

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPERM HAREKETLİLİĞİ DÜŞÜK OLAN ERKEKLERİN
SPERMATOZOALARINDA NRF2 mRNA EKSPRESYON
DÜZEYİNİN İNCELENMESİ**

Reyhan KARA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Pelin Taşdemir

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından “131318008” proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2015

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Reyhan KARA'nın "sperm hareketliliği düşük olan erkeklerin spermatozoalarında NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin incelenmesi" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA / 29.12.2015



Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Pelin TAŞDEMİR
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
(KATILAMADI)

Jüri Üyesi

Prof. Dr. S. Sennur DEMİREL
Karatay Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
İmzası

Yedek Jüri Üyesi

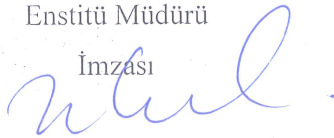
Yrd. Doç. Dr. Mine BALASAR
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 13.01/2016 tarih ve .01./01..sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility” by Reyhan KARA that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Master of Science in the Department of Medical Genetics, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan

KONYA, TURKEY / 29.12.2015


Principal Advisor

Yrd. Doç. Dr. Pelin TAŞDEMİR

Necmettin Erbakan University

Faculty of Medicine Department of Medical Genetics

Signature

Examination Committee

Member

Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM

Necmettin Erbakan University

Faculty of Medicine Department
of Medical Genetics

(noattend)

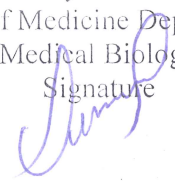
Examination Committee

Member

Prof. Dr. S. Sennur DEMİREL

Karatay University

Faculty of Medicine Department of
Medical Biology

Signature


Examination Committee Member

Yrd. Doç. Dr. Mine BALASAR

Necmettin Erbakan University

Faculty of Medicine Department of Medical Genetics

Signature


This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature


BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

29.12.2015

Reyhan KARA

Rkara

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik anabilim dalında tamamlamıő olduğum yüksek lisans programı boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve tez danıőmanlıđımı yapan baőta Prof. Dr. Aynur ACAR ve Yrd. Doç. Dr. Pelin TAŞDEMİR'e, desteklerini gördüğüm Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM'a, Yrd. Doç. Dr. Ayőegül ZAMANI'ye, Yrd. Doç. Dr. Mine BALASAR'a, Uzm. Dr. Ebru TUNÇEZ'e, çalışma populasyonunun oluőturulmasında yardımlarını aldığım Prof. Dr. Hüseyin GÖRKEMLİ ve Uzm. Dr. Duygu DURSUNOđLU'na, ayrıca Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Yardımcı reme Teknikleri nitesi ve Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarı hocalarına ve çalıőan personeline en içten teőekkürlerimi sunarım.

Reyhan KARA

Konya 2015

İÇİNDEKİLER

İç Kapak	i
Tez Onay Sayfası	ii
Approval.....	iii
Beyanat.....	iv
Teşekkür.....	v
İçindekiler	vi
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	viii
Şekiller Listesi.....	ix
Grafikler ve Tablolar Listesi	x
Özet	xi
Abstract	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Oksidatif Stres	2
2.1.1. Semende Reaktif Oksijen Türleri.....	2
2.1.2. Semende Lipit Peroksidasyonu	3
2.2. Antioksidan Enzimler	4
2.2.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi.....	4
2.2.2. Superoksid Dismutaz Enzim Düzeyinin Erkek İnfertilitesine Etkileri.....	6
2.3. NRF2-Keap1-ARE Transkripsiyon Yolağının Bileşenleri ve Tarihçesi.....	7
2.3.1. NRF2 Transkripsiyon Faktörü	7
2.3.2. Keap1: NRF2'nin Negatif Regülatörü	9
2.3.3. ARE: Antioksidan Yanıt Elemanı	13
2.3.4. NRF2 Transkripsiyon Kompleksi	13
2.3.5. Geleceğe Bakış	15
3. MOLEKÜLER TEKNİKLER	15
3.1. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	15
3.2. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu	16
3.2.1. SYBR Green I	16
3.3. Spektrofotometrik Ölçüm	17
4. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	19
4.1. Gerekli Ekipmanlar.....	19
4.2. Gerekli Kimyasallar.....	20

4.3. Çalışma Populasyonu	20
4.4. Semen Örneklerinin Temini ve Gruplandırılması.....	21
4.5. Yöntemler	21
4.5.1. Semen Analizi.....	23
4.5.2. Seminal Plazma Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Analizi.....	23
4.5.2.1. Yöntem.....	24
4.5.3. Sperm Pellet Örneklerinden Total RNA İzolasyonu.....	25
4.5.3.1. Yöntem	26
4.5.4. Komplementer DNA İzolasyonu.....	27
4.5.4.1. Yöntem	28
4.5.5. NRF2 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Analizi	29
4.5.5.1. Yöntem.....	29
4.6. İstatistiksel Analiz	30
5. BULGULAR.....	31
5.1. Çalışma Populasyonunun Semen Parametreleri	31
5.2. Spermatozoada NRF2 Antioksidan Genin mRNA Ekspresyon Düzeyi	34
5.3. Seminal Plazma SOD Aktivitesi	35
5.4. NRF2 mRNA Ekspresyon Düzeyinin Sperm Kalitesi ve Seminal Plazma SOD Aktivitesi Arasındaki Korelasyonu.....	36
5.5. Seminal Plazma SOD Aktivitesinin Sperm Kalitesi Arasındaki Korelasyonu .	37
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
7. KAYNAKLAR	44
8. ÖZGEÇMİŞ.....	49
9. EK A: ETİK KURUL KARAR FORMU	55

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AP1: aktive protein 1

ARE: antioksidan yanıt elemanı

Bach1: BTB ve CNC homoloji 1, basic lösin zipper transkripsiyon faktörü 1

BTB: broad complex/tramtrack/bric-a-brac domaini

bZIP: basic lösin zipper transkripsiyon faktörleri

CAT: katalaz

CNC: cap 'n' collar alt ailesi

CTR: C-terminal bölge

DGR: çift glisin tekrarı olarak bilinen Kelch domaini

GPx: glutatyon peroksidaz

GSH: antioksidan tripeptit glutatyon

GST: glutatyon S-transferaz

GST Ya: glutatyon s-transferaz Ya

GST: glutatyon S-transferaz

IVR: intervening bölge

Keap1: kelch-like ECH-associating protein 1

Maf: masküloapnörotik fibrosarcoma protein

NFE2: nükleer faktör eritroid 2

NRF2: nükleer faktör eritroid 2 (NF-E2) ilişkili faktör 2

NTR: N-terminal bölge

PZR: polimeraz zincir reaksiyonu

Gerçek zamanlı PZR: real time polimeraz zincir reaksiyonu

ROT: reaktif oksijen türleri

RT-PZR: revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

SG: SYBR Green I

SNP: tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphisms)

SOD: süperoksit dismutaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. CNC Protein Aile Üyelerinin Yapısal Özellikleri	8
Şekil 2. NRF2'nin Yapısal Özellikleri ve Korunmuş Domainlerinin Fonksiyonu.....	10
Şekil 3. Keap1 Proteininde Korunmuş Bölgelerin Şematik Yapısı	11
Şekil 4. Keap1-NRF2-ARE Sinyalizasyon Yolağının Genel Şeması	14
Şekil 5. Deneysel Çalışma Planı	22
Şekil 6. Süperoksit Dismutaz Aktivite Analizinin (Kolorimetrik) Prensibi	24
Şekil 7. Çalışma Grubu ve Kontrol Grubunun Ortalama NRF2 mRNA Ekspresyonu.....	35
Şekil 8. Çalışma Grubu ve Kontrol Grubunun Seminal Plazma SOD Aktivitesi.....	36



GRAFİKLER VE TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Her Bir Kuyucuk İçin Çözelti Miktarı.....	25
Tablo 2. Bir Reaksiyon İçin PZR Bileşenleri Karışımı.....	30
Tablo 3. Kontrol ve Çalışma Grubunun Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması.....	31
Tablo 4. Sigara İçen Kontrol ve Çalışma Grubunun Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması.....	32
Tablo 5. Sigara İçmeyen Kontrol ve Çalışma Grubunun Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması.....	33
Tablo 6. Çalışma Grubunda Sigara Kullanımının Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması.....	34
Tablo 7. Kontrol Grubunda Sigara Kullanımının Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması.....	34
Tablo 8. Kontrol ve Çalışma Grubunun NRF2 Antioksidan Gen Ekspresyonu.....	35
Tablo 9. Kontrol ve Çalışma Grubunun Seminal Plazma SOD Aktivitesi.....	36
Tablo 10. NRF2 mRNA Ekspresyon Düzeyinin Sperm Kalitesi ve Seminal Plazma SOD Aktivitesi Arasındaki Korelasyonu.....	37
Tablo 11. Seminal Plazma SOD Aktivitesinin Sperm Kalitesi Arasındaki Korelasyonu.....	37

ÖZET

TC
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERM HAREKETLİLİĞİ DÜŞÜK OLAN ERKEKLERİN SPERMATOZOALARINDA NRF2 mRNA EKSPRESYON DÜZEYİNİN İNCELENMESİ

Reyhan KARA

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2015

Erkek faktörü, infertilite için önemli bir etiyolojik sebep olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkek infertilitesi için bilinen sebeplerin dışında son dönemde ilgi çeken bir yenisi eklenmiştir; oksidatif stres. Vücuttaki antioksidanlar ve reaktif oksijen türleri (ROT) arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan oksidatif stres, spermilere zarar vermekte ve infertiliteye sebep olabilmektedir.

Oksidatif strese karşı önemli hücrel savunma mekanizmalarından biri transkripsiyon faktörü nükleer faktör eritroid 2 (NF-E2) ilişkili faktör 2 (NRF2)'dir. NRF2, ROT'a karşı koruma için önemli olan antioksidan enzimleri kodlayan genlerin bazal ve indüklenbilir transkripsiyonunu düzenlemektedir. Antioksidan enzimler insan spermatogenezinde önemli rol oynamaktadır. İnsan seminal plazma ve spermatozoada bulunan süperoksit dismutaz (SOD) önemli antioksidan enzimlerden biridir.

Çalışmamıza 41 asthenozoospermik ve oligoasthenozoospermik olgudan oluşan çalışma grubu ile 48 sağlıklı bireyden oluşan normozoospermik kontrol grubu dahil edildi. Bu çalışmada asthenozoospermi ve oligoasthenozoospermi olgularında, spermatogenez için önemli olduğu bilinen NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyinin ve erkek üreme sisteminde önemli bir antioksidan enzim olan seminal plazma SOD aktivitesinin sperm fonksiyonları ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Olguların spermatozoalarında NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyi için kantitatif real-time ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ve seminal plazma SOD aktivitesi için ise kolorimetrik yöntem kullanıldı.

Araştırmamız sonucunda, çalışma grubunun NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyi kontrol grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.633$). Ayrıca NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin spesifik sperm fonksiyon parametreleri ($P>0.05$) ve seminal plazma SOD aktivitesi ile aralarında bir ilişki olmadığı belirlendi ($P=0.533$). Çalışma grubunun seminal plazma SOD aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmadığını gözlemledik ($P=0.502$). Seminal plazma SOD aktivitesinin spesifik sperm fonksiyon parametreleri ile de aralarında bir ilişki olmadığı ($P>0.05$) saptandı.

