bu bağlamda CD133'ün erkek infertilitesinin etyolojisinin anlaşılmasında ve tedavi protokollerinin geliştirilmesinde önemli bir belirteç olabileceğini düşünülmektedir.

Bu çalışmanın devamında hazırladığımız proje önerisinde CD133'ün, infertilite şikayeti ile gelen hastalardaki ifadelerinin araştırılması ve seminal sıvıdaki miktarlarının tespit edilmesi ve CD133 geninin yeni nesil sekans analizlerinin tüm ekson sekanslama ile araştırılması gerçekleştirilecektir. Elde ettiğimiz bulgulara ilave olarak nakavt fare modellerinde CD133'ün etki mekanizmalarının araştırılmasının spermatogenezin aydınlatılmasına katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma sonuçlarına ilave olarak, gen düzeyinde tespit edilen spermatogonyal kök hücre belirteçlerinin protein düzeyinde de ifadelerinin çalışılması gerekmektedir.
Özellikle hücresel mekanizmalarda etkili, SKH'lerin diferansiyasyonu, kendini yenilemesi, canlılığı ve çoğalmasında etkili olan CD117, CD90, CD24, ID1, LİN28, DNM2, CD29 ve CD49f gen ifadelerinin hem Sertoli hücrelerinde hem de germ hücrelerindeki ifadeleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmelidir.

LİN28 gen ifadelerinde spermatogenez defekti olan SCO grubunda anlamlı bir artış olduğunu gösterdik. Bu bulgu bize erkek infertilitesinde, spermatogenez sürecinde farklı miRNA profillerinin varlığını göstermektedir. Bu bağlamda özellikle antogonist olarak çalışan Let7 ifadelerinin de araştırılarak, miRNA profillerinin çıkarılması gerekmektedir. Böylelikle spermatogenez defektlerine neden olan bazı genlerin ifadelerindeki bozulmanın bu eksende gerçekleştiği ve geliştirilecek küratif

protokollerin insan üreme sağlığı açısından çok değerli olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu tez çalışması, spermatogenezde moleküler yolakları hedefleyen, *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların gerçekleştirilmesine basamak oluşturabilecektir. Çalışmadan elde edilecek bilgiler sayesinde hücre yüzey belirteçleri kullanılarak özellikle IVF uygulamalarında sağlıklı hücrelerin seçilimine imkan sağlanabilecektir**.** Bu da infertil hastaların, çocuk sahibi olmaları açısından umut ışığı olacaktır.

Belirlenen kök hücre belirteçleri sayesinde hipospermatogenezi ve maturasyon arresti olan bireylerden elde edilebilecek germ hücrelerinin ileride yapılacak ko-kültür çalışmaları ile hücrelerin diferansiyasyonunda etkin mekanizmaların aydınlatılması ve infertilite tedavisinde yeni gelişmelere kaynaklık edeceği düşünülmektedir.

ÖZET

Spermatogenezde Rol Oynayan Hücresel Moleküler Mekanizmaların Araştırılması

Spermatogenez, olgun testiste spermatogonyal kök hücrelerinin mitoza girip farklılaşmış bir spermatogonya türünü tetiklemesiyle başlatılır. Böylece, spermatogenez spermatogonyal kök hücreler (SKH)'in farklılaşması ve spermatogonyaların kesintisiz bir kaynağı olarak devamlılığı sağlama yeteneği ile devam ettirilir. Erkek infertilitesinin etyolojisinin aydınlatılmasında SKH'lerin tanımlanması ve bu belirteçlerin spermatogenez defektlerindeki etkilerinin belirlenmesi çok önemlidir. Bu çalışmada spermatogenez sürecinde germ hücre proliferasyonu, diferensiyasyonu ve hücre canlılığında rol oynayan spermatogonyal kök hücreleri tanımlayacak yeni biyobelirteçler ve bu belirteçlerin spermatogenez defektleri ile olan ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Spermatogenez sürecinde etkin olan ve hücresel mekanizmalarda önemli rolleri olan biyobelirteçler ve bu biyobelirteçlerin spermatogenez defektleri ile olan ilişkileri RT-PCR array analizleri ile gerçekleştirildi. Anlamlı gen ifadeleri western blot, immunohistokimya ve immunositokimyasal analizlerle doğrulandı. HP grubunda CD117 ve ID1 genleri sırasıyla 2,42, 2,26 kat artış gösterdiği ($p<0,05$), CD29 genininde 0,08 kat ($p<0,05$) azalış gösterdiği tespit edildi. MA grubunda spermatogonyal kök hücre belirteçlerinde CD90, CD133, CD24, ITGA6, DNM2, LİN28A ve POU5F1 gen ifadelerinde sırasıyla 0,40, 0,04, 0,54, 0,22, 0,28, 0,22 ve 0,16 kat azalış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). SCO grubunda CD90, CD117, CD29, ID1, LİN28A ve POU5F1 gen ifadelerinde sırasıyla 4,73, 6,23, 2,10, 2,86, 8,71 ve 3,56 kat artış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). SCO grubunda CD133 gen ifadelerinin tespit edilmediği gösterildi.

Yapılan analizler sonucunda CD133'ün western blot analizinde HP, MA ve SCO gruplarında sırasıyla 1,83, 4,11 ve 11,4 kat azalan protein ifadeleri tespit edildi ($p<0,05$). CD133'ün immunohistokimyasal analizinde OA grubunda geniş yayılımlı bir pozitif boyanma gözlemlenirken, HP grubunda kısmen bir pozitif boyanma gözlemlendi. MA grubunda çok az ve SCO grubunda negatif boyanma tespit edildi. CD133'ün sağlıklı spermdeki lokalizasyonu lazer taramalı konfokal görüntü analizinde yoğun olarak kuyruk ve kısmen baş kısmında ifade edildiği gösterildi. Sağlıklı ticari Sertoli hücreleri ve OA'lı bireylerin Sertoli hücre kültürlerinde CD133 protein ifadesinin yoğun bir şekilde ifade edildiği tespit edildi.

SKH belirteçlerinin infertil hasta gruplarında farklı profil sergilediği tespit edildi. Bu belirteçlerin spermatogenez defektlerine olan etkilerine karşılık geliştirilecek küratif protokollerin insan üreme sağlığı açısından çok değerli olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Erkek İnfertilitesi, Spermatogenez, Spermatogonyal Kök Hücre, CD133, Sertoli Hücresi,

SUMMARY

Investigation of The Cellular Molecular Mechanisms Playing Roles In Spermatogenesis

Spermatogenesis is initiated when spermatogonial stem cells in adult testis enter the mitosis and induce differentiated spermatogonia. Thus, spermatogenesis is continued with the differentiation of the ability of spermatogonial stem cells (SKH) and with the ability to maintain continuity as an uninterrupted source of spermatogonia. Identification of SKHs and determination of their effects on defects of spermatogenesis are very important for elucidation of the etiology of male infertility. In this study, our aim is to investigate the new biomarkers that define spermatogonial stem cells which play a role in germ cell proliferation, differentiation, cell viability and to research the relationship between these biomarkers with spermatogenesis defects.

The biomarkers, effective in the spermatogenesis process and have important roles in cellular mechanisms, and its relationshipn with spermatogenesis defects were analyzed by RT-PCR array analysis. Statistically significant gene expression was confirmed by western blot, immunohistochemistry and immunocytochemical assays. In the HP group, CD117 and ID1 genes showed a 2.42-fold, 2.26-fold increase ($p < 0.05$) respectively and 0.08-fold decrease ($p < 0.05$) in the CD29 gene. In the MA group, CD90, CD133, CD24, ITGA6, DNM2, LIN28A and POU5F1 genes showed 0.40, 0.04, 0.54, 0.22, 0.28, 0.22 and 0.16- fold decrease ($p < 0.05$) respectively. SCO group CD90, CD117, CD29, ID1, LIN28A and POU5F1 gene expressions showed 4.73, 6.23, 2.10, 2.86, 8.71 and 3.56 fold increase respectively ($p < 0.05$). CD133 gene expression was not detected in the SCO group.

As a result of the western blot analysis of CD133 protein expression HP, MA and SCO groups showed 1.83, 4.11 and 11.4 fold decrease respectively ($p < 0.05$). Immunohistochemical analysis of CD133 showed a partial positive staining in the HP group, while an excess positive staining was observed in the OA group. The negative staining was detected in the MA and SCO groups. The localization of the CD133 protein in the healthy sperm was shown to be mostly in the tail and partially in the head by laser scanning confocal image analysis. It has been found that healthy commercial Sertoli cells and OA groups express CD133 protein intensively confirmed by immunocytochemical analysis of CD133 protein expression in Sertoli cell cultures.

It was found that SKH biomarkers exhibit different profiles in infertile patient groups. We think that the curative protocols which will be developed against the effects of these markers in spermatogenesis defects will be very valuable in terms of human reproductive health.

Key Words: Male Infertility, Spermatogenesis, Spermatogonial Stem Cell, CD133, Sertoli Cell

KAYNAKLAR

ABDEL RAHEEM, A., GARAFFA, G., RUSHWAN, N., DE LUCA, F., ZACHARAKIS, E., ABDEL RAHEEM, T., FREEMAN, A., SERHAL, P., HARPER, J. C. & RALPH, D. (2013). Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU Int,* **111**: 492-9.

AECKERLE, N., EILDERMANN, K., DRUMMER, C., EHMCKE, J., SCHWEYER, S., LERCHL, A., BERGMANN, M., KLIESCH, S., GROMOLL, J., SCHLATT, S. & BEHR, R. (2012). The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Mol Hum Reprod,* **18**: 477-88.

AGARWAL, A., BATRA, B. & SOOD, A. (2008). Evolutionary trends in radiology assessment: The importance of the learning cycle and its assessment in radiology. *Indian J Radiol Imaging,* **18**: 272-5.

AIGNER, S., RAMOS, C. L., HAFEZI-MOGHADAM, A., LAWRENCE, M. B., FRIEDERICHS, J., ALTEVOGT, P. & LEY, K. (1998). CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *Faseb j,* **12**: 1241-51.

AIGNER, S., STHOEGER, Z. M., FOGEL, M., WEBER, E., ZARN, J., RUPPERT, M., ZELLER, Y., VESTWEBER, D., STAHEL, R., SAMMAR, M. & ALTEVOGT, P. (1997). CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood,* **89**: 3385-95.

AIRAKSINEN, M. S. & SAARMA, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci,* **3**: 383-94.

ALLAIS-BONNET, A. & PAILHOUX, E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Frontiers in Cell and Developmental Biology,* **2**.

ALTMAN, E., YANGO, P., MOUSTAFA, R., SMITH, J. F., KLATSKY, P. C. & TRAN, N. D. (2014). Characterization of human spermatogonial stem cell markers in fetal, pediatric, and adult testicular tissues. *Reproduction,* **148**: 417-27.

ANAFARTA, K., BEDÜK, Y. & ARıKAN, N. 2007. *Temel üroloji*, Güneş Kitabevi.

ANNIBALLO, R., UBALDI, F., COBELLIS, L., SORRENTINO, M., RIENZI, L., GRECO, E. & TESARIK, J. (2000). Criteria predicting the absence of spermatozoa in the Sertoli cell-only syndrome can be used to improve success rates of sperm retrieval. *Hum Reprod,* **15**: 2269-77.

APONTE, P. M., VAN BRAGT, M. P., DE ROOIJ, D. G. & VAN PELT, A. M. (2005). Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *Apmis,* **113**: 727-42.

ARBER, D. A., TAMAYO, R. & WEISS, L. M. (1998). Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol,* **29**: 498-504.

ASHRAF, M. C., SINGH, S., RAJ, D., RAMAKRISHNAN, S. & ESTEVES, S. C. (2013). Micro-dissection testicular sperm extraction as an alternative for sperm acquisition in the most difficult cases of Azoospermia: Technique and preliminary results in India. *J Hum Reprod Sci,* **6**: 111-23.

AUGER, J., EUSTACHE, F., ANDERSEN, A. G., IRVINE, D. S., JORGENSEN, 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.