Bu nedenle, verilerimiz NRF2 mRNA ekspresyonunun ve seminal plazma SOD aktivitesinin düşük sperm hareketliliği olan erkeklerde anlamlı bir fark göstermediğini ve spesifik sperm fonksiyon parametreleri ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Bu veriler, insan spermatogenezinde önemli rol oynadığı düşünülen NRF2 geninin erkek infertilitesi ile ilişkili ROT'un tahmin edilmesinde ve ayrıca SOD aktivitesinin sperm fertilizasyon potansiyelini belirlemede yeterli bir belirteç olarak kullanılmasının uygun olmadığını düşündürmektedir. Ancak, çalışmamızda çalışma ve kontrol grubu sınırlı sayıda ele alındığından daha geniş bir popülasyonda daha fazla araştırma yapılması uygun olacaktır.

Anahtar Sözcükler: mRNA ekspresyonu; spermatogenez; sperm hareketliliği; transkripsiyon faktörü nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2

ABSTRACT

TC
NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY
HEALTH SCIENCE INSTITUTE

NRF2 mRNA EXPRESSION IN SPERMATOZOA IN MEN WITH LOW SPERM MOTILITY

Reyhan KARA

DEPARTMENT OF MEDICAL GENETICS

MASTER THESIS / KONYA-2015

The most essential etiology that is accepted for infertility is the male factor. The common causes of male infertility factor has been added a new interesting cause in a list which is called: oxidative stress. It is usually caused by imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidants in the metabolism. Oxidative stress may disturb sperm and causes infertility.

The transcription factor nuclear factor erythroid 2 (NF-E2) related factor 2 (NRF2) is one of the most important cellular defense mechanisms against oxidative stress. NRF2 regulates basal and inducible transcription of genes encoding antioxidant enzymes important for the protection against ROS. The antioxidant enzymes play an important role in spermatogenesis. Superoxide dismutase (SOD) is one of the most important antioxidant enzyme found in human seminal plasma and spermatozoa.

In this study 41 patients with asthenozoospermia and oligoasthenozoospermia and also 48 healthy individuals with normozoospermia were included. The purpose of this study was to determine the level of mRNA expression of antioxidant gene Nfr2 that is known to be important for spermatogenesis and also the seminal plasma SOD activity which is an important antioxidant enzymes in the male reproductive system effect on sperm functions in asthenozoospermia and oligoasthenozoospermia cases. In this study, quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction was used for detecting mRNA expression levels of the NRF2 antioxidant gene in ejaculated spermatozoa and colorimetric method was also used to evaluate seminal plasma SOD activity.

There was no significant difference in the mRNA expression level of the NRF2 antioxidant gene between the patient group and the control group ($P=0.633$). There was also no relationship detected between NRF2 mRNA expression level and specific sperm function parameters ($P>0.05$). In addition, there was no relationship between NRF2 mRNA expression level and seminal plasma SOD activity ($P=0.553$). We observed that there was no difference in seminal plasma SOD activity levels between the control group and the patient group ($P=0.502$). There also was no relationship between seminal plasma SOD activity and specific sperm function parameters ($P>0.05$).

Therefore, these data indicated that NRF2 mRNA expression level and seminal plasma SOD activity did not show any significant difference in men with low sperm motility and that these factors were not related to specific sperm function parameters. As a result, it is thought that the NRF2 gene, which plays an important role in human spermatogenesis, cannot be suitable for use as a marker in the prediction of ROS related male infertility. In addition, this study showed that the SOD activity is not a sufficient marker to determine sperm fertilization potential. However, the patient and control groups were limited in this study. More studies in a larger population are required.

Keywords: mRNA expression; spermatogenesis; sperm motility; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, reproduktif çağda olan bir çiftin etkili bir korunma yöntemi uygulamaksızın düzenli bir cinsel ilişki varlığına rağmen bir yıl içinde gebeliğin gerçekleşmemesi olarak tanımlanmaktadır. Sağlıklı çiftlerin yaklaşık %85-90'ında ilk bir yıl içerisinde gebelik gerçekleşmektedir (1). Tüm dünyada infertilite probleminin üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10'unu etkileyen bir faktör olduğu bilinmektedir (2,3). Tüm infertil çiftlerin %20-25'ini erkek, %30-40'ını kadın faktörü oluşturur iken %30'unda hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenmiştir. %15 çiftte ise tüm tanısal tetkikler sonucunda bir infertilite nedeni tanımlanamamıştır (4). Semen kalitesinin bozulması erkek infertilitesi için önemli bir nedendir ve insan semen kalitesinin hızlı düşüşü 1940'lardan beri gözlemlenmektedir (5). Genetik bozukluklar, genital sistem enfeksiyonları, cerrahi öykü ve tıbbi müdahaleler dahil birçok patolojik faktör semen kalitesini etkileyebilmektedir. Ancak, anormal sperm üretimi olan erkeklerin yaklaşık %40'ı idiyopatiktir (2). Bu erkeklerde düşük spermatogenezin bilinen etiyolojik bir nedeni yoktur (5). Genel olarak erkek üreme patolojisindeki sorumlu hücrel mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Ancak son yıllarda erkek infertilitesi için bir sebep olarak suçlanan oksidatif stres popüler bir konudur ve ayrıntılı olarak ele alınmaya başlanmıştır (6). Bu çalışmada, asthenozoospermik (sperm hareketliliğinin düşüklüğü) ve oligoasthenozoospermik (hem sperm hareketliliğinin hem de sayısının düşüklüğü) olguların spermatozoalarında spermatogenez için önemli olduğu bilinen NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyinin sperm fonksiyonları ile olan ilişkisi ve erkek üreme sisteminde önemli bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin seminal plazmada incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

Organizmanın normal metabolik aktivitesi esnasında, oksitleme özelliği fazla olan ve normal oksijen molekülüne göre kimyasal aktivitesi yüksek olan reaktif oksijen türleri (ROT) üretilmektedir (7). ROT'ların düşük konsantrasyonları hücre fonksiyonlarını etkilemez iken, yüksek konsantrasyonları lipid peroksidasyonuna ve hücre ölümlerine neden olabilmektedir (8).

Hidrojen peroksit, süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, peroksi radikali gibi serbest radikalleri içeren ROT'ların (9) zararlarına karşılık organizma farklı doğal savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bu mekanizmalar birbirinden farklı hücrelerde, değişik ROT'lar üzerinde etkili oldukları için birbirlerini tamamlama özelliğindedirler (10). Organizmada ROT'ların sebep olduğu oksidasyonları önleyen antioksidan savunma mekanizmaları gelişmiştir (7). Antioksidan mekanizmalar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi enzimatik, ayrıca C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi non-enzimatik antioksidanlardan oluşmaktadır (11,12). Antioksidan savunma mekanizmaları ve ROT fizyolojik şartlarda denge halinde bulunmaktadır. ROT antioksidan savunmayı baskıladığı zaman oksidatif stres oluşmaktadır (13,14). Oksidatif stresin kalp-damar hastalıkları, karsinogenez ve çok sayıda biyolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir (15). Ayrıca oksidatif stres; sperm hareketliliğinin bozukluğu, yüksek seviyelerde sperm canlılığındaki azalma ve düşük spermatogenez nedeniyle de erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiştir (16). DNA hasarlarının da oksidatif stres kaynaklı olabileceği bildirilmiştir (17,18). Oksidatif stresin neden olduğu DNA hasar mekanizmaları; tüm bazların değişimi, boş baz alanları oluşumu, delesyon, çerçeve kayması, çapraz bağlantılar ve kromozomal değişimler şeklindedir. Ayrıca, tek veya çift DNA zincirindeki kırıkların sık tekrarlanması da oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (19).

2.1.1. Semende Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri, spermatozoada hem toksik hem de fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (20). Spermatozoanın hidrojen peroksit ve süperoksit radikalini serbest bıraktığı gösterilmiştir (20,21). Spermatozoada nasıl hayatın

devamı için oksijen gerekli ise, normal seviyelerde ROT da hücre faaliyetlerinin devamı için gerekmektedir. Diğer taraftan oksijenin yıkım ürünü olan ROT'un yüksek seviyeleri hücre işlevleri ve yaşamı için zararlı etkiler ortaya koyabilmektedir (8,9).

Günümüze kadar ROT'un insan spermatozoasına toksik olduğu zannedilmekteydi fakat düşük miktarda ROT'un spermin oositi dölleme yeteneğine sahip olmasını ve oositin zona pellucidaya nüfuz etmesini sağlayan spermin akrozom reaksiyonunu indüklediği saptanmış ve ayrıca spermin plazma membranı ile kaynaşmasını sağlayan sperm kapasitesi için gerekli olduğu bildirilmiştir. ROT'un yüksek düzeyinin spermatozoa'nın kalitesini negatif etkileyebileceği ve spermatozoa'ların ovumu dölleme yeteneğini tümüyle bozabileceği bildirilmiştir (16,22). Ayrıca, son zamanlarda süperoksit radikalleri spermatozoanın kapasitasyon reaksiyonundan da sorumlu tutulmuştur (20,23). Bu nedenle, ROT'un birikmesini önleyerek, bu hücrelerin ROT seviyelerini kontrol etmek için sürekli bir çaba gerekmektedir (24).

2.1.2. Semende Lipit Peroksidasyonu

Yüksek düzeyde ROT üretimi lipit peroksidasyonuna ve membran fonksiyonlarının bozulmasına sebep olup sperm metabolizmasını dolayısıyla morfoloji, hareketlilik ve fertilitiyi olumsuz yönde etkileyerek erkek infertilitesinde önemli rol oynamaktadır (25). Spermatozoanın hücre membranları ROT varlığında oksitlenebilir doymamış yağ asitlerini yüksek miktarlarda içerdikleri için özellikle oksidatif strese karşı duyarlıdır (14,16) ve sürekli nötrofil kontaminasyonu (26) veya spermatozoa tarafından oluşturulan ROT'a maruz kalmaktadırlar (27). ROT, hücre zarındaki doymamış yağ asidi ile etkileştiğinde lipit peroksidasyonunun konsantrasyonunda artış meydana gelmektedir (28,29). Spermatozoalar ROT'a maruz kaldıklarında doymamış yağ asit içeriklerinin oranı %20'den fazla azalmaktadır (30). Spermatozoalar daha fazla ROT'a maruz kaldıklarında membran bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak fonksiyonlarını gerçekleştiremezler. Ayrıca membran bütünlüğünün bozulması hücrenin elektrolitlere karşı geçirgen olmasına da neden olmaktadır. Kalsiyum ve sodyum iyonlarının hücre içine alınması, hücrenin enerji üretme mekanizmasını bozmakta ve ATP'nin azalmasına neden olmaktadır (31). Ayrıca spermatozoal lipitlerin peroksidasyonu ve hareketliliğin kaybı arasında

bir ilişkinin bulunduğu da belirtilmektedir (32,33). Gece bekletilen örneklerde spermatozoadaki hareket azalması lipid peroksidasyonu ile ilişkilendirilmektedir (34). Yapılan çalışmalarda hücre zarını lipid peroksidasyonundan koruyan E vitamininin spermatozoanın fonksiyonlarını düzenlediği bildirilmektedir (35)

2.2. Antioksidan Enzimler

Antioksidanlar ve antioksidan enzimler erkek üreme sisteminde ROT'un sebep olduğu oksidatif strese karşı ana savunma faktörleri olarak bilinmektedir (11). ROT'un yüksek düzeyde olumsuz etkilerini önlemek için erkek üreme sistemi; C ve E vitaminleri, antioksidan tripeptit glutatyon (GSH), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz (GSTs), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi ROT tutucu enzimleri içeren antioksidan savunmaya sahiptir (16,36). Ayrıca seminal plazma askorbat, ürat (37) ve tiyoller (38) dahil olmak üzere diğer antioksidanlardan bol miktarda içermektedir. Antioksidan enzimler mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmesini ve yeni serbest radikal oluşumunu önlemektedir. Bu enzimler serbest radikallerin DNA, protein ve lipid gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini önlemek için serbest radikallerin bir hücreden diğerine geçişini de önleyebilmektedir (7). Yapılan çalışmalarda antioksidanların spermatozoayı ROT üreten anormal spermatozoalardan koruduğu, lökositlerin ürettiği ROT'u temizlediği, DNA kırılmalarını önlediği, sigara içenlerde semen kalitesini arttırdığı, soğğun spermatozoaya olan etkisini azalttığı, erken sperm olgunlaşmasını engellediği ve spermatozoayı destekleyerek yardımcı üreme tekniklerinin başarısını arttırdığı gösterilmiştir (6). İnsan seminal plazma ve spermatozoasında, SOD izoenzimleri ve GST önemli antioksidan enzimler olarak bilinmektedir (5).