AVALOS, A. M., ARTHUR, W. T., SCHNEIDER, P., QUEST, A. F., BURRIDGE, K. & LEYTON, L. (2004). Aggregation of integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes. *J Biol Chem,* **279**: 39139-45.

AWONIYI, C. A., SPRANDO, R. L., SANTULLI, R., CHANDRASHEKAR, V., EWING, L. L. & ZIRKIN, B. R. (1990). Restoration of spermatogenesis by exogenously administered testosterone in rats made azoospermic by hypophysectomy or withdrawal of luteinizing hormone alone. *Endocrinology,* **127**: 177-84.

BAARENDS, W. M., WASSENAAR, E., HOOGERBRUGGE, J. W., VAN CAPPELLEN, G., ROEST, H. P., VREEBURG, J., OOMS, M., HOEIJMAKERS, J. H. & GROOTEGOED, J. A. (2003). Loss of HR6B ubiquitin-conjugating activity results in damaged synaptonemal complex structure and increased crossing-over frequency during the male meiotic prophase. *Mol Cell Biol,* **23**: 1151-62.

BABA, T., CONVERY, P. A., MATSUMURA, N., WHITAKER, R. S., KONDOH, E., PERRY, T., HUANG, Z., BENTLEY, R. C., MORI, S., FUJII, S., MARKS, J. R., BERCHUCK, A. & MURPHY, S. K. (2009). Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene,* **28**: 209-18.

BALLESCA, J. L., BALASCH, J., CALAFELL, J. M., ALVAREZ, R., FABREGUES, F., DE OSABA, M. J., ASCASO, C. & VANRELL, J. A. (2000). Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod,* **15**: 1734-8.

BARRATT, C. L., NAEENI, M., CLEMENTS, S. & COOKE, I. D. (1995). Clinical value of sperm morphology for in-vivo fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992. *Hum Reprod,* **10**: 587-93.

BAUER, N., WILSCH-BRAUNINGER, M., KARBANOVA, J., FONSECA, A. V., STRAUSS, D., FREUND, D., THIELE, C., HUTTNER, W. B., BORNHAUSER, M. & CORBEIL, D. (2011). Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles--a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Mol Med,* **3**: 398-409.

BELLVE, A. R., CAVICCHIA, J. C., MILLETTE, C. F., O'BRIEN, D. A., BHATNAGAR, Y. M. & DYM, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol,* **74**: 68-85.

BERGMANN, M., BEHRE, H. M. & NIESCHLAG, E. (1994). Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clin Endocrinol (Oxf),* **40**: 133-6.

BESMER, P., MANOVA, K., DUTTLINGER, R., HUANG, E. J., PACKER, A., GYSSLER, C. & BACHVAROVA, R. F. (1993). The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*: 125-37.

BHATIA, M. (2001). AC133 expression in human stem cells. *Leukemia,* **15**: 1685-8.

BHATTACHARYA, I., PRADHAN, B. S., SARDA, K., GAUTAM, M., BASU, S. & MAJUMDAR, S. S. (2012). A switch in Sertoli cell responsiveness to FSH may be responsible for robust onset of germ cell differentiation during prepubartal testicular maturation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* **303**: E886-98.

BIALAS, M., BORCZYNSKA, A., ROZWADOWSKA, N., FISZER, D., KOSICKI, W., JEDRZEJCZAK, P. & KURPISZ, M. (2010). SCF and c-kit expression profiles in male individuals with normal and impaired spermatogenesis. *Andrologia,* **42**: 83-91.

BLUME-JENSEN, P., CLAESSON-WELSH, L., SIEGBAHN, A., ZSEBO, K. M., WESTERMARK, B. & HELDIN, C. H. (1991). Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *Embo j,* **10**: 4121-8.

BLUME-JENSEN, P., JIANG, G., HYMAN, R., LEE, K. F., O'GORMAN, S. & HUNTER, T. (2000). Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet,* **24**: 157-62.

BOERKE, A., TSAI, P. S., GARCIA-GIL, N., BREWIS, I. A. & GADELLA, B. M. (2008). Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology,* **70**: 1188-96.

BOHRING, C., SCHROEDER-PRINTZEN, I., WEIDNER, W. & KRAUSE, W. (2002). Serum levels of inhibin B and follicle-stimulating hormone may predict successful sperm retrieval in men with azoospermia who are undergoing testicular sperm extraction. *Fertil Steril,* **78**: 1195-8.

BOJESEN, A. & GRAVHOLT, C. H. (2007). Klinefelter syndrome in clinical practice. *Nat Clin Pract Urol,* **4**: 192-204.

BOKEMEYER, C., KUCZYK, M. A., DUNN, T., SERTH, J., HARTMANN, K., JONASSON, J., PIETSCH, T., JONAS, U. & SCHMOLL, H.-J. (1996). Expression of stem-cell factor and its receptor c-kit protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology,* **122**: 301-306.

BOU KHALIL, M., CHAKRABANDHU, K., XU, H., WEERACHATYANUKUL, W., BUHR, M., BERGER, T., CARMONA, E., VUONG, N., KUMARATHASAN, P., WONG, P. T., CARRIER, D. & TANPHAICHITR, N. (2006). Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Dev Biol,* **290**: 220-35.

BREMNER, W. J., MILLAR, M. R., SHARPE, R. M. & SAUNDERS, P. T. (1994). Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology,* **135**: 1227-34.

BROWN, D. A. & LONDON, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol,* **14**: 111-36.

BRUGO-OLMEDO, S., DE VINCENTIIS, S., CALAMERA, J. C., URRUTIA, F., NODAR, F. & ACOSTA, A. A. (2001). Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril,* **76**: 1124-9.

BUAAS, F. W., KIRSH, A. L., SHARMA, M., MCLEAN, D. J., MORRIS, J. L., GRISWOLD, M. D., DE ROOIJ, D. G. & BRAUN, R. E. (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet,* **36**: 647-52.

BUAGEAW, A., SUKHWANI, M., BEN-YEHUDAH, A., EHMCKE, J., RAWE, V. Y., PHOLPRAMOOL, C., ORWIG, K. E. & SCHLATT, S. (2005). GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol Reprod,* **73**: 1011-6.

CAIRES, K., BROADY, J. & MCLEAN, D. (2010). Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol,* **205**: 133-45.

CAMPBELL, E. A., O'HARA, L., CATALANO, R. D., SHARKEY, A. M., FREEMAN, T. C. & JOHNSON, M. H. (2006). Temporal expression profiling of the uterine luminal epithelium of the pseudo-pregnant mouse suggests receptivity to the fertilized egg is associated with complex transcriptional changes. *Hum Reprod,* **21**: 2495-513.

CAO, D., ALLAN, R. W., CHENG, L., PENG, Y., GUO, C. C., DAHIYA, N., AKHI, S. & LI, J. (2011). RNA-binding protein LIN28 is a marker for testicular germ cell tumors. *Hum Pathol,* **42**: 710-8.

CARLOMAGNO, G., VAN BRAGT, M. P., KORVER, C. M., REPPING, S., DE ROOIJ, D. G. & VAN PELT, A. M. (2010). BMP4-induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line causes changes in its cell adhesion properties. *Biol Reprod*, **83**: 742-9.

CHANDLEY, A. C. (1998). Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as causal factors in male infertility. *Hum Reprod*, **13 Suppl 1**: 45-50.

CHANDOLIA, R. K., WEINBAUER, G. F., BEHRE, H. M. & NIESCHLAG, E. (1991). Evaluation of a peripherally selective antiandrogen (Casodex) as a tool for studying the relationship between testosterone and spermatogenesis in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **38**: 367-75.

CHANG, Y., UENG, S. W., LIN-CHAO, S. & CHAO, C. C. (2008). Involvement of Gas7 along the ERK1/2 MAP kinase and SOX9 pathway in chondrogenesis of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*, **16**: 1403-12.

CHAUDHARY, J., JOHNSON, J., KIM, G. & SKINNER, M. K. (2001). Hormonal regulation and differential actions of the helix-loop-helix transcriptional inhibitors of differentiation (Id1, Id2, Id3, and Id4) in Sertoli cells. *Endocrinology*, **142**: 1727-36.

CHAUDHARY, J., SADLER-RIGGLEMAN, I., AGUE, J. M. & SKINNER, M. K. (2005). The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate. *Biol Reprod*, **72**: 1205-17.

CHEN, C., OUYANG, W., GRIGURA, V., ZHOU, Q., CARNES, K., LIM, H., ZHAO, G. Q., ARBER, S., KURPIOS, N., MURPHY, T. L., CHENG, A. M., HASSELL, J. A., CHANDRASHEKAR, V., HOFMANN, M. C., HESS, R. A. & MURPHY, K. M. (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, **436**: 1030-4.

CHENG, C. Y. & MRUK, D. D. (2012). The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacol Rev*, **64**: 16-64.

CHENG, Y. S., LU, C. W., LIN, T. Y., LIN, P. Y. & LIN, Y. M. (2017). Causes and Clinical Features of Infertile Men With Nonobstructive Azoospermia and Histopathologic Diagnosis of Hypospermatogenesis. *Urology*, **105**: 62-68.

CHOCU, S., CALVEL, P., ROLLAND, A. D. & PINEAU, C. (2012). Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst Biol Reprod Med*, **58**: 179-90.

CHUI, K., TRIVEDI, A., CHENG, C. Y., CHERBAVAZ, D. B., DAZIN, P. F., HUYNH, A. L. T., MITCHELL, J. B., RABINOVICH, G. A., NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. & JOHN, C. M. (2011). Characterization and Functionality of Proliferative Human Sertoli Cells. *Cell Transplant*, **20**: 619-35.

CIRAOLO, E., MORELLO, F., HOBBS, R. M., WOLF, F., MARONE, R., IEZZI, M., LU, X., MENGOZZI, G., ALTRUDA, F., SORBA, G., GUAN, K., PANDOLFI, P. P., WYMANN, M. P. & HIRSCH, E. (2010). Essential role of the p110beta subunit of phosphoinositide 3-OH kinase in male fertility. *Mol Biol Cell*, **21**: 704-11.

CLARK, D. A. & COKER, R. (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*, **30**: 293-8.

CONRAD, S., RENNINGER, M., HENNENLOTTER, J., WIESNER, T., JUST, L., BONIN, M., AICHER, W., BUHRING, H. J., MATTHEUS, U., MACK, A., WAGNER, H. J., MINGER, S., MATZKIES, M., REPPEL, M., HESCHELER, J., SIEVERT, K. D., STENZL, A. & SKUTELLA, T. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*, **456**: 344-9.

COOK, T. A., URRUTIA, R. & MCNIVEN, M. A. (1994). Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 644-8.

COOKE, P. S., PORCELLI, J. & HESS, R. A. (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**: 146-54.

COOPER, T. G., NOONAN, E., VON ECKARDSTEIN, S., AUGER, J., BAKER, H. W., BEHRE, H. M., HAUGEN, T. B., KRUGER, T., WANG, C., MBIZVO, M. T. & VOGELSONG, K. M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*, **16**: 231-45.

CORBEIL, D., JOESTER, A., FARGEAS, C. A., JASZAI, J., GARWOOD, J., HELLWIG, A., WERNER, H. B. & HUTTNER, W. B. (2009). Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (CD133) in glial cells. *Glia*, **57**: 860-74.

CORBEIL, D., ROPER, K., FARGEAS, C. A., JOESTER, A. & HUTTNER, W. B. (2001). Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic*, **2**: 82-91.

CORBEIL, D., ROPER, K., HELLWIG, A., TAVIAN, M., MIRAGLIA, S., WATT, S. M., SIMMONS, P. J., PEAULT, B., BUCK, D. W. & HUTTNER, W. B. (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, **275**: 5512-20.

CORREIA, S., ALVES, M. R., CAVACO, J. E., OLIVEIRA, P. F. & SOCORRO, S. (2014). Estrogenic regulation of testicular expression of stem cell factor and c-kit: implications in germ cell survival and male fertility. *Fertil Steril*, **102**: 299-306.

CORTES, D., MULLER, J. & SKAKKEBAEK, N. E. (1987). Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl*, **10**: 589-96.

COSTOYA, J. A., HOBBS, R. M., BARNA, M., CATTORETTI, G., MANOVA, K., SUKHWANI, M., ORWIG, K. E., WOLGEMUTH, D. J. & PANDOLFI, P. P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet,* **36**: 653-9.

CREEMERS, L. B., MENG, X., DEN OUDEN, K., VAN PELT, A. M., IZADYAR, F., SANTORO, M., SARIOLA, H. & DE ROOIJ, D. G. (2002). Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol Reprod,* **66**: 1579-84.

DADA, R., KUMAR, M., JESUDASAN, R., FERNANDEZ, J. L., GOSALVEZ, J. & AGARWAL, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet,* **29**: 213-23.

DADOUNE, J. P. (2007). New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol,* **45**: 141-7.

DE BRAEKELEER, M. & FEREC, C. (1996). Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod,* **2**: 669-77.

DE JONGE, C. J. & BARRATT, C. 2006. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration,* Cambridge University Press.

DE JONGE, C. J., BARRATT, C. L. R. & YANAGIMACHI, R. 2017. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration,* Cambridge University Press.

DE KRETSER, D. M. (1997). Male infertility. *Lancet,* **349**: 787-90.

DE ROOIJ, D. G. (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech,* **72**: 580-5.

DENOLET, E., DE GENDT, K., ALLEMEERSCH, J., ENGELEN, K., MARCHAL, K., VAN HUMMELEN, P., TAN, K. A., SHARPE, R. M., SAUNDERS, P. T., SWINNEN, J. V. & VERHOEVEN, G. (2006). The effect of a sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Mol Endocrinol,* **20**: 321-34.

DIALLO, R., RODY, A., JACKISCH, C., TING, E., SCHAEFER, K. L., KISSLER, S., KARN, T., GEDDERT, H., ENGELS, K., KAUFMANN, M., GABBERT, H. E., SHROYER, K. R. & POREMBA, C. (2006). C-KIT expression in ductal carcinoma in situ of the breast: co-expression with HER-2/neu. *Hum Pathol,* **37**: 205-11.

DIZDAROGLU, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res,* **275**: 331-42.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy,* **8**: 315-7.

DON, J. & STELZER, G. (2002). The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol,* **187**: 115-24.

DONOSO, P., TOURNAYE, H. & DEVROEY, P. (2007). Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update,* **13**: 539-49.

DORRINGTON, J. H., FRITZ, I. B. & ARMSTRONG, D. T. (1976). Site at which FSH regulates estradiol-17beta biosynthesis in Sertoli cell preparations in culture. *Mol Cell Endocrinol,* **6**: 117-22.

DREYER, E. B., LEIFER, D., HENG, J. E., MCCONNELL, J. E., GORLA, M., LEVIN, L. A., BARNSTABLE, C. J. & LIPTON, S. A. (1995). An astrocytic binding site for neuronal Thy-1 and its effect on neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **92**: 11195-9.

DUBREUIL, V., MARZESCO, A. M., CORBEIL, D., HUTTNER, W. B. & WILSCH-BRAUNINGER, M. (2007). Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol,* **176**: 483-95.

DUDLEY, B., PALUMBO, C., NALEPKA, J. & MOLYNEAUX, K. (2010). BMP signaling controls formation of a primordial germ cell niche within the early genital ridges. *Dev Biol,* **343**: 84-93.

DYM, M., KOKKINAKI, M. & HE, Z. (2009). Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Res C Embryo Today,* **87**: 27-34.

DYM, M. & RAJ, H. G. (1977). Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. *Biol Reprod,* **17**: 676-96.

EACKER, S. M., SHIMA, J. E., CONNOLLY, C. M., SHARMA, M., HOLDCRAFT, R. W., GRISWOLD, M. D. & BRAUN, R. E. (2007). Transcriptional profiling of androgen receptor (AR) mutants suggests instructive and permissive roles of AR signaling in germ cell development. *Mol Endocrinol,* **21**: 895-907.

EBATA, K. T., ZHANG, X. & NAGANO, M. C. (2005). Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. *Mol Reprod Dev,* **72**: 171-81.

EDDY, E. M. (1999). Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod,* **4**: 23-30.

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

ESFANDIARI, F., MASHINCHIAN, O., ASHTIANI, M. K., GHANIAN, M. H., HAYASHI, K., SAEI, A. A., MAHMOUDI, M. & BAHARVAND, H. (2015). Possibilities in Germ Cell Research: An Engineering Insight. *Trends in Biotechnology,* **33**: 735-746.

ESTEVES, S. C. & AGARWAL, A. (2011). Novel concepts in male infertility. *Int Braz J Urol,* **37**: 5-15.

ESTEVES, S. C., MIYAOKA, R. & AGARWAL, A. (2011). An update on the clinical assessment of the infertile male. [corrected]. *Clinics (Sao Paulo)*, **66**: 691-700.
FALENDER, A. E., FREIMAN, R. N., GELES, K. G., LO, K. C., HWANG, K., LAMB, D. J., MORRIS, P. L., TJIAN, R. & RICHARDS, J. S. (2005). Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev*, **19**: 794-803.
FARGEAS, C. A., CORBEIL, D. & HUTTNER, W. B. (2003a). AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells*, **21**: 506-8.
FARGEAS, C. A., FLOREK, M., HUTTNER, W. B. & CORBEIL, D. (2003b). Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins. *J Biol Chem*, **278**: 8586-96.
FARGEAS, C. A., HUTTNER, W. B. & CORBEIL, D. (2007). Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update. *Tissue Antigens*, **69**: 602-6.
FARGEAS, C. A., JOESTER, A., MISSOL-KOLKA, E., HELLWIG, A., HUTTNER, W. B. & CORBEIL, D. (2004). Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. *J Cell Sci*, **117**: 4301-11.
FARINI, D., LA SALA, G., TEDESCO, M. & DE FELICI, M. (2007). Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. *Dev Biol*, **306**: 572-83.
FENG, L. X., RAVINDRANATH, N. & DYM, M. (2000). Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem*, **275**: 25572-6.
FERGUSON, S. M., BRASNJO, G., HAYASHI, M., WOLFEL, M., COLLESI, C., GIOVEDI, S., RAIMONDI, A., GONG, L. W., ARIEL, P., PARADISE, S., O'TOOLE, E., FLAVELL, R., CREMONA, O., MIESENBOCK, G., RYAN, T. A. & DE CAMILLI, P. (2007). A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science*, **316**: 570-4.
FERGUSON, S. M., RAIMONDI, A., PARADISE, S., SHEN, H., MESAKI, K., FERGUSON, A., DESTAING, O., KO, G., TAKASAKI, J., CREMONA, O., E, O. T. & DE CAMILLI, P. (2009). Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*, **17**: 811-22.
FIGUEIRA, M. I., CARDOSO, H. J., CORREIA, S., MAIA, C. J. & SOCORRO, S. (2014). Hormonal regulation of c-KIT receptor and its ligand: implications for human infertility? *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, **49**: 1-19.
FLANNIGAN, R. & SCHLEGEL, P. N. (2017). Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **44**: 26-37.
FLOREK, M., BAUER, N., JANICH, P., WILSCH-BRAEUNINGER, M., FARGEAS, C. A., MARZESCO, A. M., EHNINGER, G., THIELE, C., HUTTNER, W. B. & CORBEIL, D. (2007). Prominin-2 is a cholesterol-binding protein associated with apical and basolateral plasmalemmal protrusions in polarized epithelial cells and released into urine. *Cell Tissue Res*, **328**: 31-47.
FONSECA, A. V., BAUER, N. & CORBEIL, D. (2008). The stem cell marker CD133 meets the endosomal compartment--new insights into the cell division of hematopoietic stem cells. *Blood Cells Mol Dis*, **41**: 194-5.
FONSECA, A. V., FREUND, D., BORNHAUSER, M. & CORBEIL, D. (2010). Polarization and migration of hematopoietic stem and progenitor cells rely on the RhoA/ROCK I pathway and an active reorganization of the microtubule network. *J Biol Chem*, **285**: 31661-71.
FRENETTE, P. S. & WAGNER, D. D. (1996). Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med*, **334**: 1526-9.
FRIEDERICHS, J., ZELLER, Y., HAFEZI-MOGHADAM, A., GRONE, H. J., LEY, K. & ALTEVOGT, P. (2000). The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, **60**: 6714-22.
FUJITA, N., KATO, Y., NAITO, M. & TSURUO, T. (1996). A novel anti-Thy-1 (CD90) monoclonal antibody induces apoptosis in mouse malignant T-lymphoma cells in spite of inducing bcl-2 expression. *Int J Cancer*, **66**: 544-50.
FUJITA, N., KODAMA, N., KATO, Y., LEE, S. H. & TSURUO, T. (1997). Aggregation of Thy-1 glycoprotein induces thymocyte apoptosis through activation of CPP32-like proteases. *Exp Cell Res*, **232**: 400-6.
GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. 2007. *Color Textbook of Histology*, Saunders/Elsevier.
GASHAW, I., DUSHAJ, O., BEHR, R., BIERMANN, K., BREHM, R., RUBBEN, H., GROBHOLZ, R., SCHMID, K. W., BERGMANN, M. & WINTERHAGER, E. (2007). Novel germ cell markers characterize testicular seminoma and fetal testis. *Mol Hum Reprod*, **13**: 721-7.
GASKELL, T. L., ESNAL, A., ROBINSON, L. L. L., ANDERSON, R. A. & SAUNDERS, P. T. K. (2004). Immunohistochemical Profiling of Germ Cells Within the Human Fetal Testis: Identification of Three Subpopulations. *Biology of Reproduction*, **71**: 2012-2021.
GE, S. Q., LIN, S. L., ZHAO, Z. H. & SUN, Q. Y. (2017). Epigenetic dynamics and interplay during spermatogenesis and embryogenesis: implications for male fertility and offspring health. *Oncotarget*, **8**: 53804-53818.
GIEBEL, B., CORBEIL, D., BECKMANN, J., HOHN, J., FREUND, D., GIESEN, K., FISCHER, J., KOGLER, G. & WERNET, P. (2004). Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, **104**: 2332-8.

GILLIS, A. J., STOOP, H., BIERMANN, K., VAN GURP, R. J., SWARTZMAN, E., CRIBBES, S., FERLINZ, A., SHANNON, M., OOSTERHUIS, J. W. & LOOIJENGA, L. H. (2011). Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *Int J Androl,* **34**: e160-74.

GLIKI, G., EBNET, K., AURRAND-LIONS, M., IMHOF, B. A. & ADAMS, R. H. (2004). Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature,* **431**: 320-4.

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

GRISANTI, L., FALCIATORI, I., GRASSO, M., DOVERE, L., FERA, S., MUCIACCIA, B., FUSO, A., BERNO, V., BOITANI, C., STEFANINI, M. & VICINI, E. (2009). Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation. *Stem Cells,* **27**: 3043-52.

GRISWOLD, M. D. 2014. *Sertoli Cell Biology*, Elsevier Science.

GRISWOLD, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev,* **96**: 1-17.

GUERIF, F., CADORET, V., RAHAL-PEROLA, V., LANSAC, J., BERNEX, F., PANTHIER, J.-J., THÉRÈSE HOCHEREAU-DE REVIERS, M. & ROYERE, D. 2002. *Apoptosis, Onset and Maintenance of Spermatogenesis: Evidence for the Involvement of Kit in Kit-Haplodeficient Mice*.

HAKOVIRTA, H., YAN, W., KALEVA, M., ZHANG, F., VANTTINEN, K., MORRIS, P. L., SODER, M., PARVINEN, M. & TOPPARI, J. (1999). Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology,* **140**: 1492-8.

HAMADA, A., ESTEVES, S. C., NIZZA, M. & AGARWAL, A. (2012). Unexplained male infertility: diagnosis and management. *Int Braz J Urol,* **38**: 576-94.

HANSIS, C., GRIFO, J. A. & KREY, L. C. (2000). Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod,* **6**: 999-1004.

HE, Z., KOKKINAKI, M. & DYM, M. (2009). Signaling molecules and pathways regulating the fate of spermatogonial stem cells. *Microsc Res Tech,* **72**: 586-95.