2.2.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, en önemli ve en etkin hücre içi antioksidan enzimlerden biri sayılmaktadır. SOD, oldukça reaktif olan süperoksit anyonunun ($\cdot O_2^-$), moleküler oksijene ve daha az reaktif olan hidrojen perokside (H_2O_2)'e dönüşümünü katalize ederek bu radikalın etkisini azaltmaktadır. Ayrıca bu enzim daha fazla serbest radikal oluşmasını engellediği için hücrenin ilk savunması olarak adlandırılmaktadır (39,40).

Bir metalloenzim olan SOD'un memelilerde üç izoenzimi tanımlanmıştır. Bunlar; sitozolik dimerik Cu/Zn-SOD (41), mitokondriyal matriks Mn-SOD (42) ve sekretuar tetramerik ekstraselüler SOD (EC-SOD)'tur (43).

Cu/Zn-SOD, moleküler ağırlığı 32 kDa olup iki benzer alt birimden oluşmaktadır. Her alt birim Cu ve Zn içeren bir aktif bölgeye sahiptir. Mn-SOD, homotetramerik olup (96 kDa) her alt birimi bir tane Mn atomu içermektedir. EC-SOD, tetramerik, salgısal, Cu ve Zn içeren bir glikoproteindir. (40,44).

Cu/Zn-SOD bir sinyal peptidi ile sentezlenmez, esas olarak sitozol ve çekirdekte yer almaktadır (41) ve salgılandığı da gösterilememiştir. Split ejakülat çalışmasına göre Cu/Zn-SOD'un ana kaynağı prostat bezidir (20,45). Sinyal peptidi içeren sekretuar EC-SOD'un en fonksiyonel ayırt edici özelliği, heparin ve heparan sülfata olan yüksek afinitesidir. İnsan vücudunda EC-SOD'un büyük bir kısmı, hücre yüzeyinde ve doku interstisyel matris içinde heparan sülfata bağlı bulunmaktadır (46,47). Split ejakülat çalışmaları EC-SOD'un öncelikle prostatik kökenli olduğunu göstermektedir (20). Doğal rekombinant EC-SOD'un yanı sıra prostat bezi de dahil olmak üzere dokulardan izole edilen EC-SOD (45,48) heparin için yüksek afinite göstermektedir.

Memeli seminal plazmasının yüksek oranda SOD aktivitesi içerdiği, bu oranın diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunandan çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (20,49). Seminal plazmanın total SOD aktivitesi, kan plazmasından 20 kat daha yüksektir (20). SOD aktivitesinin bir kısmı ekstrasellüler olarak gerçekleşmesine rağmen aktivitenin büyük kısmı intrasellüler olarak sitozolde gerçekleşmektedir (11). Sitosolik Cu/Zn-SOD belirgin olarak aktivitenin %75'ini gösterir iken EC-SOD için bunun %25 olduğu belirtilmektedir. Mn-SOD aktivitesi önemsizdir (20). SOD aktivitesi değişik dokularda değişiklik göstermektedir. Bu enzim en fazla karaciğer, adrenal bez, böbrek ve dalakta bulunmaktadır (11).

Daha önceden spermatozoanın da SOD aktivitesi içerdiği rapor edilmiştir (20,49). İnsan spermatozoasının Cu/Zn-SOD aktivitesinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (20,49). Diğer taraftan Mn-SOD aktivitesinin, spermatozoada bol

miktarda mitokondri olmasına rağmen çok düşük olduğu (50) ve spermatozoa EC-SOD aktivitesinin çok az olduğu bildirilmiştir (20).

2.2.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Düzeyinin Erkek İnfertilitesine Etkileri

Semende hidrojen peroksit, süperoksit anyonu, hidroksil radikali gibi ROT'ların yapımından spermatozoa hücreleri ve lökositler sorumlu tutulmaktadır (21,51). ROT'ların sperm hücrelerinin akrozom reaksiyonlarında ve kapasitasyonunda fizyolojik rol oynadığını gösteren çalışmalar olduğu gibi, sperm hücreleri üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar da yapılmıştır (52,53). İnsan spermatozoa hücreleri ve seminal plazmada ROT'ları ortadan kaldıran antioksidan enzimler mevcuttur. Spermatozoa hücrelerinde SOD, GPX (27,54) ve CAT enzimlerinin varlığı gösterilmiştir (55).

Spermatozoalar tarafından yapılan en önemli ROT, süperoksit anyonudur ve bu anyon SOD enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile hidrojen peroksit oluşturmaktadır (56). Süperoksit anyonundan oluşan hidrojen peroksit seminal plazmada bulunan Cu ve Fe'yi kullanarak hidroksil radikale indirgenmektedir. Hidrojen peroksidin sperm hücreleri üzerindeki toksik etkisinin diğer oksijen türevlerine kıyasla daha fazla olduğu ve spermatozoa hücrelerinin oositler ile birleşme yeteneğinin ortama eklenen hidrojen peroksit ile azaldığı gösterilmiştir (57). Süperoksit radikali ve diğer ROT'ların belirtilen önemine rağmen, insan semeninde SOD izoenzimleri ile ilgili kapsamlı bir çalışma bildirilmemiştir. Ancak spermatozoanın SOD ile son derece iyi donatıldığı bilinmektedir (20). Bu kapsamlı antioksidan koruma; spermatogenez, depolama ve post-ejakulasyon sırasında ROT'un mutajenik etkilerinin azaltılması için önemli olabilmektedir. SOD'un varlığının sperm hareketliliğinde önemli bir rol oynadığı ve SOD'un yüksek endojen içeriğinin lipid peroksidasyon başlangıcını ve hareketlilik kaybını geciktirdiği gösterilmiştir (27,33,58). Ayrıca insan sperminde, SOD izoenzimleri hem intrasellüler hem de ekstrasellüler süperoksit radikallerini yok edebilmekte ve plazma membranının lipid peroksidasyonunu önleyebilmektedir (59). Seminal plazma SOD aktivitesinin spermatozoal progresif hareketlilik arasındaki pozitif korelasyonu ve oksijen radikali üreten ksantin oksidaz enzim aktivitesi arasındaki negatif korelasyonu bildirilmiştir (60). Süperoksit radikallerinin hiperaktivasyon ve

kapasitesini indüklediği (23,61) ve spermatozoanın özellikle hiperaktivasyon durumunda radikalleri serbest bıraktığı gösterilmiştir (21,51).

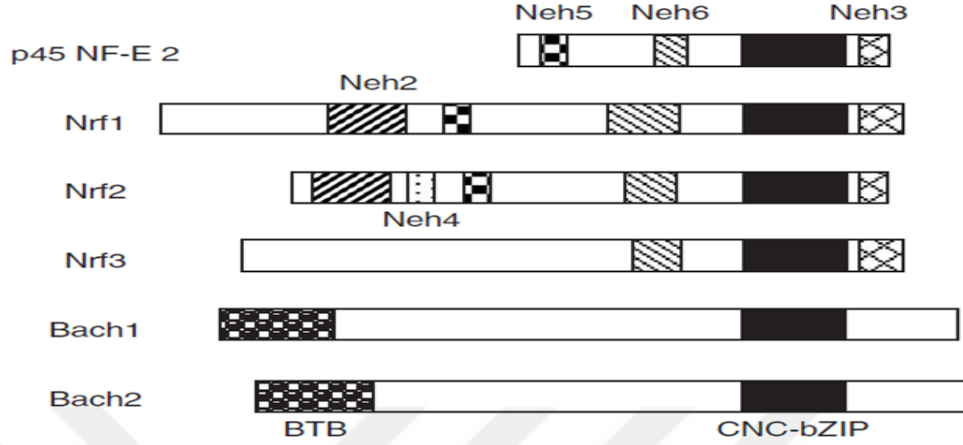
Birçok antioksidan enzim, nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (NRF2) gibi ortak bir regülatör faktör bulundurmaktadır. NRF2'nin antioksidan enzimlerin transkripsiyonunu aktif hale getirdiği saptanmıştır (14,62). Antioksidan savunmasında NRF2'nin önemi birçok çalışmada kanıtlanmıştır (14,62,63). NRF2 gen eksikliğinin SOD ve CAT içeren birçok antioksidan genin bazal ve indüklenebilir ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (63).

2.3. NRF2-Keap1-ARE Transkripsiyon Yolağının Bileşenleri ve Tarihçesi

2.3.1. NRF2 Transkripsiyon Faktörü

NRF2'nin keşfi, önemli regülatör özelliklere sahip olan lokus kontrol bölgesinin karakterizasyonu ile β -globin gen ekspresyon çalışmalarına dayanmaktadır (63,64). Beta-globin geninin lokus kontrol bölgesi dört eritroid-spesifik hipersensitif alan içermektedir. Güçlü bir artırıcı aktiviteye sahip olan hipersensitif alan II, AP1-NFE2 (aktive protein 1-nükleer faktör eritroid 2) motifine sahiptir (63,65). AP1-NFE2 alanına bağlanan transkripsiyon faktörlerini klonlamak için yapılan çalışmalar basic lösin zipper (bZIP) transkripsiyon faktörlerinin cap 'n' collar (CNC) alt ailesine ait birkaç üyenin belirlenmesini sağlamıştır. İlk belirlenenler arasında; p45-NFE2 (66), NRF1 (67), NRF2 (68) ve NRF3 (69) bulunmaktadır (şekil 1). NRF2 β -globin gen promotorunun NF-E2 tekrarına bağlanan bir faktör olarak 1996 yılında Chan ve çalışma arkadaşları tarafından klonlanmıştır. 589 amino asitlik bu proteinin moleküler ağırlığı 66.1 kD olarak bildirilmiştir (70). NRF2 proteini kısa bir yarılanma ömrüne (20 dakika) sahiptir ve stressiz durumlarda mRNA transkriptlerinin bolluğuna rağmen düşük seviyelerde eksprese edildiği gözlenmiştir (71). NRF2 olarak sembolize edilen NFE2L2 geninin 5 ekzon içerdiği ve 11 kb'ın üzerinde bir uzunlukta olduğu belirlenmiştir (68). NFE2L2 geninin 2q31 kromozomu üzerinde yer aldığı gösterilmiştir (72). p45-NFE2, NFE2L1 (NRF1) ve NFE2L2'yi kodlayan genlerin sırasıyla kromozom 12, 17 ve 2 üzerinde bulunmalarına rağmen, bu genlerin muhtemelen kromozom duplikasyonu ile tek bir atadan köken aldığı düşünülmektedir. Diğer CNC aile

proteinlerinden olan iki protein daha; Bach1 (73) ve Bach2 (74) tespit edilmiştir (şekil 1). Bu proteinler, small Mafs (sMafs) gibi diğer bZIP proteinleri ile dimer oluşturarak heterodimerik transkripsiyon faktörleri olarak işlev görmektedir (63).