HE, Z., KOKKINAKI, M., JIANG, J., DOBRINSKI, I. & DYM, M. (2010). Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod,* **82**: 363-72.

HEMMORANTA, H., SATOMAA, T., BLOMQVIST, M., HEISKANEN, A., AITIO, O., SAARINEN, J., NATUNEN, J., PARTANEN, J., LAINE, J. & JAATINEN, T. (2007). N-glycan structures and associated gene expression reflect the characteristic N-glycosylation pattern of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol,* **35**: 1279-92.

HEO, I., JOO, C., CHO, J., HA, M., HAN, J. & KIM, V. N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell,* **32**: 276-84.

HERMO, L., PELLETIER, R. M., CYR, D. G. & SMITH, C. E. (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech,* **73**: 241-78.

HESS, R. A., COOKE, P. S., HOFMANN, M. C. & MURPHY, K. M. (2006). Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle,* **5**: 1164-70.

HILSCHER, B. & ENGEMANN, A. (1992). Histological and morphometric studies on the kinetics of germ cells and immature Sertoli cells during human prespermatogenesis. *Andrologia,* **24**: 7-10.

HIRAWAT, S., BUDMAN, D. R. & KREIS, W. (2003). The androgen receptor: structure, mutations, and antiandrogens. *Cancer Invest,* **21**: 400-17.

HOFMANN, M. C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol,* **288**: 95-103.

HOFMANN, M. C., BRAYDICH-STOLLE, L. & DYM, M. (2005). Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol,* **279**: 114-24.

HUANG, E. J., NOCKA, K. H., BUCK, J. & BESMER, P. (1992). Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell,* **3**: 349-62.

HUTTNER, H. B., JANICH, P., KOHRMANN, M., JASZAI, J., SIEBZEHNRUBL, F., BLUMCKE, I., SUTTORP, M., GAHR, M., KUHNT, D., NIMSKY, C., KREX, D., SCHACKERT, G., LOWENBRUCK, K., REICHMANN, H., JUTTLER, E., HACKE, W., SCHELLINGER, P. D., SCHWAB, S., WILSCH-BRAUNINGER, M., MARZESCO, A. M. & CORBEIL, D. (2008). The stem cell marker prominin-1/CD133 on membrane particles in human cerebrospinal fluid offers novel approaches for studying central nervous system disease. *Stem Cells,* **26**: 698-705.

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

HYNES, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell,* **69**: 11-25.

IRVINE, D. S. (1998). Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod,* **13 Suppl 1**: 33-44.

IZADYAR, F., WONG, J., MAKI, C., PACCHIAROTTI, J., RAMOS, T., HOWERTON, K., YUEN, C., GREILACH, S., ZHAO, H. H., CHOW, M., CHOW, Y. C., RAO, J., BARRITT, J., BAR-CHAMA, N. & COPPERMAN, A. (2011). Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Hum Reprod,* **26**: 1296-306.

JAMIESON, R. V., ZHOU, S. X., WHEATLEY, S. C., KOOPMAN, P. & TAM, P. P. (1998). Sertoli cell differentiation and Y-chromosome activity: a developmental study of X-linked transgene activity in sex-reversed X/XSxra mouse embryos. *Dev Biol,* **199**: 235-44.

JANICH, P. & CORBEIL, D. (2007). GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett,* **581**: 1783-7.

JASZAI, J., FARGEAS, C. A., HAASE, M., FARKAS, L. M., HUTTNER, W. B. & CORBEIL, D. (2008). Robust expression of Prominin-2 all along the adult male reproductive system and urinary bladder. *Histochem Cell Biol,* **130**: 749-59.

JEZEK, D., KNUTH, U. A. & SCHULZE, W. (1998). Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum Reprod,* **13**: 1230-4.

JIANG, J., CHAN, Y. S., LOH, Y. H., CAI, J., TONG, G. Q., LIM, C. A., ROBSON, P., ZHONG, S. & NG, H. H. (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol,* **10**: 353-60.

JING, S., WEN, D., YU, Y., HOLST, P. L., LUO, Y., FANG, M., TAMIR, R., ANTONIO, L., HU, Z., CUPPLES, R., LOUIS, J. C., HU, S., ALTROCK, B. W. & FOX, G. M. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell,* **85**: 1113-24.

JOHANNISSON, R., SCHULZE, W. & HOLSTEIN, A. F. (2003). Megalospermatocytes in the human testis exhibit asynapsis of chromosomes. *Andrologia,* **35**: 146-51.

JOHNSEN, S. G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones,* **1**: 2-25.

JOSHI, K. R., RAMDEO, I. N., SACHDEV, K. N. & BHARADWAJ, T. P. (1972). Effects of vasectomy on testes. *Int Surg,* **57**: 711-3.

JUNGWIRTH, A., GIWERCMAN, A., TOURNAYE, H., DIEMER, T., KOPA, Z., DOHLE, G. & KRAUSZ, C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol,* **62**: 324-32.

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. 2005. *Basic Histology: Text & Atlas,* McGraw-Hill.

KADMON, G., VON BOHLEN UND HALBACH, F., HORSTKORTE, R., ECKERT, M., ALTEVOGT, P. & SCHACHNER, M. (1995). Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur J Neurosci,* **7**: 993-1004.

KALSI, J., THUM, M. Y., MUNEER, A., ABDULLAH, H. & MINHAS, S. (2012). In the era of micro-dissection sperm retrieval (m-TESE) is an isolated testicular biopsy necessary in the management of men with non-obstructive azoospermia? *BJU Int,* **109**: 418-24.

KANATSU-SHINOHARA, M., TOYOKUNI, S. & SHINOHARA, T. (2004). CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod,* **70**: 70-5.

KANIA, G., CORBEIL, D., FUCHS, J., TARASOV, K. V., BLYSZCZUK, P., HUTTNER, W. B., BOHELER, K. R. & WOBUS, A. M. (2005). Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells,* **23**: 791-804.

KARBANOVA, J., MISSOL-KOLKA, E., FONSECA, A. V., LORRA, C., JANICH, P., HOLLEROVA, H., JASZAI, J., EHRMANN, J., KOLAR, Z., LIEBERS, C., ARL, S., SUBRTOVA, D., FREUND, D., MOKRY, J., HUTTNER, W. B. & CORBEIL, D. (2008). The stem cell marker CD133 (Prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia. *J Histochem Cytochem,* **56**: 977-93.

KAUFMAN, D. S., HANSON, E. T., LEWIS, R. L., AUERBACH, R. & THOMSON, J. A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98**: 10716-21.

KHAN, M., AKHTAR, S., MOHSIN, S., S, N. K. & RIAZUDDIN, S. (2011). Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev,* **20**: 67-75.

KIERSZENBAUM, A. L. (2006). Cell-cycle regulation and mammalian gametogenesis: a lesson from the unexpected. *Mol Reprod Dev,* **73**: 939-42.

KIM, B. J., LEE, Y. A., KIM, K. J., KIM, Y. H., JUNG, M. S., HA, S. J., KANG, H. G., JUNG, S. E., KIM, B. G., CHOI, Y. R., DO, J. T. & RYU, B. Y. (2015). Effects of paracrine factors on CD24 expression and neural differentiation of male germline stem cells. *Int J Mol Med,* **36**: 255-62.

KIM, E. D., GREER, J. A., ABRAMS, J. & LIPSHULTZ, L. I. (1996). Testicular touch preparation cytology. *J Urol,* **156**: 1412-4.

KIRCHHOFF, C. (1999). Gene expression in the epididymis. *Int Rev Cytol,* **188**: 133-202.

KIRSCHNER, N., POETZL, C., VON DEN DRIESCH, P., WLADYKOWSKI, E., MOLL, I., BEHNE, M. J. & BRANDNER, J. M. (2009). Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol,* **175**: 1095-106.

KLEENE, R., YANG, H., KUTSCHE, M. & SCHACHNER, M. (2001). The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem,* **276**: 21656-63.

KOH, E., MAEDA, Y., CHOI, J. & NAMIKI, M. (2006). [Sertoli cell-only syndrome]. *Nihon Rinsho,* **Suppl 2**: 241-4.

KOKKINAKI, M., LEE, T. L., HE, Z., JIANG, J., GOLESTANEH, N., HOFMANN, M. C., CHAN, W. Y. & DYM, M. (2009). The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod*, **80**: 707-17.

KOSODO, Y., ROPER, K., HAUBENSAK, W., MARZESCO, A. M., CORBEIL, D. & HUTTNER, W. B. (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *Embo j*, **23**: 2314-24.

KOSSACK, N., MENESES, J., SHEFI, S., NGUYEN, H. N., CHAVEZ, S., NICHOLAS, C., GROMOLL, J., TUREK, P. J. & REIJO-PERA, R. A. (2009). Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells*, **27**: 138-49.

KOSTEREVA, N. & HOFMANN, M. C. (2008). Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reprod Domest Anim*, **43 Suppl 2**: 386-92.

KOULISCHER, L. & SCHOYSMAN, R. (1974). Chromosomes and human infertility. I. Mitotic and meiotic chromosome studies in 202 consecutive male patients. *Clin Genet*, **5**: 116-26.

KRISTIANSEN, G., SAMMAR, M. & ALTEVOGT, P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*, **35**: 255-62.

KRUGER, S., SOTLAR, K., KAUSCH, I. & HORNY, H. P. (2005). Expression of KIT (CD117) in renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Oncology*, **68**: 269-75.

KUBOTA, H., AVARBOCK, M. R. & BRINSTER, R. L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 16489-94.

LACHAM-KAPLAN, O. (2004). In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. *Reproduction*, **128**: 147-52.

LATHIA, J. D., HITOMI, M., GALLAGHER, J., GADANI, S. P., ADKINS, J., VASANJI, A., LIU, L., EYLER, C. E., HEDDLESTON, J. M., WU, Q., MINHAS, S., SOEDA, A., HOEPPNER, D. J., RAVIN, R., MCKAY, R. D., MCLENDON, R. E., CORBEIL, D., CHENN, A., HJELMELAND, A. B., PARK, D. M. & RICH, J. N. (2011). Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis*, **2**: e200.

LEVENBERG, S., GOLUB, J. S., AMIT, M., ITSKOVITZ-ELDOR, J. & LANGER, R. (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 4391-6.

LEYTON, L., SCHNEIDER, P., LABRA, C. V., RUEGG, C., HETZ, C. A., QUEST, A. F. & BRON, C. (2001). Thy-1 binds to integrin beta(3) on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Curr Biol*, **11**: 1028-38.

LI, L., GAO, Y., CHEN, H., JESUS, T., TANG, E., LI, N., LIAN, Q., GE, R. S. & CHENG, C. Y. (2017). Cell polarity, cell adhesion, and spermatogenesis: role of cytoskeletons. *F1000Res*, **6**: 1565.

LI, M. W., XIA, W., MRUK, D. D., WANG, C. Q., YAN, H. H., SIU, M. K., LUI, W. Y., LEE, W. M. & CHENG, C. Y. (2006). Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J Endocrinol*, **190**: 313-29.

LI, X. Y., LIU, Y. J., HOU, L. L., WANG, K. G., GUAN, W. J. & MA, Y. H. (2011). [Regulatory effect of GDNF on the proliferation and differentiation of mammalian spermatogonial stem cells]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, **17**: 628-33.

LI, Z., ZHENG, Z., RUAN, J., LI, Z., ZHUANG, X. & TZENG, C. M. (2016). Integrated analysis miRNA and mRNA profiling in patients with severe oligozoospermia reveals miR-34c-3p downregulates PLCXD3 expression. *Oncotarget*, **7**: 52781-52796.

LIM, J. J., SUNG, S. Y., KIM, H. J., SONG, S. H., HONG, J. Y., YOON, T. K., KIM, J. K., KIM, K. S. & LEE, D. R. (2010). Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions. *Cell Prolif*, **43**: 405-17.

LIM, S. C. & OH, S. H. (2005). The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract*, **201**: 479-86.

LING, F., KANG, B. & SUN, X. H. (2014). Id proteins: small molecules, mighty regulators. *Curr Top Dev Biol*, **110**: 189-216.

LIU, F., AKIYAMA, Y., TAI, S., MARUYAMA, K., KAWAGUCHI, Y., MURAMATSU, K. & YAMAGUCHI, K. (2008a). Changes in the expression of CD106, osteogenic genes, and transcription factors involved in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Metab*, **26**: 312-20.

LIU, Y. W., SURKA, M. C., SCHROETER, T., LUKIYANCHUK, V. & SCHMID, S. L. (2008b). Isoform and splice-variant specific functions of dynamin-2 revealed by analysis of conditional knock-out cells. *Mol Biol Cell*, **19**: 5347-59.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**: 402-8.

LUETJENS, C. M., XU, E. Y., REJO PERA, R. A., KAMISCHKE, A., NIESCHLAG, E. & GROMOLL, J. (2004). Association of meiotic arrest with lack of BOULE protein expression in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**: 1926-33.

MAEDA, Y., TSUJI, K., NIFUJI, A. & NODA, M. (2004). Inhibitory helix-loop-helix transcription factors Id1/Id3 promote bone formation in vivo. *J Cell Biochem*, **93**: 337-44.

MAJUMDAR, S. S., SARDA, K., BHATTACHARYA, I. & PLANT, T. M. (2012). Insufficient androgen and FSH signaling may be responsible for the azoospermia of the infantile primate testes despite exposure to an adult-like hormonal milieu. *Human Reproduction,* **27**: 2515-2525.

MARTIN, R. H. (2008). Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update,* **14**: 379-90.

MARTINEZ-SEARA, H., ROG, T., PASENKIEWICZ-GIERULA, M., VATTULAINEN, I., KARTTUNEN, M. & REIGADA, R. (2008). Interplay of unsaturated phospholipids and cholesterol in membranes: effect of the double-bond position. *Biophys J,* **95**: 3295-305.

MARZESCO, A. M., JANICH, P., WILSCH-BRAUNINGER, M., DUBREUIL, V., LANGENFELD, K., CORBEIL, D. & HUTTNER, W. B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci,* **118**: 2849-58.

MASSAGUE, J., BLAIN, S. W. & LO, R. S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell,* **103**: 295-309.

MATHUR, P., FRANCISPILLAI, M., SELVARAJU, V. & AGARWAL, A. 2011. *NF-κ B in Male Reproduction: A Boon or a Bane?*

MAUDUIT, C., HAMAMAH, S. & BENAHMED, M. (1999). Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update,* **5**: 535-45.

MAW, M. A., CORBEIL, D., KOCH, J., HELLWIG, A., WILSON-WHEELER, J. C., BRIDGES, R. J., KUMARAMANICKAVEL, G., JOHN, S., NANCARROW, D., ROPER, K., WEIGMANN, A., HUTTNER, W. B. & DENTON, M. J. (2000). A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum Mol Genet,* **9**: 27-34.

MCDOUGAL, W. S., WEIN, A. J., KAVOUSSI, L. R., NOVICK, A. C., PARTIN, A. W., PETERS, C. A. & RAMCHANDANI, P. 2011. *Campbell-Walsh Urology 10th Edition Review E-Book*, Elsevier Health Sciences.

MCLACHLAN, R. I., MALLIDIS, C., MA, K., BHASIN, S. & KRETSER, D. M. D. (1998). Genetic disorders and spermatogenesis. *Reproduction, Fertility and Development,* **10**: 97-104.

MCLACHLAN, R. I. & O'BRYAN, M. K. (2010). Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab,* **95**: 1013-24.

MELTON, C., JUDSON, R. L. & BLELLOCH, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature,* **463**: 621-6.

MENG, J., HOLDCRAFT, R. W., SHIMA, J. E., GRISWOLD, M. D. & BRAUN, R. E. (2005). Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **102**: 16696-700.

MENG, X., LINDAHL, M., HYVONEN, M. E., PARVINEN, M., DE ROOIJ, D. G., HESS, M. W., RAATIKAINEN-AHOKAS, A., SAINIO, K., RAUVALA, H., LAKSO, M., PICHEL, J. G., WESTPHAL, H., SAARMA, M. & SARIOLA, H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science,* **287**: 1489-93.

MERCIER, B., VERLINGUE, C., LISSENS, W., SILBER, S. J., NOVELLI, G., BONDUELLE, M., AUDREZET, M. P. & FEREC, C. (1995). Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet,* **56**: 272-7.

MI, Y., ZHANG, C., XIE, M. & ZENG, W. (2004). Effects of follicle-stimulating hormone and androgen on proliferation of cultured testicular germ cells of embryonic chickens. *Gen Comp Endocrinol,* **138**: 237-46.

MIRAGLIA, S., GODFREY, W., YIN, A. H., ATKINS, K., WARNKE, R., HOLDEN, J. T., BRAY, R. A., WALLER, E. K. & BUCK, D. W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood,* **90**: 5013-21.

MITCHELL, V., STEGER, K., MARCHETTI, C., HERBAUT, J. C., DEVOS, P. & RIGOT, J. M. (2005). Cellular expression of protamine 1 and 2 transcripts in testicular spermatids from azoospermic men submitted to TESE-ICSI. *Mol Hum Reprod,* **11**: 373-9.

MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N. 1998. *The developing human: clinically oriented embryology*, Saunders.

MOSLEY, K., COLLAR, J. & CATTELL, V. (2000). Mesangial cell necrosis in Thy 1 glomerulonephritis--an ultrastructural study. *Virchows Arch,* **436**: 567-73.

MOSS, E. G., LEE, R. C. & AMBROS, V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell,* **88**: 637-46.

MOSS, E. G. & TANG, L. (2003). Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev Biol,* **258**: 432-42.

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. *Endocr Rev,* **25**: 747-806.

MRUK, D. D. & CHENG, C. Y. (2015). The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev,* **36**: 564-91.

MUCIACCIA, B., SETTE, C., PARONETTO, M. P., BARCHI, M., PENSINI, S., D'AGOSTINO, A., GANDINI, L., GEREMIA, R., STEFANINI, M. & ROSSI, P. (2010). Expression of a truncated form of KIT tyrosine kinase in human spermatozoa correlates with sperm DNA integrity. *Hum Reprod,* **25**: 2188-202.

NAGVENKAR, P., DESAI, K., HINDUJA, I. & ZAVERI, K. (2005). Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia & non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res,* **122**: 34-42.
NAKASHIMA, K., TAKIZAWA, T., OCHIAI, W., YANAGISAWA, M., HISATSUNE, T., NAKAFUKU, M., MIYAZONO, K., KISHIMOTO, T., KAGEYAMA, R. & TAGA, T. (2001). BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98**: 5868-73.
NAKATA, T., IWAMOTO, A., NODA, Y., TAKEMURA, R., YOSHIKURA, H. & HIROKAWA, N. (1991). Predominant and developmentally regulated expression of dynamin in neurons. *Neuron,* **7**: 461-9.
NAUGHTON, C. K., JAIN, S., STRICKLAND, A. M., GUPTA, A. & MILBRANDT, J. (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod,* **74**: 314-21.
NIEDERBERGER, C., AGULNIK, A. I., CHO, Y., LAMB, D. & BISHOP, C. E. (1997). In situ hybridization shows that Dazla expression in mouse testis is restricted to premeiotic stages IV-VI of spermatogenesis. *Mamm Genome,* **8**: 277-8.
NISHIKAWA, S., KUSAKABE, M., YOSHINAGA, K., OGAWA, M., HAYASHI, S., KUNISADA, T., ERA, T., SAKAKURA, T. & NISHIKAWA, S. (1991). In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *Embo j,* **10**: 2111-8.
NIXON, B., BIELANOWICZ, A., MCLAUGHLIN, E. A., TANPHAICHITR, N., ENSSLIN, M. A. & AITKEN, R. J. (2009). Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J Cell Physiol,* **218**: 122-34.
NIXON, B., MITCHELL, L. A., ANDERSON, A. L., MCLAUGHLIN, E. A., O'BRYAN M, K. & AITKEN, R. J. (2011). Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes. *J Cell Physiol,* **226**: 2651-65.
NORTON, J. D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci,* **113 (Pt 22)**: 3897-905.
O'DONNELL, L., NICHOLLS, P. K., O'BRYAN, M. K., MCLACHLAN, R. I. & STANTON, P. G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis,* **1**: 14-35.
OATLEY, J. M., AVARBOCK, M. R. & BRINSTER, R. L. (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem,* **282**: 25842-51.
OATLEY, J. M., AVARBOCK, M. R., TELARANTA, A. I., FEARON, D. T. & BRINSTER, R. L. (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **103**: 9524-9.
OATLEY, J. M. & GRISWOLD, M. D. 2017. *The Biology of Mammalian Spermatogonia,* Springer New York.
OATLEY, M. J., RACICOT, K. E. & OATLEY, J. M. (2011). Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biol Reprod,* **84**: 639-45.
PARKS, J. E., LEE, D. R., HUANG, S. & KAPROTH, M. T. (2003). Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology,* **59**: 73-86.
PAVLOVICH, C. P., KING, P., GOLDSTEIN, M. & SCHLEGEL, P. N. (2001). Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *J Urol,* **165**: 837-41.
PEI, Z., ZHU, G., HUO, X., GAO, L., LIAO, S., HE, J., LONG, Y., YI, H., XIAO, S., YI, W., CHEN, P., LI, X., LI, G. & ZHOU, Y. (2016). CD24 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of cervical cancer cells in vitro. *Oncol Rep,* **35**: 1593-601.
PENG, S., CHEN, L. L., LEI, X. X., YANG, L., LIN, H., CARMICHAEL, G. G. & HUANG, Y. (2011). Genome-wide studies reveal that Lin28 enhances the translation of genes important for growth and survival of human embryonic stem cells. *Stem Cells,* **29**: 496-504.
PEREZ-CRESPO, M., PINTADO, B. & GUTIERREZ-ADAN, A. (2008). Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev,* **75**: 40-7.
PESCE, M., ANASTASSIADIS, K. & SCHOLER, H. R. (1999). Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs,* **165**: 144-52.
PESCHKA, B., LEYGRAAF, J., VAN DER VEN, K., MONTAG, M., SCHARTMANN, B., SCHUBERT, R., VAN DER VEN, H. & SCHWANITZ, G. (1999). Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod,* **14**: 2257-63.
PETRUSZ, P., JEYARAJ, D. A. & GROSSMAN, G. (2005). Microarray analysis of androgen-regulated gene expression in testis: the use of the androgen-binding protein (ABP)-transgenic mouse as a model. *Reprod Biol Endocrinol,* **3**: 70.
PHILLIPS, B. T., GASSEI, K. & ORWIG, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* **365**: 1663-78.
PHILO, J. S., WEN, J., WYPYCH, J., SCHWARTZ, M. G., MENDIAZ, E. A. & LANGLEY, K. E. (1996). Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor, Kit. *J Biol Chem,* **271**: 6895-902.
PIKE, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res,* **47**: 1597-8.

PLESHKAN, V. V., VINOGRADOVA, T. V. & SVERDLOV, E. D. (2008). Methylation of the prominin 1 TATA-less main promoters and tissue specificity of their transcript content. *Biochim Biophys Acta,* **1779**: 599-605.

PLOTTON, I., SANCHEZ, P., DURAND, P. & LEJEUNE, H. (2006). Decrease of both stem cell factor and clusterin mRNA levels in testicular biopsies of azoospermic patients with constitutive or idiopathic but not acquired spermatogenic failure. *Hum Reprod,* **21**: 2340-5.

POONGOTHAI, J., GOPENATH, T. S. & MANONAYAKI, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Med J,* **50**: 336-47.

PRINT, C. G., LOVELAND, K. L., GIBSON, L., MEEHAN, T., STYLIANOU, A., WREFORD, N., DE KRETSER, D., METCALF, D., KONTGEN, F., ADAMS, J. M. & CORY, S. (1998). Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **95**: 12424-31.

QIU, C., MA, Y., WANG, J., PENG, S. & HUANG, Y. (2010). Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res,* **38**: 1240-8.