Şekil 1. CNC Protein Aile Üyelerinin Yapısal Özellikleri. NRF2 yedi Neh domainini de muhafaza ederken diğer CNC proteinlerinde Neh domainlerinin bazıları bulunmaktadır. Neh4 domaini sadece NRF2'ye özgü bir domainidir. Ayrıca NRF1'de Keap1 için bir etkileşim alanı olan, Neh2 benzeri bir motif bulunmaktadır. Fakat NRF1-Neh2'nin kesin işlevi bilinmemektedir. Neh domainlerinin hiçbiri Bach proteinlerinde bulunmamaktadır (75).

CNC genlerinden sadece p45-NFE2 hematopoetik spesifik iken, NRF1, NRF2 ve NRF3 yaygın olarak eksprese edilmektedir. p45-NFE2, NRF1, ve NRF2'nin hedeflenen gen bozuklukları ya da kesintiye uğratılmaları onların fonksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır (63). p45-NFE2'nin kesintiye uğradığı farelerin durumunda, megakaryositlerden trombositlerin oluşumunda ciddi kusurlar bulunmaktadır. p45-NFE2 knockout farelerin hafif anemi veya aşırı kanamadan muzdarip oldukları bildirilmiştir (76,77). Farelerde NRF1'in hedeflenen gen bozukluğu birincil suçlu olduğu ileri sürülen karaciğer anormalliliği ve şiddetli anemi ile embriyonik ölümlerle sonuçlanmaktadır (78). Bununla birlikte, NRF2^{-/-} farelerin normal ve fertil oldukları, ayrıca gelişim kusurlarının klinik belirtilerini göstermedikleri bildirilmiştir. NRF2'nin murine'lerin (kemirgen) gelişim ve sağ kalımı için gerekli olmadığı düşünülmektedir (70,79). Ancak, NRF2 knockout fareler faz II enzim ve endojen antioksidanların hem yapısal hem de indüklenebilir düzey ekspresyonunda azalmaya sahiptir (80). Ayrıca NRF2 knockout farelerin polisiklik aromatik hidrokarbon benz(a)pyrene tarafından indüklenen kanser, vinilsiklohekzen diepoksit tarafından oluşan ovarian toksisite, asetaminofen tarafından gerçekleşen karaciğer toksisitesini içeren kimyasal toksisiteye ve otoimmün hastalıklara wild-type farelerden daha duyarlı oldukları ve NRF2 knockout farelerin onların wild-type

ve heterozigot kardeşlerinden (littermates) daha az fertil oldukları bildirilmiştir (14). Bu nedenle NRF2'nin spermatogenezis için önemli olduğu düşünülmektedir (81). NRF3 tercihen plasentada eksprese edilmektedir ve NRF3 knockout farelerin belirgin bir klinik belirtisi gösterilememiştir (82).

2.3.2. Keap1: NRF2'nin Negatif Regülatörü

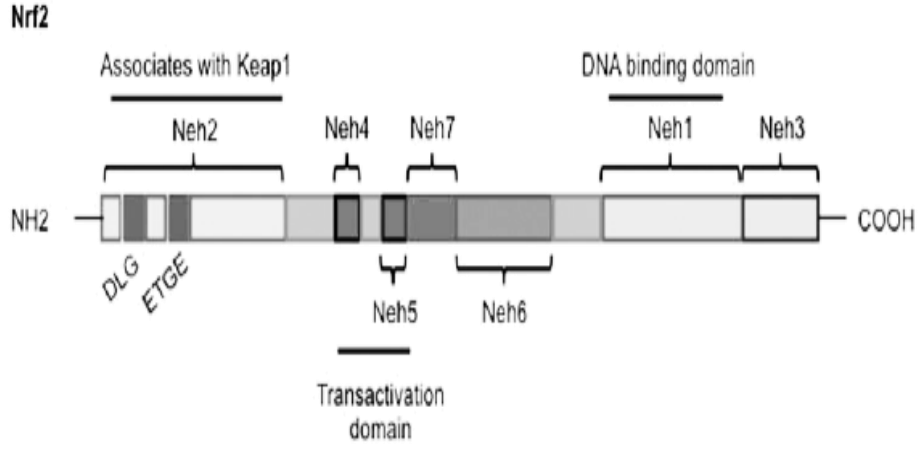
İnsan, fare ve tavuk gibi farklı türlerin NRF2 genleri karşılaştırıldığı zaman Neh (NRF2-ECH<chicken NRF2>homologous domain) olarak adlandırılan evrimsel olarak korunmuş yedi fonksiyonel homolog domain tespit edilmiştir (79,83). Bu domainler Neh1-7 olarak tanımlanmaktadır. Bu korunmuş domainler için tanımlanan görev ve işlevlerin özeti şekil 2'de gösterilmektedir.

NRF2'nin N terminal ucunda bulunan Neh2 domaini, büyük bir regülatuar domainidir. Neh2, ubikuitin konjugasyonu yanı sıra NRF2 stabilitesini düzenlenmeye yardımcı iki bağlanma bölgesinden (ETGE ve DLG motifi) sorumlu yedi lizin rezidue dizisi içermektedir. ETGE ve DLG motifleri, NRF2 ubikuitinasyonu ve sonraki proteozomal degradasyonu teşvik ederek NRF2'yi baskılayan, Cullin 3 (Cul3) - E3 bağımlı ubiquitin ligaz kompleksi için bir substrat adaptör proteini olan Keap1 ile etkileşim halinde bulunmaktadır (83). Neh2 delesyonu NRF2'nin transaktivasyon aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. NRF2'nin negatif regülatörü bağlaması için Neh2'de önemli bir etkileşim bölgesi bulunduğu bildirilmektedir (84). Genetik olarak tasarlanmış NRF2-LacZ knock fareler kullanılarak, Neh2 domaininin NRF2'nin proteozom bağımlı degradasyonuna katıldığı gösterilmiştir (71).

Neh1 ve Neh6 domainlerinin NRF2'nin stabilitesini düzenledikleri bildirilmiştir (83). Ayrıca Neh1 domaini, NRF2'nin DNA'ya bağlanmasını ve diğer transkripsiyon faktörleri ile dimerizasyonunu sağlayan bir CNC tipi bZIP DNA bağlayıcı motifi içermektedir (83,85,86).

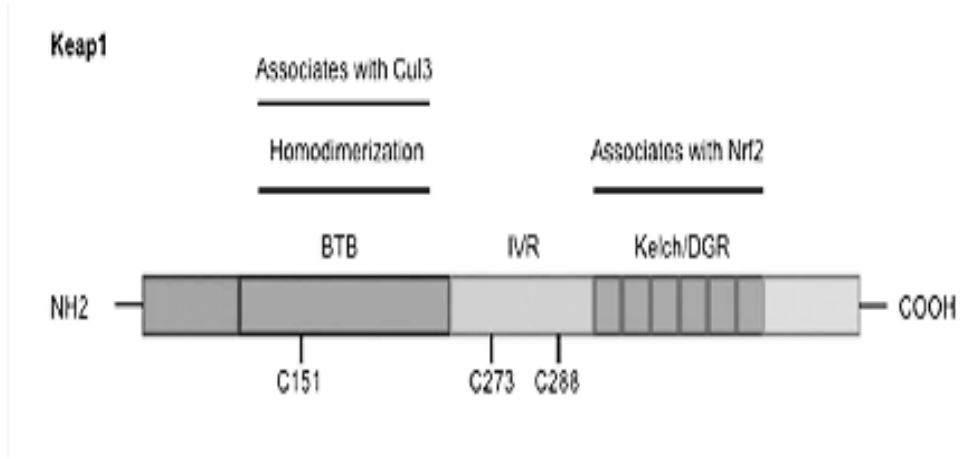
Neh3, Neh4 ve Neh5 domainleri, NRF2 hedef genlerinin transaktivasyonunu sağlamak için koaktivatörler ile etkileşimdedir (83,87). Ayrıca asidik rezidue dizisi açısından zengin olan Neh4 ve Neh5 domainleri iki bağımsız transaktivasyon domainidir (83,88). Son zamanlarda, yedinci Neh domaini (Neh7, amino asitler 209-316) de tanımlandı. Bu domainin NRF2 repressörü olan retinoik X reseptörü ile

etkileşim halinde olduğu ve NRF2 hedef gen transkripsiyonunu baskıladığı gösterilmiştir (89).



Şekil 2. NRF2'nin Yapısal Özellikleri ve Korunmuş Domainlerinin Fonksiyonu. NRF2, Neh1-Neh7 olarak adlandırılan yedi adet domain içermektedir. N-terminal uçta bulunan Neh2 domaini, Keap1 ile etkileşim halinde olan iki bağlama motifi (DLG ve ETGE) içermektedir. Neh4, Neh5 ve Neh3 domainleri NRF2'nin transaktivasyon aktivitesi için gerekmektedir. Neh6 domaini NRF2 stabilitesini düzenleyen serin'den zengin bir bölgedir. Neh1 domaini NRF2'nin stabilitesi, DNA bağlaması ve MAF ile dimerizasyonu için önemli olan bir basic bölge lösin zipper motifi olduğu bildirilmiştir (83).

Hücreler oksidatif stres altında olduğunda veya kemopreventif bileşikler ile uyarıldığında NRF2, hücrel savunma yanıtını düzenleyen kritik bir faktör olmaktadır. NRF2'nin aktivasyonu, Cul3 içeren E3 ubiquitin ligaz için bir substrat adaptörü olan ve Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) olarak adlandırılan negatif bir düzenleyici tarafından düzenlenmektedir. Keap1 Yamamoto ve arkadaşları tarafından maya iki-hibrid sisteminde NRF2'nin Neh2 domaini kullanılarak klonlanmıştır (80,84). Keap1 cDNA dizisine dayanarak murine Keap1 primer yapısının 624 amino asitten oluştuğu tahmin edilmekte, insan ve fare arasında yaklaşık % 95 homoloji bulunmaktadır (84). Keap1, broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) domaini, intervening region (IVR) ve çift glisin tekrarı (DGR) olarak bilinen Kelch domaini içeren üç fonksiyonel domaine sahip olduğu bildirilmiştir (83,90) (şekil 3).