RAJPERT-DE MEYTS, E., HANSTEIN, R., JORGENSEN, N., GRAEM, N., VOGT, P. H. & SKAKKEBAEK, N. E. (2004). Developmental expression of POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod,* **19**: 1338-44.

REDGROVE, K. A., BERNSTEIN, I. R., PYE, V. J., MIHALAS, B. P., SUTHERLAND, J. M., NIXON, B., MCCLUSKEY, A., ROBINSON, P. J., HOLT, J. E. & MCLAUGHLIN, E. A. (2016). Dynamin 2 is essential for mammalian spermatogenesis. *Sci Rep,* **6**: 35084.

REGE, T. A. & HAGOOD, J. S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *Faseb j,* **20**: 1045-54.

REIF, A. E. & ALLEN, J. M. (1964). IMMUNOLOGICAL DISTINCTION OF AKR THYMOCYTES. *Nature,* **203**: 886-7.

REUBINOFF, B. E., PERA, M. F., FONG, C. Y., TROUNSON, A. & BONGSO, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol,* **18**: 399-404.

RIBOLDI, M., RUBIO, C., PELLICER, A., GIL-SALOM, M. & SIMON, C. (2012). In vitro production of haploid cells after coculture of CD49f+ with Sertoli cells from testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermic patients. *Fertil Steril,* **98**: 580-590.e4.

RICHARDS, J. S., RUSSELL, D. L., OCHSNER, S., HSIEH, M., DOYLE, K. H., FALENDER, A. E., LO, Y. K. & SHARMA, S. C. (2002). Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res,* **57**: 195-220.

RONNSTRAND, L. (2004). Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci,* **61**: 2535-48.

ROPER, K., CORBEIL, D. & HUTTNER, W. B. (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol,* **2**: 582-92.

ROSS, M. H. & PAWLINA, W. 2006. *Histology,* Lippincott Williams & Wilkins.

ROSSI, P., SETTE, C., DOLCI, S. & GEREMIA, R. (2000). Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest,* **23**: 609-15.

ROTHSCHILD, G., SOTTAS, C. M., KISSEL, H., AGOSTI, V., MANOVA, K., HARDY, M. P. & BESMER, P. (2003). A role for kit receptor signaling in Leydig cell steroidogenesis. *Biol Reprod,* **69**: 925-32.

RUWANPURA, S. M., MCLACHLAN, R. I., MATTHIESSON, K. L. & MEACHEM, S. J. (2008). Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod,* **23**: 403-11.

SÁ, R., MIRANDA, C., CARVALHO, F., BARROS, A. & SOUSA, M. (2013). Expression of stem cell markers: OCT4, KIT, ITGA6, and ITGB1 in the male germinal epithelium. *Systems Biology in Reproductive Medicine,* **59**: 233-243.

SABLITZKY, F., MOORE, A., BROMLEY, M., DEED, R. W., NEWTON, J. S. & NORTON, J. D. (1998). Stage- and subcellular-specific expression of Id proteins in male germ and Sertoli cells implicates distinctive regulatory roles for Id proteins during meiosis, spermatogenesis, and Sertoli cell function. *Cell Growth Differ,* **9**: 1015-24.

SANDLOW, J. I., FENG, H. L., COHEN, M. B. & SANDRA, A. (1996). Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J Androl,* **17**: 403-8.

SATO, T., YOKONISHI, T., KOMEYA, M., KATAGIRI, K., KUBOTA, Y., MATOBA, S., OGONUKI, N., OGURA, A., YOSHIDA, S. & OGAWA, T. (2012). Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **109**: 16934-8.

SATO, Y., YOSHIDA, K., SHINKA, T., NOZAWA, S., NAKAHORI, Y. & IWAMOTO, T. (2006). Altered expression pattern of heat shock transcription factor, Y chromosome (HSFY) may be related to altered differentiation of spermatogenic cells in testes with deteriorated spermatogenesis. *Fertil Steril,* **86**: 612-8.

SCHIFF, J. D., PALERMO, G. D., VEECK, L. L., GOLDSTEIN, M., ROSENWAKS, Z. & SCHLEGEL, P. N. (2005). Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab,* **90**: 6263-7.

SCIURANO, R. B., LUNA HISANO, C. V., RAHN, M. I., BRUGO OLMEDO, S., REY VALZACCHI, G., COCO, R. & SOLARI, A. J. (2009). Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients. *Hum Reprod,* **24**: 2353-60.

SGAMBATO, A., PUGLISI, M. A., ERRICO, F., RAFANELLI, F., BONINSEGNA, A., RETTINO, A., GENOVESE, G., COCO, C., GASBARRINI, A. & CITTADINI, A. (2010). Post-translational modulation of CD133 expression during sodium butyrate-induced differentiation of HT29 human colon cancer cells: implications for its detection. *J Cell Physiol,* **224**: 234-41.

SHAMBLOTT, M. J., AXELMAN, J., LITTLEFIELD, J. W., BLUMENTHAL, P. D., HUGGINS, G. R., CUI, Y., CHENG, L. & GEARHART, J. D. (2001). Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98**: 113-8.

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

SHETTY, G. & MEISTRICH, M. L. (2007). The missing niche for spermatogonial stem cells: do blood vessels point the way? *Cell Stem Cell,* **1**: 361-3.

SHIMIZU, Y., ROSE, D. M. & GINSBERG, M. H. (1999). Integrins in the immune system. *Adv Immunol,* **72**: 325-80.

SHINOHARA, T., ORWIG, K. E., AVARBOCK, M. R. & BRINSTER, R. L. (2000). Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **97**: 8346-51.

SHMELKOV, S. V., JUN, L., ST CLAIR, R., MCGARRIGLE, D., DERDERIAN, C. A., USENKO, J. K., COSTA, C., ZHANG, F., GUO, X. & RAFII, S. (2004). Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood,* **103**: 2055-61.

SIMON, L., EKMAN, G. C., KOSTEREVA, N., ZHANG, Z., HESS, R. A., HOFMANN, M. C. & COOKE, P. S. (2009). Direct transdifferentiation of stem/progenitor spermatogonia into reproductive and nonreproductive tissues of all germ layers. *Stem Cells,* **27**: 1666-75.

SIMONS, K. & IKONEN, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature,* **387**: 569-72.

SIMONS, K. & TOOMRE, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol,* **1**: 31-9.

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

SINGH, D., PADUCH, D. A., SCHLEGEL, P. N., ORWIG, K. E., MIELNIK, A., BOLYAKOV, A. & WRIGHT, W. W. (2017). The production of glial cell line-derived neurotrophic factor by human sertoli cells is substantially reduced in sertoli cell-only testes. *Hum Reprod,* **32**: 1108-1117.

SINHA HIKIM, A. P., LUE, Y., DIAZ-ROMERO, M., YEN, P. H., WANG, C. & SWERDLOFF, R. S. (2003). Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol,* **85**: 175-82.

SLEIGHT, S. B., MIRANDA, P. V., PLASKETT, N. W., MAIER, B., LYSIAK, J., SCRABLE, H., HERR, J. C. & VISCONTI, P. E. (2005). Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod,* **73**: 721-9.

SOKOL, R. Z. (2009). Endocrinology of male infertility: evaluation and treatment. *Semin Reprod Med,* **27**: 149-58.

STEENKEN, S. (1989). Structure, acid/base properties and transformation reactions of purine radicals. *Free Radic Res Commun,* **6**: 117-20.

STEGER, K., ALEITHE, I., BEHRE, H. & BERGMANN, M. (1998). The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod,* **4**: 227-33.

STEGER, K., FAILING, K., KLONISCH, T., BEHRE, H. M., MANNING, M., WEIDNER, W., HERTLE, L., BERGMANN, M. & KLIESCH, S. (2001). Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA. *Hum Reprod,* **16**: 709-16.

SU, L. M., PALERMO, G. D., GOLDSTEIN, M., VEECK, L. L., ROSENWAKS, Z. & SCHLEGEL, P. N. (1999). Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. *J Urol,* **161**: 112-6.

SUN, J., PEDERSEN, M. & RONNSTRAND, L. (2008). Gab2 is involved in differential phosphoinositide 3-kinase signaling by two splice forms of c-Kit. *J Biol Chem,* **283**: 27444-51.

SUTOVSKY, P. & SCHATTEN, G. (2000). Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol,* **195**: 1-65.

TAIEB, N., MARESCA, M., GUO, X. J., GARMY, N., FANTINI, J. & YAHI, N. (2009). The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. *Cancer Lett,* **278**: 164-73.

TAKADA, Y., YE, X. & SIMON, S. (2007). The integrins. *Genome Biol,* **8**: 215.

TAKEDA, J., SEINO, S. & BELL, G. I. (1992). Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res,* **20**: 4613-20.

TAN, Y., ZHAO, M., XIANG, B., CHANG, C. & LU, Q. (2016). CD24: from a Hematopoietic Differentiation Antigen to a Genetic Risk Factor for Multiple Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol,* **50**: 70-83.

TAPANAINEN, J. S., AITTOMAKI, K., MIN, J., VASKIVUO, T. & HUHTANIEMI, I. T. (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**: 205-6.

TEGELENBOSCH, R. A. & DE ROOIJ, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res,* **290**: 193-200.

TELETIN, M., VERNET, N., GHYSELINCK, N. B. & MARK, M. (2017). Roles of Retinoic Acid in Germ Cell Differentiation. *Curr Top Dev Biol,* **125**: 191-225.

TERRIBAS, E., BONACHE, S., GARCIA-AREVALO, M., SANCHEZ, J., FRANCO, E., BASSAS, L. & LARRIBA, S. (2010). Changes in the expression profile of the meiosis-involved mismatch repair genes in impaired human spermatogenesis. *J Androl,* **31**: 346-57.

THORNTON, J. E. & GREGORY, R. I. (2012). How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends Cell Biol,* **22**: 474-82.

TOMIOKA, I., MAEDA, T., SHIMADA, H., KAWAI, K., OKADA, Y., IGARASHI, H., OIWA, R., IWASAKI, T., AOKI, M., KIMURA, T., SHIOZAWA, S., SHINOHARA, H., SUEMIZU, H., SASAKI, E. & OKANO, H. (2010). Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (Callithrix jacchus) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. *Genes Cells,* **15**: 959-69.

TRAVING, C. & SCHAUER, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci,* **54**: 1330-49.

TREANOR, J. J., GOODMAN, L., DE SAUVAGE, F., STONE, D. M., POULSEN, K. T., BECK, C. D., GRAY, C., ARMANINI, M. P., POLLOCK, R. A., HEFTI, F., PHILLIPS, H. S., GODDARD, A., MOORE, M. W., BUJ-BELLO, A., DAVIES, A. M., ASAI, N., TAKAHASHI, M., VANDLEN, R., HENDERSON, C. E. & ROSENTHAL, A. (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature,* **382**: 80-3.

TSAI-MORRIS, C. H., SHENG, Y., LEE, E., LEI, K. J. & DUFAU, M. L. (2004). Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/Ddx25) is essential for spermatid development and completion of spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **101**: 6373-8.

TUREK, P. J., KIM, M., GILBAUGH, J. H., 3RD & LIPSHULTZ, L. I. (1995). The clinical characteristics of 82 patients with Sertoli cell-only testis histology. *Fertil Steril,* **64**: 1197-200.

TYAGI, G., CARNES, K., MORROW, C., KOSTEREVA, N. V., EKMAN, G. C., MELING, D. D., HOSTETLER, C., GRISWOLD, M., MURPHY, K. M., HESS, R. A., HOFMANN, M. C. & COOKE, P. S. (2009). Loss of Etv5 decreases proliferation and RET levels in neonatal mouse testicular germ cells and causes an abnormal first wave of spermatogenesis. *Biol Reprod,* **81**: 258-66.

UNNI, S. K., MODI, D. N., PATHAK, S. G., DHABALIA, J. V. & BHARTIYA, D. (2009). Stage-specific Localization and Expression of c-kit in the Adult Human Testis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry,* **57**: 861-869.

URNER, F. & SAKKAS, D. (2003). Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction,* **125**: 17-26.