Şekil 3. Keap1 Proteininde Korunmuş Bölgelerin Şematik Yapısı. Keap1 üç ana domain içermektedir. BTB domaini Keap1 homodimerizasyonuna aracılık etmektedir. IVR domaini sistein rezidüleri içermekte ve C terminalinde Kelch/DGR domaini ile BTB domainini bağlamaktadır. Kelch/DGR domaini NRF2'nin Neh2 domaini ile bağlanmasına aracılık etmektedir (83).

BTB domaini Cul3'e bağlanmakta ve Keap1'in homomerik ve heteromeric multimerlerini yaparak, protein homodimerizasyonu ve heterodimerizasyonunda yer almaktadır (91). Buna ek olarak, BTB domaini proteozom bağımlı NRF2 degradasyonunda yer almaktadırlar (92). IVR domaini, Keap1'in aktivasyonu için vazgeçilmez olduğu kanıtlanan sisteinden zengin bir domain olması yanısıra BTB ve Kelch/DGR domainlerini bağlamaktadır (80). Keap1'in IVR domainindeki iki sisteinin (C273 ve C288) Keap1 aracılı NRF2 ubiquitilasyonu ve degradasyonu için gerekli olduğu rapor edilmiştir (93), fakat NRF2 ubiquitilasyonunda bu sisteinlerin temel rolü başkaları tarafından kabul edilmemiştir (92,94). Kelch/DGR domaini altı korunmuş Kelch tekrar dizisi içermektedir. Bu domain NRF2 aktin hücre iskeleti üzerine tutunduğunda NRF2'nin Neh2 domaini ile etkileşerek NRF2 ve Keap1 arasındaki etkileşimi sağlamak için çok önemli olduğu bildirilmiştir (84,95) (şekil 3). Böylece, bu üç domainin her birinin NRF2 ubiquitilasyonunda ve baskılanmasında aracılık ederek önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir (83).

İnsan Keap1'in Kelch domaininin kristal yapı analizi, bu domainin yapısal olarak benzer altı adet β -protein yapısına sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (96). Hidrojen bağları ile sıkı bir şekilde bağlı olan bu β -proteinlerin Keap1-NRF2'nin karmaşık yapısını oluşturduğuna ve Keap1'in aktine tutunduğuna inanılmaktadır. Aynı zamanda Keap1'in C-terminal bölgesinin de NRF2'nin Neh2 domainine bağlandığı gösterilmiştir (97). Keap1'in önemli ayırt edici özelliği, bu molekül içinde sistein rezidüelerinin yüksek sayıda bulunmasıdır. İnsan Keap1 proteini;

disülfidlerden sülfenik aside oksitlenebilen ya da elektrofiller tarafından kovalent bağlarla bağlanabilen 27 sistein rezidüelerine sahip iken, Murine ve rat Keap1'i 25 sistein rezidüelerine sahiptir (62,83). Keap1 üzerindeki tiyollerin modifikasyonu, onun yapısını değiştireceği ve düşük afiniteli bağlanma alanından (DLG motif) NRF2'nin salınması ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir; fakat NRF2 ETGE motifi vasıtasıyla Keap1'e bağlı kalmaktadır. Bu değişikliklerin NRF2 ubiquitinasyonunu önlediği düşünülmektedir (83).

Normal koşullar altında NRF2; Keap1 Kelch domaini ve NRF2'nin Neh2 domaini üzerinde bulunan ETGE ve DLG motifleri arasında doğrudan protein-protein etkileşimleri yoluyla Keap1 ile bir kompleks içinde bulunmaktadır (şekil 4). Keap1'in DLG motifine göre daha yüksek bir afinite ile ETGE motifine bağlandığı gösterilmiştir (83,98). Bu gözlemlere dayanarak, NRF2 ve Keap1 arasındaki etkileşimi açıklayan iki-alan substrat tanımlayan menteşe-mandal (hinge-and-latch) modeli geliştirilmiştir (98,99). Bu model Keap1'in ETGE motifi (menteşe) aracılığı ile NRF2'ye bağlandığını ve bu etkileşim kurulduktan sonra, DLG motifinin (mandal) Keap1 üzerindeki bitişik Kelch tekrar domainlerinin üzerine kenetlendiğini düşündürmektedir (83,98). Bu işbirlikçi etkileşimler, Keap1-Cul3-E3 ubiquitin ligaz kompleksinin düşük seviyede NRF2'yi korumak için NRF2 proteinini düzenlediğini (83) ve Keap1-NRF2 kompleksinin kararlılığına katkı sağladığını düşündürmektedir. Tüm bu gözlemler, Keap1-NRF2'nin kompleks oluşturduğunu ve hücre iskelet ağı etkileşimi yoluyla sitoplazmada tutulduğunu göstermektedir. Daha sonra oksidatif stres veya kemopreventif bileşiklere hücrelerin maruz kalması üzerine, NRF2 hücre koruyucu genlerin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla hızlı bir savunma yanıtı sağlamak için bu kompleksten serbest bırakılmaktadır, serbest NRF2 çekirdeğe doğru yer değiştirmektedir. Çekirdekte NRF2, Maf protein aile üyeleri ile dimer oluşturarak metabolik fonksiyonları yürüten birçok genin regülatör bölgelerinde bulunan ARE'ye bağlanmaktadır. NRF2'nin Maf protein aile üyeleri ile dimer oluşturmasının NRF2'nin ARE'ye bağlanmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (62,80) (şekil 4).

Keap1'in kesintiye uğradığı farelerde, NRF2 hedef genlerinin yüksek yapısal ekspresyonuna yol açarak, çekirdekte NRF2'nin aşırı birikimi gösterilmiştir (100). Bu fenotip Keap1::NRF2 çift knockout farelerde tamamen tersine dönmüştür. Bu

bulguların tümü, tek ve bileşik Knockout farelerde Keap1'in NRF2'nin negatif regülatörü olarak hareket ettiğine dair güçlü in vivo kanıtlar sağlamaktadır. Zipper ve Mulcahy (101) Keap1'in BTB domaini ile Keap1'in homodimerizasyonu sitoplazmada tutulan NRF2 için gerekli olduğunu kaydetmiştir. BTB domainindeki mutasyon Keap1 dimerizasyonunu bozmakta ve sitoplazmada NRF2'yi tutmak için Keap1'in yeteneğini ortadan kaldırmaktadır. Bu sonuçlar Keap1 dimerinin bozulması ile in vivo NRF2'nin serbest bırakılması arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Saflaştırılmış rekombinant mürin Keap1 ve NRF2'nin Neh2 domaini kullanılan in vitro bağlanma deneylerinde Keap1-NRF2 kompleksinin 2:1 oranında NRF2 ile Keap1'den meydana geldiği gösterilmiştir (102).

2.3.3. ARE: Antioksidan Yanıt Elemanı

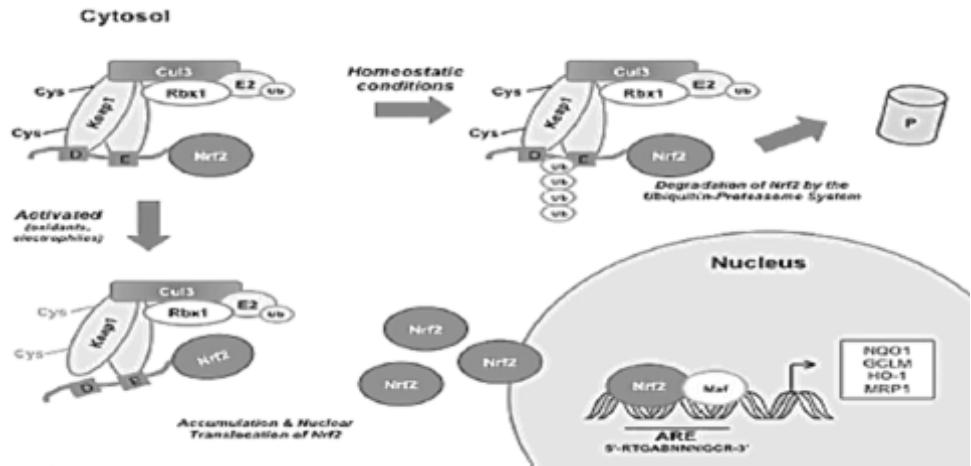
Antioksidan yanıt elemanı (antioxidant responsive element) ya da ARE, mutasyon ve delesyon analizleri ile NAD(P)H:quinone redüktaz geninin ve rat glutasyon s-transferaz Ya (GST Ya) geninin 5' bölgesinde DNA konsensüs motifi (gen enhancer) olarak tespit edilmiştir. Sekans analizleri, ARE'nin esas olarak 5'-puGTGACNNNGC-3' ve 3'-pyCACTGNNNCG-5' ile temsil edildiğini belirlemiştir. Burada N herhangi bir nükleotidi ifade etmektedir (103). Bu temel dizi antioksidanlar ve ksenobiyotiklere yanıt veren tüm NRF2 downstream genlerinde bulunmaktadır (24,80). NRF2 ARE'ye bağlanmakta ve antioksidanlar, ksenobiyotikler, metaller, UV ışını dahil çeşitli uyarılara yanıt olarak indüksiyon ve ARE-aracılı antioksidan enzim gen ekspresyonunu düzenlemektedir (104,105) (Şekil 4). Venugopal ve jaiswal'ın çalışmaları NRF2'nin ortak kökeninden gelen enhancer olarak ARE'nin gösterildiği ilk çalışma olmaktadır (104). Farklı türler arasında ARE dizilerinin benzer olup olmadığı ve tüm ARE ile düzenlenen genlerin ARE çekirdeğinde gerekli bir nükleotid dizisinin mevcut olup olmadığı cevap bekleyen sorular olmaktadır (106).

2.3.4. NRF2 Transkripsiyon Kompleksi

Oksidatif ve ksenobiyotik stres yanıtlarının Keap1-NRF2 regülasyon düzenleme çalışmaları nükleer/sitoplazmik işbirliğinin benzersiz bir biçimini ortaya koymuştur. İmmünohistokimyasal analizlerle Keap1'in esas olarak sitoplazmada lokalize olduğu gösterilmiştir. Kelch domaini sayesinde Keap1 sitoplazmada

NRF2'nin Neh2 domaini ile etkileşime girmektedir (62,107). Tek başına bu etkileşim sitoplazmada lokalize olan NRF2'yi tutmak için yetersiz olabilmektedir, ancak lazer konfokal mikroskopik immünohistokimyasal analizler Keap1'in aktin hücre iskeleti ile işbirliği içinde olduğunu göstermiştir (62,95). Aktin adhezyon yüzeyinin Kelch domaini ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (62). Oksidatif ve/veya elektrofilik bir uyarı da sitozolik NRF2 fiziksel olarak tutulumdan ve/veya Keap1'in negatif regülasyonundan kendini serbest bırakmakta ve böylece hedef hücre koruyucu genleri indükleyerek, NRF2 ile aynı kökenden gelen enhancer ARE'ye bağlanmak için hücre çekirdeğine doğru hareket etmektedir (şekil 4) (24,75,80).