VAN DAM, E. M. & STOORVOGEL, W. (2002). Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell,* **13**: 169-82.

VAN DEN AKKER, E., LUTGERINK, J. T., LAFLEUR, M. V., JOENJE, H. & RETEL, J. (1994). The formation of one-G deletions as a consequence of single-oxygen-induced DNA damage. *Mutat Res,* **309**: 45-52.

VAN SAEN, D., PINO SANCHEZ, J., FERSTER, A., VAN DER WERFF TEN BOSCH, J., TOURNAYE, H. & GOOSSENS, E. (2015). Is the protein expression window during testicular development affected in patients at risk for stem cell loss? *Hum Reprod,* **30**: 2859-70.

VIRTANEN, I., LOHI, J., TANI, T., KORHONEN, M., BURGESON, R. E., LEHTO, V. P. & LEIVO, I. (1997). Distinct changes in the laminin composition of basement membranes in human seminiferous tubules during development and degeneration. *Am J Pathol,* **150**: 1421-31.

VON ECKARDSTEIN, S., SIMONI, M., BERGMANN, M., WEINBAUER, G. F., GASSNER, P., SCHEPERS, A. G. & NIESCHLAG, E. (1999). Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating 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.

WANG, B. & BRAND-MILLER, J. (2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal Of Clinical Nutrition,* **57**: 1351.

WARREN, L., MANOS, P. D., AHFELDT, T., LOH, Y. H., LI, H., LAU, F., EBINA, W., MANDAL, P. K., SMITH, Z. D., MEISSNER, A., DALEY, G. Q., BRACK, A. S., COLLINS, J. J., COWAN, C., SCHLAEGER, T. M. & ROSSI, D. J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell,* **7**: 618-30.

WEIGMANN, A., CORBEIL, D., HELLWIG, A. & HUTTNER, W. B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **94**: 12425-30.

WEIN, A. J., KAVOUSSI, L. R., PARTIN, A. W. & PETERS, C. A. 2015. *Campbell-Walsh Urology E-Book*, Elsevier Health Sciences.

WERLER, S., DEMOND, H., DAMM, O. S., EHMCKE, J., MIDDENDORFF, R., GROMOLL, J. & WISTUBA, J. (2014). Germ cell loss is associated with fading Lin28a expression in a mouse model for Klinefelter's syndrome. *Reproduction,* **147**: 253-64.

WEST, J. A., VISWANATHAN, S. R., YABUUCHI, A., CUNNIFF, K., TAKEUCHI, A., PARK, I. H., SERO, J. E., ZHU, H., PEREZ-ATAYDE, A., FRAZIER, A. L., SURANI, M. A. & DALEY, G. Q. (2009). A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature,* **460**: 909-13.

WILHELM, D., MARTINSON, F., BRADFORD, S., WILSON, M. J., COMBES, A. N., BEVERDAM, A., BOWLES, J., MIZUSAKI, H. & KOOPMAN, P. (2005). Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol,* **287**: 111-24.

WU, L. & BELASCO, J. G. (2005). Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol,* **25**: 9198-208.

YAN, W., LINDERBORG, J., SUOMINEN, J. & TOPPARI, J. (1999). Stage-specific regulation of stem cell factor gene expression in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology,* **140**: 1499-504.

YAN, W., SUOMINEN, J., SAMSON, M., JEGOU, B. & TOPPARI, J. (2000a). Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol,* **165**: 115-29.

YAN, W., SUOMINEN, J. & TOPPARI, J. (2000b). Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J Cell Sci,* **113 (Pt 1)**: 161-8.

YARDEN, Y., KUANG, W. J., YANG-FENG, T., COUSSENS, L., MUNEMITSU, S., DULL, T. J., CHEN, E., SCHLESSINGER, J., FRANCKE, U. & ULLRICH, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo j,* **6**: 3341-51.

YEOM, Y. I., FUHRMANN, G., OVITT, C. E., BREHM, A., OHBO, K., GROSS, M., HUBNER, K. & SCHOLER, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development,* **122**: 881-94.

YI, J. M., TSAI, H. C., GLOCKNER, S. C., LIN, S., OHM, J. E., EASWARAN, H., JAMES, C. D., COSTELLO, J. F., RIGGINS, G., EBERHART, C. G., LATERRA, J., VESCOVI, A. L., AHUJA, N., HERMAN, J. G., SCHUEBEL, K. E. & BAYLIN, S. B. (2008). Abnormal DNA methylation of CD133 in colorectal and glioblastoma tumors. *Cancer Res,* **68**: 8094-103.

YIN, A. H., MIRAGLIA, S., ZANJANI, E. D., ALMEIDA-PORADA, G., OGAWA, M., LEARY, A. G., OLWEUS, J., KEARNEY, J. & BUCK, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood,* **90**: 5002-12.

YING, Y., QI, X. & ZHAO, G. Q. (2001). Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98**: 7858-62.

YOMOGIDA, K., YAGURA, Y., TADOKORO, Y. & NISHIMUNE, Y. (2003). Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol Reprod,* **69**: 1303-7.

YU, J., VODYANIK, M. A., SMUGA-OTTO, K., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., FRANE, J. L., TIAN, S., NIE, J., JONSDOTTIR, G. A., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, II & THOMSON, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science,* **318**: 1917-20.

YU, Y., FLINT, A., DVORIN, E. L. & BISCHOFF, J. (2002). AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem,* **277**: 20711-6.

YUZAWA, S., OPATOWSKY, Y., ZHANG, Z., MANDIYAN, V., LAX, I. & SCHLESSINGER, J. (2007). Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell,* **130**: 323-34.

ZHENG, K., WU, X., KAESTNER, K. H. & WANG, P. J. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev Biol,* **9**: 38.

ZHENG, Y., PHILLIPS, L. J., HARTMAN, R., AN, J. & DANN, C. T. (2016). Ectopic POU5F1 in the male germ lineage disrupts differentiation and spermatogenesis in mice. *Reproduction,* **152**: 363-77.

ZHOU, F., CUI, C., GE, Y., CHEN, H., LI, Q., YANG, Z., WU, G., SUN, S., CHEN, K., GU, J., JIANG, J. & WEI, Y. (2010). Alpha2,3-Sialylation regulates the stability of stem cell marker CD133. *J Biochem,* **148**: 273-80.

ZHOU, W., ANDERSON, A. L., TURNER, A. P., DE IULIIS, G. N., MCCLUSKEY, A., MCLAUGHLIN, E. A. & NIXON, B. (2017). Characterization of a novel role for the dynamin mechanoenzymes in the regulation of human sperm acrosomal exocytosis. *Mol Hum Reprod,* **23**: 657-673.

EKLER

Ek-1- Etik Kurul Onay Belgesi

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Spermatogenez rol oynayan hücresel moleküler mekanizmaların araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhıye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.O.Sena AYDOS			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Araştırması			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ASLI GİBİDİR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Spermatogenez rol oynayan hücresel moleküler mekanizmaların araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:02-80-16**	**Tarih: 25 Ocak 2016**
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyasına ait: İntegrin gen paneli (88 gen) ve yüzey belirteç gen paneline (88 gen) ilave olarak kök hücre panelinde bulunan 88 genin ifadesine bakılacağı hakkında alınan 19.01.2016 tarihli protokol değişikliği incelenerek toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile uygun bulunmuştur.	

	KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof.Dr Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Süha YAĞCIOĞLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Mühübe SUTAY	İşletme	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

02 Şubat 2016
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

E-Posta Adresi	:	yyukselten@gmail.com
Telefon (İş)	:	5958050-8052
Telefon (Cep)	:	
Faks	:	
Adres	:	ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAK. TIBBİ BİYOLOJİ AD

Öğrenim Durumu

Doktora 2012	ANKARA ÜNİVERSİTESİ ANKARA TIP FAKÜLTESİ/ANKARA TIP PR. Tez adı: Spermatogenez Sürecinde etkin Hücresel Moleküler Biyobelirteçler Tez Danışmanı: (OYA SENA AYDOS)
Yüksek Lisans 2010-2012	HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ/BİYOKİMYA ANABİLİM DALI Tez adı: Isırgan otu (urtica dioca l.) ve ısırgan tohumunun (fructus urtica pilulifera) ekstraklarının hücre kültürü ortamından genotoksisite ve oksidatif durum üzerine etkilerinin araştırılması (2012) Tez Danışmanı:(ABDURRAHİM KOÇYİĞİT)
Lisans 2003-2007	AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ/KİMYA BÖLÜMÜ/KİMYA PR.

Görevler

ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ 2011	ANKARA ÜNİVERSİTESİ/TIP FAKÜLTESİ/TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ/TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)
ÖĞRETİM GÖREVLİSİ 2010	MARDİN ARTUKLU ÜNİVERSİTESİ/SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU/TIBBİ HİZMETLER VE TEKNİKLER BÖLÜMÜ)

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Glioblastoma Multiforme (GBM) İlaç Direncinde Rol Oynayan CD133+ Glioblastoma Kök Hücrelerini (GKH) Hedefleyen Terapötik Monoklonal Antikor Geliştirilmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 2014 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
2. 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, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 2015 (Devam Ediyor) (ULUSAL)

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

1. The American Society of Human Genetics, Üye , 2013-2014
2. TIBBİ GENETİK DERNEĞİ, Üye , 2012

Ödüller

1. KLİNİK PSİKOFARMAKOLOJİ BÜLTENİ 24. CİLT ARAŞTIRMA YAZILARI TEŞVİK ÖDÜLLERİ, PSİKOFARMAKOLOJİ DERNEĞİ, 2015

Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. AYDOS OYA SENA,YÜKSELTEN YUNUS,DEMİRCAN KADİR,SUNGUROĞLU ASUMAN,AYDOS KAAN (2016). Role of ADAMTS1 and ADAMTS5 in male infertility. Andrologia, Doi: 10.1111/and.12547 (Yayın No: 2836501)
2. AYDOS OYA SENA,YÜKSELTEN YUNUS,KAPLAN FUAT,SUNGUROĞLU ASUMAN,AYDOS KAAN (2015). Analysis of the correlation between sperm DNA integrity and conventional semen parameters in infertile men. Türk Üroloji Dergisi/Turkish Journal of Urology, 41(4), 191-197., Doi: 10.5152/tud.2015.98475 (Yayın No: 1854052)
3. AKYOL SÜMEYYA,CÖMERTOĞLU İSMAİL,FIRAT RIDVAN,ÇAKMAK ÖZLEM,YÜKSELTEN YUNUS, ERDEN GÖNÜL,UĞURCU VELİ,DEMİRCAN KADİR (2015). Effect of insulin on the mRNA expression of procollagen N-proteinases in chondrosarcoma OUMS-27 cells. Oncology Letters, Atıf Sayısı: 1, Doi: 10.3892/ol.2015.3317 (Yayın No: 1853796)
4. AYNUR ALTUNTAŞ,AKYOL SÜMEYYA,BAHATTİN ADAM,ÇAKMAK ÖZLEM,UĞURCU VELİ,ERDEN GÖNÜL,YÜKSELTEN YUNUS,DEMİRCAN KADİR (2015). ADAMTS12 Depletion by Insulin in OUMS-27 Human Chondrosarcoma Cells. Archives of Rheumatology, 30(2), 96-103., Atıf Sayısı: 2, Doi: 10.5606/ArchRheumatol.2015.5249 (Yayın No: 1853952)
5. AKTEPE NECMETTİN,Koçyiğit Abdurrahim,YÜKSELTEN YUNUS,ABDULLAH TAŞKIN,KESKİN CUMALİ, ÇELİK HAKİM (2015). Increased DNA Damage and Oxidative Stress Among Silver Jewelry Workers. Biological Trace Element Research, 164(2), 185-191., Atıf Sayısı: 1, Doi: 10.1007 /s12011-014-0224-0 (Yayın No: 1854146)
6. AKYOL SÜMEYYA,YÜKSELTEN YUNUS,ÇAKMAK ÖZLEM,AYNUR ALTUNTAŞ,GÜRLER MUKADDES, AKYOL ÖMER,DEMİRCAN KADİR (2014). Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Human Chondrocytes: The Prophylactic Effects of Hypericum Perforatum Linn Extract on Deoxyribonucleic acid Damage, Apoptosis and Matrix Remodeling by a Disintegrin-Like and Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs Proteinases. Archives of Rheumatology, 29(3), 203-214., Atıf Sayısı: 4, Doi: 10.5606/ArchRheumatol.2014.5203 (Yayın No: 1853866)
7. AKYOL SÜMEYYA,UĞURCU VELİ,ÇAKMAK ÖZLEM,AYNUR ALTUNTAŞ,YÜKSELTEN YUNUS,AKYOL ÖMER,SUNGUROĞLU ASUMAN,DEMİRCAN KADİR (2014). Evidence for the ruling of aggrecanases by insulin and glucose in Alzheimer's disease. Bulletin of Clinical Psychopharmacology, 1, Atıf Sayısı: 2, Doi: 10.5455/bcp.20140905124459 (Yayın No: 1853999)

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler :

1. AKYOL SÜMEYYA,UĞURCU VELİ,ÇAKMAK ÖZLEM,AYNUR ALTUNTAŞ,YÜKSELTEN YUNUS, SUNGUROĞLU ASUMAN,AKYOL ÖMER,DEMİRCAN KADİR Evidence for the Ruling of Aggrecanases by Insulin and Glucose?in Alzheimer Disease: A Cell Culture Study. American Society for Matrix Biology BIENNIAL MEETING October 12-15, 2014 • Cleveland, OH (Poster)(Yayın No:1856616)
2. GÜROL ÇİFTCİ GÖNÜL,AKKILIK ZEYNEP SEÇKİN,ARABACI SEVİL,YÜKSELTEN YUNUS,GÜNERİ DİDEM,EKİCİ FATİH,DEMİRCAN KADİR The Impact Of Thrombospondın-1 In Pathophysıology Of Absence Epilepsy. FEBS-EMBO, Palais des Congrès-Paris, 30 August-4 September 2014 (Poster) (Yayın No:1857410)
3. AKYOL SÜMEYYA,ERDEN GÖNÜL,AYNUR ALTUNTAŞ,ÇAKMAK ÖZLEM,YÜKSELTEN YUNUS,UĞURCU VELİ,DEMİRCAN KADİR A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 8 (ADAMTS8) expression analysis by qRT-PCR in OUMS-27 cells before and after insulin administration.. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels 9- 12 September 2014 Isparta, TURKEY (Poster)(Yayın No: 1856258)
4. KAPLAN FUAT,AYDOS OYA SENA,ALTINOK BUKET,IŞIL YÜKSELEN,YÜKSELTEN YUNUS, SUNGUROĞLU ASUMAN,AYDOS KAAN The Clinical Analysis of Relationship between Sperm DNA Damage and Sperm Parameters. ASHG 2013 Annual Meeting in Boston, Massachusetts, October 22-26 (Poster)(Yayın No:1854698)
5. SUNGUROĞLU ASUMAN,AKÇORA DİLARA,YÜKSELTEN YUNUS,BAL MERVE GÜLSEN,BUNSUZ MERVE,DEMİRCAN KADİR,UĞUR HASAN ÇAĞLAR (2015). Flow cytometry assessment of anti-CD133 antibodies in human glioblastoma multiforme cells. II International Symposium on Clinical and Basic Investigation in Glioblastoma- GBM2015' (Özet bildiri)(Yayın No:2071462)
6. AYDOS OYA SENA,ÖZKAN TÜLİN,YÜKSELTEN YUNUS,SUNGUROĞLU ASUMAN (2015). Investigation of DNA Damage in Bone Marrow Cells Exposed to mobile Phone Radiation and Protective Roles of Arthrospira platensis. 1st International Conference on Natural Products for

Cancer Prevention and Therapy (NPCPT) (Özet bildiri)(Yayın No:2007896)

7. AKTEPE NECMETTİN,KESKİN CUMALİ,YÜKSELTEN YUNUS,SUNGUROĞLU ASUMAN (2015). Hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human mononuclear leukocyte: the anti-genotoxic effects of H. Perforatum extract on DNA damage. 40 th FEBS CONGRESS 2015 (Özet bildiri)(Yayın No:1857897)
8. SUNGUROĞLU ASUMAN,YÜKSELTEN YUNUS,AKÇORA DİLARA,BAL MERVE GÜLSEN,DEMİRCAN KADİR,UĞUR HASAN ÇAĞLAR (2015). IL-33 Dependent ADAMTS5 Expression In Glioblastoma Multiforme. European Human Genetics Conference 2015 (Özet bildiri)(Yayın No:2007427)
9. AKÇORA DİLARA,ÖZKAN TÜLİN,GÜNDÜZ MEHMET,YÜKSELTEN YUNUS,ÖZEN MEHMET,BEKSAÇ MERAL,SUNGUROĞLU ASUMAN (2015). WRN helicase plays an important role in multiple myeloma
proliferation and inhibition of its activity by NSC19630 induces
cytotocixity. European Human Genetics Conference 2015 (Özet bildiri)(Yayın No:2007337)
10. YÜKSELTEN YUNUS,AYDOS OYA SENA,SUNGUROĞLU ASUMAN,DEMİRCAN KADİR,AYDOS KAAN (2015). The Role of ADAMTS5 Proteases In Male Infertility. European Human Genetics Conference 2015 (Özet bildiri)(Yayın No:2007240)
11. KESKİN CUMALİ,AKTEPE NECMETTİN,YÜKSELTEN YUNUS,SUNGUROĞLU ASUMAN (2015). The antioxidant and anti-genotoxic effects of hypericum amblysepalum HOCHST. 3rd Anticancer Agent Development CongressDokuz Eylul University May 18- 19, 2015 Izmir, Turkey (Özet bildiri)(Yayın No:1857979)
12. DİLARA AKCORA,ÖZKAN TÜLİN,GÜNDÜZ MEHMET,YÜKSELTEN YUNUS,MERVE GÜLSEN BAL, BEKSAÇ MERAL,SUNGUROĞLU ASUMAN (2015). Impact of O6-metilguanine-DNA metiltransferase (MGMT) expression on disease progression in multiple myeloma. 3rd Anticancer Agent Development CongressDokuz Eylul University May 18- 19, 2015 Izmir, Turkey (Özet bildiri)(Yayın No:1858084)
13. DEMİRCAN KADİR,YÜKSELTEN YUNUS,BAL MERVE GÜLSEN,BUNSUZ MERVE,AKÇORA DİLARA, SUNGUROĞLU ASUMAN,UĞUR HASAN ÇAĞLAR (2015). The Role of IL33 in Glioblastoma Multiforme. EXPERIMENTAL BIOLOGY 2015 LATE-BREAKING ABSTRACTS Boston Convention & Exhibition Center, Hall B Wednesday, April 1 (Özet bildiri)(Yayın No:2006737)
14. YÜKSELTEN YUNUS,AKÇORA DİLARA,DEMİRCAN KADİR,SUNGUROĞLU ASUMAN,UĞUR HASAN ÇAĞLAR (2015). Isolation of Human Glioblastoma Multiforme Primary Cells and Analysis of CD133+.. EXPERIMENTAL BIOLOGY 2015 LATE-BREAKING ABSTRACTS Boston Convention & Exhibition Center, Hall B Wednesday, April 1 (Özet bildiri)(Yayın No:2006650)
15. AKYOL SÜMEYYA,İSMAİL CÖMERTOĞLU,RIDVAN FIRAT,ÇAKMAK ÖZLEM,YÜKSELTEN YUNUS, ERDEN GÖNÜL,UĞURCU VELİ,DEMİRCAN KADİR (2014). The Expression of Procollagen N-Proteinases in Chondrosarcoma Cells: How Does Insulin Affect the Enzyme mRNA Levels?. American Society for Matrix Biology BIENNIAL MEETING October 12-15, 2014 • Cleveland, OH (Özet bildiri)(Yayın No:1856404)
16. AKYOL SÜMEYYA,AYNUR ALTUNTAŞ,ERDEN GÖNÜL,ÇAKMAK ÖZLEM,YÜKSELTEN YUNUS, DEMİRCAN KADİR (2014). The determination of ADAMTS12 depletion using Western blot analysis technique in insulin-treated OUMS-27 human chondrosarcoma cells. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels 9- 12 September 2014 Isparta, TURKEY (Özet bildiri)(Yayın No:1856015)
17. EKİCİ FATİH,GÜROL ÇİFTCİ GÖNÜL,ARABACI SEVİL,YÜKSELTEN YUNUS (2014). ADAMTS5 Level In Absence Epilepsy. Fourth Annual Conference of COST Action ECMNET, Rixos Downtown Hotel – Antalya, 30 September - 2 October 2014 (Özet bildiri)(Yayın No:1857708)
18. AKKILIK ZEYNEP SEÇKİN,GÜROL ÇİFTCİ GÖNÜL,ARABACI SEVİL,YÜKSELTEN YUNUS,GÜNERİ DİDEM,EKİCİ FATİH,DEMİRCAN KADİR (2014). "The Impact Of IL-33 In Absence Epilepsy. FEBS-EMBO, Palais des Congrès-Paris, 30 August-4 September 2014. (Özet bildiri)(Yayın No:1857469)
19. AKTEPE NECMETTİN,YÜKSELTEN YUNUS,ABDURRAHİM KOÇYİĞİT (2014). The Effects of Silver Nanoparticles On The Genotoxicity.. 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Worldlab 2014) , 22?26 June 2014 ISTANBUL, TURKEY ISTANBUL CONGRESS CENTER (Özet bildiri)(Yayın No:1857168)
20. AKTEPE NECMETTİN,ABDURRAHİM KOÇYİĞİT,YÜKSELTEN YUNUS,TAŞKIN ABDULLAH,KESKİN CUMALİ,ÇELİK HAKİM (2014). Evaluation of Lymphocyte DNA Damages and Oxidative Status in Silver Jewelry Workers'. 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels (Özet bildiri)(Yayın No:1854339)
21. YÜKSELTEN YUNUS,AKTEPE NECMETTİN,ATMACA HARİKA,ASLI KISIM,KARACA ŞAZİYE BURÇAK (2013). Investigation of Resveratrol/AT-101's Molecular Targets of Apoptotic Effect to the Hormon Sensitive and Hormon Nonsensitive Prostate Cancer Cell Lines. . ASHG 2013 Annual Meeting in Boston, Massachusetts, October 22-26 (Poster)(Yayın No:1854538)

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. GÜROL ÇİFTCİ GÖNÜL,AKKILIK ZEYNEP SEÇKİN,YÜKSELTEN YUNUS,ARABACI SEVİL Glial fibriller asidik proteininin absans epilepsideki önemi. XII. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Bahçeşehir Üniversitesi-İstanbul, 28-31 Mayıs 2014., (Yayın No:1857790)
2. YÜKSELTEN YUNUS,ABDURRAHİM KOÇYİĞİT,AKSOY NURTEN,AKTEPE NECMETTİN,TAŞKIN ABDULLAH, KESKİN CUMALİ The effects of urtica dioca l. and fructus urtica pilulifera extracts to investigate on genotoxicity and oxidative status. 10. ULUSAL TIBBİ GENETİK KONGRESİ, (Yayın No:1855244)
3. KOYUNCU İSMAİL,ABDURRAHİM KOÇYİĞİT,ŞAHABETTİN SELEK,YÜKSELTEN YUNUS Rev1 surface membrane protein's cloning, expression, purification and determine of diagnostics to the effectiveness. XIII. NATIONAL CONGRESS OF MEDICAL BIOLOGY AND GENETICS 27 - 30 October 2013 Kus?adası - TURKEY, (Yayın No:1856897)
4. AVCI ASLIHAN,SUNGUROĞLU ASUMAN,YÜKSELTEN YUNUS,GENÇ METİN,MERVE GÜLSEN BAL, DEMİRCAN KADİR (2014). Effect of Tacrolimus on DNA Damage in Transplant Patients.. 11. National Medical Biology and Genetics Congress 24- 27 September 2014, (Yayın No:1856787)