NRF2 esasen MafK ve MafG'den oluşan small Maf (sMaf) proteinleri ile ortaklaşa nükleusta bir transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görmektedir (79). NRF2–Maf heterodimeri: (a) glutamat-sistein ligaz katalitik altbirimi (GCS) gibi glutasyon sentezini ve metabolizmasını düzenleyen enzimleri, (b) glutasyon peroksidaz (GPX) gibi reaktif türlerin nötralize edilmesinde görevli antioksidan proteinleri, (c) UDP-glucuronosyl-transferaz 1A1 gibi ilaç metabolit enzimleri, (d) çoklu ilaç direnci protein 1 (MRP1) içeren ksenobiyotik taşıyıcıları ve (e) çok sayıda diğer stres yanıt proteinlerini içeren genlerin transkripsiyonunu teşvik eden transkripsiyonel koaktivatörlere yardımcı olmaktadır (83).



Şekil 4. Keap1-NRF2-ARE Sinyalizasyon Yoluğunun Genel Şeması. Normal koşullar altında Keap1, NRF2 üzerinde bulunan ETGE ve DLG motiflerine bağlanmakta ve NRF2'nin ubiquitinyon ve daha sonraki degradasyonuna sebep olarak Keap1-Cul3-E3 ubiquitin ligaz kompleksi içine NRF2'yi getirmektedir. Oksidatif stres veya elektrofiller Keap1'de spesifik sistein rezidüleri üzerine etki ederek Keap1-Cul3-E3 ubiquitin ligaz kompleksinde yapısal değişikliklere neden olabilmektedir. Bu değişiklikler DLG domainine bağlanan NRF2-Keap1 yapısını bozabilmektedir. NRF2 stabil hale getirilmekte ve serbest NRF2 small Maf aile üyeleri ile dimerleştiği çekirdeğe doğru yer değiştirmektedir ve çeşitli hücre savunma genlerinin düzenleyici bölgeleri içinde ARE'lere (5'-puTGACNNNGC-3') bağlanmaktadır. (E) ETGE; (D) DLG (83).

2.3.5. Geleceğe Bakış

NRF2'nin kanserin önlenmesi, hücre korunması ve ilaç direncinde ki etkileri konusunda pek çok çalışma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar NRF2'yi ve NRF2'nin downstream genlerini düzenleyen intrasellüler yolları içeren tüm mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Ön çalışmalar NRF2 deaktivasyonunun NRF2 aktivasyonu kadar önemli olduğunu göstermektedir. Daha ileri çalışmalar NRF2 negatif regülasyonunun daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. NRF2'nin negatif regülasyonunun daha iyi anlaşılması sadece hedeflenen NRF2 aktivasyonunu değil aynı zamanda etkili kemopreventif bileşiklerin bilinmesine yardımcı olabilmektedir (24).

3. MOLEKÜLER TEKNİKLER

3.1. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) DNA molekülüne uygulanmaktadır. Buna karşılık RNA içeren genetik materyalin PZR ile belirlenmesinde RNA'nın DNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. Bu amaçla hücrelerden izole edilen ve amplifikasyonu (çoğaltılması) hedeflenen RNA molekülünün retrovirüslerden izole edilen revers transkriptaz (RNA bağımlı DNA polimeraz) enzimi yardımıyla komplementer (tamamlayıcı) DNA (cDNA)'ya sentezi (geri transkripsiyon) ve cDNA'nın da standart PZR yoluyla çoğaltılması revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon (RT-PZR) tekniği olarak adlandırılmaktadır. RT-PZR, RNA'nın çoğaltması için geliştirilmiştir, ayrıca mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında da oldukça duyarlı bir yöntemdir (108,109). Aynı zamanda bu yöntem az sayıda hücre örneğinden aynı anda fazla sayıda RNA'nın incelenmesini sağlayan çok duyarlı bir tekniktir (109).

cDNA sentezinde kullanılacak, çeşitli kaynaklardan izole edilmiş revers transkriptaz enzimleri bulunmaktadır. Bunlar; retrovirüslerden elde edilen AMV (Avian Myeloblastosis Virus), MMLV (moloney murine leukemia virus), HIV-1 (human immunodeficiency virus) virüslerine ait revers transkriptaz enzimleri ve ökaryotik kromozomlarda telomerlerin devamlılığını sağlayan telomeraz revers transkriptaz enzimleri gibi enzimlerdir (109). Ayrıca cDNA sentez reaksiyonları için

üç çeşit primer kullanılmaktadır. Bunlar; random-hegzamer primerler, oligo (dT) primerler ve gen spesifik primerlerdir (GSP).

3.2. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Higuchi ve arkadaşları, çoğaltılabilen herhangi bir DNA dizisi için aynı anda birden fazla PZR'yi tarayan basit ve kantitatif bir sistem geliştirmiştir. Bu eş zamanlı sistem PZR analizinin kinetik yaklaşımına öncülük eden ve daha geniş bir aralıkta hassas DNA ölçümü yapabilen bir sistemdir (110). Real time polimeraz zincir reaksiyon (gerçek zamanlı PZR) teknolojisi, PZR amplifikasyonunu bilgisayar sistemi ile görünür hale getiren, floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresan miktarının oluşan DNA miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir (111,112).

DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA düzeyini sayısal olarak belirleyebilme gerçek zamanlı PZR'nin en yaygın kullanım alanlarını oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra tek nokta mutasyonlarını, patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphisms=SNP) analizi, kromozomlardaki sayısal ve yapısal bozuklukların tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları bulunmaktadır (112,113). Gerçek zamanlı PZR teknolojisinde spesifik (özgül) olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında SYBR Green I ve etidyum bromid boyaları kullanılır iken, DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi, özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında TaqMan prob, moleküler boncuk, fluorescence resonance energy transfer (FRET), hibridizasyon prob ve scorpion primer gibi floresan işaretli problemler kullanılmaktadır (113).

3.2.1. SYBR Green I

SYBR Green I (SG)'in çift zincirli DNA ile etkileşiminin ardından parlaklığının büyük ölçüde artması (>1000 kat) nedeniyle, DNA tespiti ve çeşitli analiz tekniklerinde kullanılmıştır. SG boyasının spektral özellikleri ve nükleik asitlere bağlanma özellikleri hakkında detaylı bir bilginin olmamasına rağmen bu boyanın kullanımı büyük ölçüde başarılı olmuştur (114). Çift zincirli DNA varlığında, SG'nin floresan özelliğinin önemli ölçüde arttığı (duyarlılık<10 pg/ml) gösterilmiştir (115). Bu özellikler SG'nin özellikle gerçek zamanlı PZR analizinde

DNA tespiti (116), kromozom boyama ve DNA saptama analizleri (117) dahil çok sayıda moleküler biyoloji uygulamalarında giderek önem kazanmaktadır (118). SG boyası sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından, gerçek zamanlı PZR cihazında çoğalan DNA miktarındaki artışla beraber SG'nin floresan miktarı da eş zamanlı olarak artmakta ve bu artış gerçek zamanlı PZR cihazının monitöründe izlenebilmektedir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybetmektedir (112).

Floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonları göstermemektedir. Çünkü çift sarmal DNA'ya bağlanabilen SG, ortamda hedef DNA dizisi olmadığına bile primerlerin kendi aralarında gerçekleşen bağlanmaları (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri ("melting curve", "dissociation") yapılması gerekmektedir. Her bir DNA'nın, çift sarmal yapısının %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık değeri erime noktası (melting curve-T_m) olarak adlandırılır. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PZR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= T_m) floresan boya serbest kalmakta ve okunan floresan miktarı da düşmektedir. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklık (T_m) derecesi bulunmaktadır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlı olmaktadır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer'lerinde) aradığımız DNA parçasının T_m derecesi arasında farklılık olmaktadır. T_m derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindedir. Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için spesifik olmaktadır. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir (119).

3.3. Spektrofotometrik ölçüm

DNA, RNA ve oligonükleotidler seyreltilmiş veya seyreltilmemiş sıvı solüsyonlar içinde, ultraviyole ışığı altında (aynı zamanda görünür dalga boylarında) sahip oldukları absorpsiyon A (optik yoğunluk, OD) üzerinden ölçülebilmektedir. NanoDrop spektrofotometre sistemleri kullanılarak çok düşük hacimli (0,5-2 µL) örneklerin konsantrasyon ve saflık dereceleri kısa bir süre içinde ölçülebilmekte,

hassas, güvenilir ölçümler yapılabilir. Çeşitli örnek türlerini ölçmek için geniş bir spektral aralığına (190-840nm) sahip olmaları nedeniyle yüksek konsantrasyonlu örneklerde bile dilüsyon yapmaya gerek görülmemektedir. Nükleik asitlerin konsantrasyonu genellikle bir köre (boş örnek) karşı 260 nm'de absorpsiyon A ölçülerek belirlenmektedir. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilmektedir. Proteinler 280 nm'de absorbladığı için A_{260}/A_{280} oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılmaktadır. Saf DNA yaklaşık 1,8 oranında, saf RNA ise yaklaşık 2,0 oranında bir değer vermektedir. Yani A_{260}/A_{280} oranı 1,8 den büyük ise RNA konsantrasyonunu, 1,8 den küçük ise protein konsantrasyonunu göstermektedir. NanoDrop spektrofotometre sistemlerinde ölçüm yapılır iken örneği bir kolon halinde tutabilmek için yüzey gerilimi kullanılmaktadır. 1 μ L örnek sistem pedalının üzerine pipetlenmekte, ölçüm kolonu iki optik fiberler arasında oluşturulmakta ve ölçüm yapılmaktadır. Sonuçlar 15 saniyeden daha kısa bir sürede alınmaktadır (Thermo Scientific, NanoDrop 2000).

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1. Gerekli Ekipmanlar

Santrüfuj	Hettich
Mikrosantrüfuj	Hettich mikro 120
Laminar Flow	Qualitec
-80 °C derin dondurucu	New Brunswick/U410
-20 °C derin dondurucu	Arçelik
Sıvı azot sistemi	Stirling sıvı azot sistemi
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Isı döngü cihazı (Thermal Cycler)	Bio Rad
Gerçek zamanlı PZR cihazı	Qiagen, Rotor-Gene Q
NanoDrop cihazı	Thermo Scientific
Kolorimetrik microplate reader	Biotek, GEN5 software
Vorteks	
Çok kanallı pipetler	Eppendorf
Otomatik pipetler ve pipet uçları	Eppendorf
Otomatik steril RNase-DNase free pipet uçları	Qiagen
0.2 ml, 1.5 ml ve 2 ml mikrosantrüfuj tüpleri	Qiagen
Falkon tüpler (15 ml)	Isolab
Cryovial (3ml)	Isolab
96 kuyucuklu mikroplayt (96 wells-F, sterile)	VWR, 734-2327

4.2. Gerekli Kimyasallar

Chloroform	Riedel-de Haen, 24216
Ethanol (%70)	Merck, 1.00983.2511
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (D6429)
Superoksit dismutaz analiz kiti (SOD)	Abcam, ab65354
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (A3672)
Total RNA izolasyon kiti	Qiagen (cat no: 74804)
cDNA izolasyon kiti	Qiagen (cat no: 330411)
Gerçek zamanlı PZR analiz kiti	Qiagen (cat no: 330001)

4.3. Çalışma Populasyonu

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından “2013/119” karar numarası ile onaylandı (Bkz. EK A) ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinatörlüğü tarafından 2013 yılı “131318008” proje numarası ile desteklendi. Çalışma populasyonu Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi ve Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarına 2013-2015 yılları arasında infertilite şikayeti ile başvuran erkek olgulardan seçildi. Çalışmaya alınan olguların yazılı onamları alındıktan sonra tıbbi geçmişi, yaşam tarzı (sigara ve alkol kullanımı), çocuk sayısı (yaşayan, düşük, ölü doğum), evlilik ve akrabalık durumu, aşılama ve tüp bebek uygulaması ile ilgili yapılandırılmış bir anket ile verileri toplandı. Olgu seçiminde: a) 25 - 50 yaş arası erkek hasta olmak, b) semen analizi yapılmış olmak, c) semen analizinde asthenozoospermi, oligoasthenozoospermi ve normozoospermi tespit edilmiş olmak, d) sperm kalitesini etkileyecek bilinen bir sistemik hastalığı olmamak gibi kriterler belirlendi. ‘World Health Organization’ (WHO-1992) kriterlerine göre değerlendirilen spermiyogram analizleri doğrultusunda 33 asthenozoospermik ve 8 oligoasthenozoospermik olmak üzere toplam 41 hastadan oluşan çalışma grubu ile 48 sağlıklı bireyden oluşan

normozoospermik kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubunun yaş ortalaması $29,8 \pm 4,0$ yıl ve yaş aralığı (min-max) 26 - 41 yıl idi. Çalışma grubunun ise yaş ortalaması $32,8 \pm 4,7$ yıl ve yaş aralığı (min-max) 26 - 43 yıl idi.

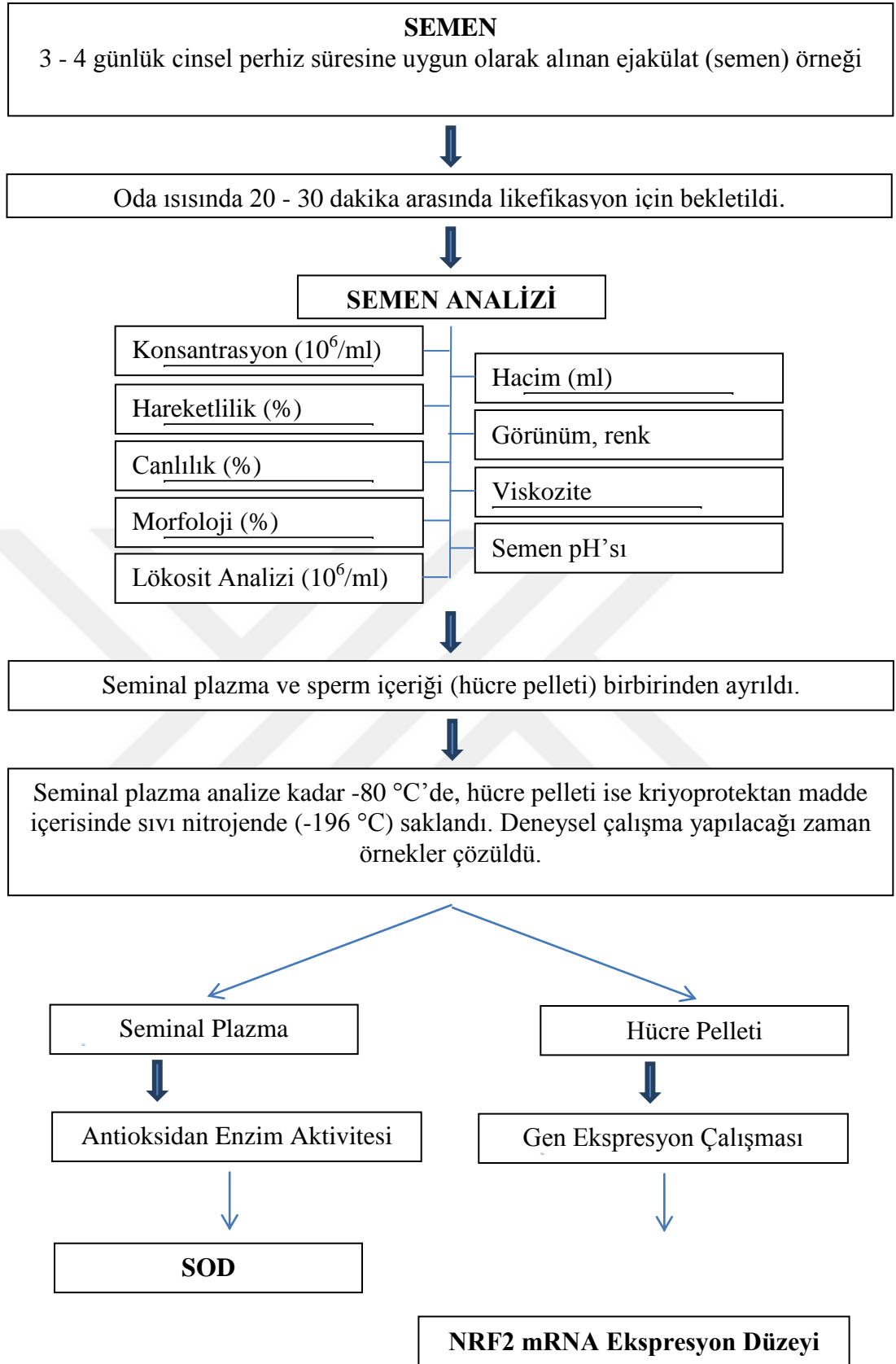
4.4. Semen Örneklerinin Temini ve Gruplandırılması

Ejakülat (semen) örnekleri üç ve/veya dört günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yöntemi ile elde edildi. Mastürbasyon yoluyla elde edilen semen örneği steril ve toksik olmayan, geniş ağızlı plastik kapta toplandı. Semen örneklerinin likefaksiyonu için oda ısısında 20-30 dakika beklendi. Ardından 'World Health Organization' (WHO-1992) kriterlerine göre spermiyogram (semen analizi) parametreleri açısından değerlendirildi. Kalan semen örneği 500xg devirde 10 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası seminal plazma analize kadar -80°C 'de saklandı. Bir miktar seminal plazma (yaklaşık 200 μl) ihtiva eden hücre pelleti kriyoprotektan madde (DMSO ile desteklenmiş DMEM besiyeri) içerisinde sırasıyla -20°C 'de 30 dakika, -80°C 'de bir gece ve hemen ardından da analize kadar -196°C 'de sıvı nitrojende donduruldu.

4.5. Yöntemler

Genel olarak çalışma beş kısımdan oluşmaktadır.

- a. Semen analizi,
- b. Seminal plazma superoxide dismutase (SOD) aktivitesinin kolorimetrik yöntem ile ölçülmesi,
- c. Sperm pellet örneklerinden total RNA izolasyonu,
- d. Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu,
- e. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin analizi (şekil 5).



Şekil 5. Deneysel Çalışma Planı.

4.5.1. Semen Analizi

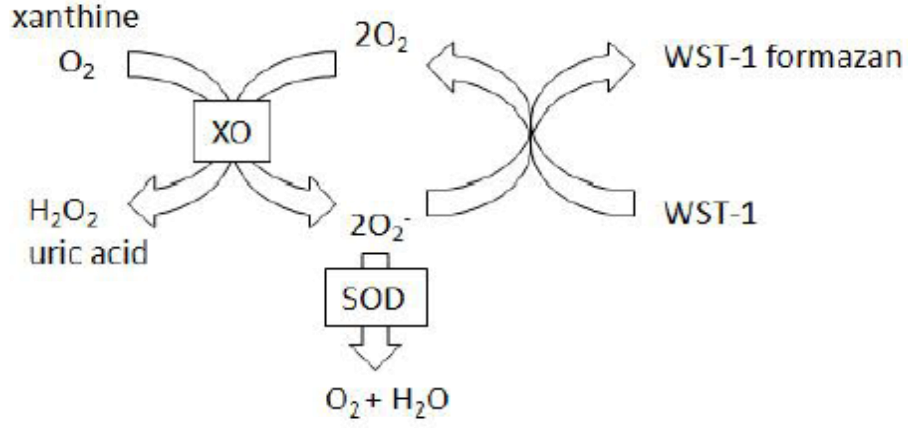
Semen analizi, infertil erkeğin değerlendirilmesinde fertilité potansiyelini belirleyen önemli unsurlardan biridir. Çalışmaya alınan her bir olgunun spermiyogram analizi (semen analizi), likefaksiyondan hemen sonra semenin gözlenmesi ile başlandı. Bunun için yapılan ilk makroskobik incelemede görünüm, renk, likefaksiyon zamanı, viskozite, hacim, semen pH'ı değerlendirildi. Semen analizinin en önemli kısmını içeren mikroskopik değerlendirme sırasında ise sperm hareketliliği, sperm canlılığı, total sperm sayısı, sperm konsantrasyonu, sperm morfolojisi gibi spermiyogram analiz parametreleri değerlendirildi. Mikroskobik değerlendirme faz kontrast mikroskobu ile makler sperm sayma kamerası kullanılarak semenin bir kez incelenmesi sonucunda elde edildi. Mikroskobik değerlendirme sonucunda spermiyogram analizi WHO (1992) kriterlerine göre yorumlandı.

4.5.2. Seminal Plazma Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Analizi

En önemli antioksidan enzimlerden biri olan SOD'un aktivitesi Superoxide Dismutase Activity Colorimetric Assay kitin protokolü (Abcam, ab65354) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu analiz için microplate reader (ELx-800, Biotek) sisteminin GEN5 software'i kullanıldı. Abcam'ın bu kiti, süperoksit anyonu ile indirgenmesi üzerine suda çözünen renkli formazan boya üreten WST-1 (water soluble tetrazolium salt)'i kullanan hassas bir kittir. Süperoksit anyonu ile indirgenme oranı ksantin oksidaz (XO) aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir ve SOD tarafından inhibe edilir (Şekil 6). Böylece SOD'un inhibisyon aktivitesi kolorimetrik yöntem ile 450 nm dalga boyunda absorbans değeri belirlendi (Abcam, ab65354).

Enzim bulunmayan kör değer ile enzim bulunan numune absorbans değeri hesaba katılarak enzimin % inhibisyon oranı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı (Abcam, ab65354).

$$\text{SOD Activity (inhibition rate \%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$



Şekil 6. Süperoksit Dismutaz Aktivite Analizinin (Kolorimetrik) Prensibi (Abcam, ab65354).

Superoxide Dismutase Activity Colorimetric Assay Kitinin Kimyasal Bileşenleri

SOD Analiz Buffer (WM)

SOD Dilüsyon Buffer (NM)

SOD Enzim Solüsyonu (Green)

WST Solüsyonu (Red)

WST çalışma solüsyonu: 1 ml WST solüsyonu, 19 ml analiz buffer solüsyonu ile dilüe edildi. Bu seyreltilmiş çözelti 4 °C'de 2 aya kadar stabildir.

Enzim çalışma solüsyonu: Enzim solüsyonu 5 saniye santrüfuj edildi. Pipetleme ile iyice karıştırıldı (enzim iki kata sahip olduğu için bu adım gereklidir ve dilüsyondan önce iyice karıştırılmalıdır). 15 µl enzim solüsyonu, 2.5 ml dilüsyon buffer ile dilüe edildi. Seyreltilmiş enzim solüsyonu 4 °C'de 3 haftaya kadar stabildir.

4.5.2.1. Yöntem

1. Her örnek kuyucuğuna ve blank 2 kuyucuğuna hazırlanmış örnekten 20 µl eklendi. Her blank 1 ve blank 3 kuyucuğuna da distile sudan 20 µl eklendi.
2. Her kuyuya WST çalışma solüsyonundan 200 µl eklendi.
3. Her blank 2 ve blank 3 kuyucuğuna dilüsyon buffer'ından 20 µl eklendi.

- Her örnek ve blank 1 kuyucuğuna enzim çalışma solüsyonundan 20 µl eklendi ve iyice karıştırıldı (Tablo 1).

NOT: süperoksit her kuyuya enzim çalışma solüsyonunun eklenmesinden hemen sonra salınacağı için her kuyunun reaksiyon zaman farkını önlemek için çok kanallı pipet kullanıldı.

- 37 °C'de 20 dakika 96 kuyucuklu mikroplayt inkübe edildi.
- Microplate reader kullanılarak 450 nm'de absorbans değeri ölçüldü.

Tablo 1. Her Bir Kuyucuk İçin Çözelti Miktarı

	Örnek (µl)	Blank 1 (µl)	Blank 2 (µl)	Blank 3 (µl)
Örnek Çözeltisi	20	--	20	--
ddH₂O	--	20	--	20
WST çalışma solüsyonu	200	200	200	200
Enzim çalışma solüsyonu	20	20	--	--
Dilüsyon Buffer	--	--	20	20
Total Hacim	240	240	240	240

4.5.3. Sperm Pellet Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Hücreler (hücre pelleti) sıvı nitrojenden alınarak 37 °C'de 30-60 saniye içinde hızlı bir şekilde çözüldü. Dondurma tüpündeki (Cryovial) numune bir santrifüj tüpüne alınarak, üzerine 2 ml DMEM besiyeri konulup 500xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldıktan sonra dibe çökmüş olan hücreler RNeasy Lipid Tissue Mini kitin protokolü (Qiagene, Shanghai, China) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometre (Thermo Scientific, NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer) sistemi kullanılarak ölçüldü, RNA'ların saflık oranlarını 260/280 nm arasında değerlendirildi ve komplementer DNA (cDNA) izolasyonuna kadar -80 °C'de saklandı.

RNeasy Lipid Tissue Mini Kitin Kimyasal Bileşenleri

QIAzol Lysis Reagent: hücre zarını lizis eden ve RNA'ların açığa çıkmasını sağlayan tampon.

Buffer RW1: etanol içerikli yıkama tamponu

Buffer RPE: son yıkama solusyonu

RNase-Free Water: RNase içermeyen moleküler çalışmalara özgü su

4.5.3.1. Yöntem

1. Hasta sayısı kadar ependorf tüpü alındı ve tüplere hasta ismi, numara vs yazıldı.
2. Sperm pelleti üzerine 1ml QIAzol Lysis Reagent solüsyonu eklendi.
3. Bu karışım ependorf tüplerine aktarıldı.
4. Oda ısısında (15-25⁰C) 5 dak inkübe edildi.
5. 200 µl chloroform eklendi ve 15 sn kuvvetlice vortex yapıldı.
6. Oda ısısında 2-3 dak inkübe edildi.
7. 12.000xg 15 dak 4⁰C'de santrüfuj yapıldı.
8. Santrüfuj sonunda üst kısımda nükleik asitler, orta kısımda ise proteinler toplandı.
9. Üst kısımda bulunan nükleik asitler dikkatlice toplandı ve yeni ependorf tüplerine alındı.
10. Üzerine topladığınız nükleik asit miktarı kadar % 70 ethanol eklendi, vortex yapıldı.
11. Bu karışımdan 700 µl alınıp 2 ml kolleksin tüpü içinde bulunan RNeasy Mini spin kolon tüpüne eklendi. Kolon tüpü kapatıldı.
12. 8000xg 15 sn oda ısısında santrüfuj yapıldı. Santrüfujden sonra kolleksin tüpünde birikenler döküldü.
13. Aynı kolleksin tüpü ve RNeasy Mini spin kolon tüpünü kullanarak geri kalan örnek ile sırasıyla basamak 11. ve 12. basamaklar tekrarlandı.

14. RNeasy Mini spin kolon tüpüne RW1 Buffer solüsyonundan 700 µl eklendi. Kolon tüpü kapatıldı.
15. 8000xg 15 sn oda ısısında santrüfuj yapıldı. Santrüfujden sonra kolleksin tüpünde birikenler döküldü.
16. RNeasy Mini spin kolon tüpüne RPE Buffer solüsyonundan 500 µl eklendi. Kolon tüpü kapatıldı.
17. 8000xg 15 sn oda ısısında santrüfuj yapıldı. Santrüfujden sonra kolleksin tüpünde birikenler döküldü.
18. RNeasy Mini spin kolon tüpüne RPE Buffer solüsyonundan 500 µl eklendi. Kolon tüpü kapatıldı.
19. 8000xg 2 dak oda ısısında santrüfuj yapıldı.
20. RNeasy Mini spin kolon tüpü yeni 1,5 ml'lik tüpe alındı.
21. Üzerine 30-50 µl (yaklaşık 35 µl) RNase-free water eklendi. Kolon tüpü kapatıldı.
22. 8000xg 1 dak oda ısısında santrüfuj yapıldı.
23. 1,5 ml tüpte birikenler total RNA'dır.
24. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop cihazında 260-280 dalga boyu arasında ölçüldü.
25. Total RNA'lar cDNA elde edilinceye kadar -80 °C'de saklandı.

4.5.4. Komplementer DNA İzolasyonu

Komplementer DNA (cDNA), mRNA'dan sentezlenen DNA kopyasıdır. Bu reaksiyonda revers transkriptaz enzimi kullanılır. Revers transkriptaz RNA bağımlı bir DNA polimerazdır. Total RNA'dan cDNA izolasyonu RT² HT First Strand kitin protokolü (Qiagene, Shanghai, China) kullanılarak RT-PZR yöntemiyle gerçekleştirildi ve gerçek zamanlı PZR analizine kadar -20 °C'de saklandı.

RT² HT First Strand Kitin Kimyasal Bileşenleri

RT² HT First Strand kitin prosedürü iki aşamadan oluşmaktadır: genomik DNA kontaminasyonunun uzaklaştırılması, RNA örneklerinin hızlı ve kolay kullanımını sağlayan revers transkripsiyonu.

Buffer GE2 (gDNA elimination buffer): genomik DNA eliminasyon tamponu, RNA örneklerinde kalan genomik DNA'yı etkili bir şekilde uzaklaştırır.

BC4 Revers Transkriptaz Mix: Genomik DNA uzaklaştırıldıktan sonra, RNA örnekleri revers transkripsiyon için hazırdır. Bu işlem için kullanılan revers transkripsiyon master mix ilk cDNA zincir sentezi için her bir bileşeni [random (hexamer) ve oligo-dT primerler, MMLV revers transkriptaz, optimize magnezyum konsantrasyonu, revers transkriptaz buffer, dNTP'ler, RNaz inhibitörü] içerir.

4.5.4.1. Yöntem

1. GE2 and BC4 revers transkriptaz mix tampon'ları -20 °C'den çıkarıldı ve buz üzerinde eritildi.
2. Mix tampon'lar çözüldükten sonra kısa bir santrifüj yapıldı. Kullanılana kadar mix tampon'lar buz üzerinde muhafaza edildi.
3. Hasta sayısı kadar 0,2 ml ependorf tüpü alındı. Hasta isimlerine göre numaralandırıldı.
4. Bu tüpler soğuk bloğa dizildi.
5. Her bir tüpe 6 µl GE2 revers transkriptaz mix buffer eklenildi.
6. Her bir tüpün üzerine 8 µl RNA örneği eklenildi. Pipetaj yapıldı.
7. Thermal cycler'da 37 °C'de 5 dak inkübe edildi.
8. İnkübasyondan sonra her bir tüpe 6 µl BC4 revers transkriptaz mix buffer eklenildi.
9. Thermal cycler'da;
42 °C'de 15 dak

95 °C'de 5 dak

4 °C'de sonsuzda bekletildi.

10. Bitmiş olan bu reaksiyon gerçek zamanlı PZR işlemine kadar buz üzerinde veya uzun süreli kullanım için -20 °C'de saklanılır.

4.5.5. NRF2 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Analizi

NRF2 mRNA ekspresyon düzeyi RT² qPZR Primer Assay kitin protokolü (Qiagene, Shanghai, China) kullanılarak gerçek zamanlı PZR (Rotor-Gene Q, QIAGEN) yöntemi ile gerçekleştirildi. Cihaza tek seferde 36 yükleme yapılabildiğinden 41 çalışma grubu ve 48 kontrol grubundan oluşan 89 test için 3 kez çalışma yapıldı.

RT² qPZR Primer Assay Kitin Kimyasal Bileşenleri

RT² SYBR Green Mastermix

RT² qPZR Primerler

- hedef gen (NRF2) primeri
- house keeping gen (GAPDH) primeri

RNase-free water

4.5.5.1. Yöntem

1. Çalışmaya başlamadan önce RT² SYBR Green Mastermix, RT² qPZR Primerler, sentezlenen cDNA'lar kısa bir süre santrifüj edildi.

NOT: RT² SYBR Green Mastermix HotStart DNA Taq polimeraz içerdiğinden sadece ısı aktivasyonu sonrası aktifleşir. Bu nedenle reaksiyonlar oda sıcaklığında (15-25°C) hazırlandı.

2. Tablo 2'de tarif edildiği gibi, 5 ml'lik bir tüp içinde PZR bileşenleri karışımı hazırlandı.

Tablo 2. Bir Reaksiyon İçin PZR Bileşenleri Karışımı

Bileşenler	Hacim (µL)
RT² SYBR Green Mastermix	12.5
Sentezlenen cDNA	1
RT² qPZR Primer	1
RNase-free water	10.5
Total Hacim	25

3. PZR bileşenleri karışımı kısa bir süre santrifüj edildi ve gerçek zamanlı PZR döngü sistemine yerleştirildi. Ayrıca 50 kontrol grubunun cDNA'ları ile de aynı işlemler tekrarlandı.
4. Son olarak gerçek zamanlı PZR sisteminin monitöründen 'Rotor-Gene Q Series Software, QIAGEN' programındaki süre, döngü ve ısı değerleri seçilerek çalışma başlatıldı.

Denatürasyon: 95°C'de 10 dakika 1 döngü

Cycling: 95°C'de 15 saniye

60°C'de 30 saniye

40 döngü

Cooling: 4°C

4.6. İstatistiksel Analiz

Yapılan bu çalışmada, asthenozoospermili ve oligoasthenozoospermili çalışma grubu ile normozoospermili kontrol grubundaki olguların semen parametreleri açısından karşılaştırılması ve bu iki grup arasında seminal plazma SOD aktivite düzeyinin ve NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucu anlamlı bir farklılığın olup olmadığını belirlemek amacı ile Independent Sample Mann-Whitney U testi kullanıldı. Seminal plazma SOD aktivite düzeyi (%) ve NRF2 mRNA ekspresyon düzeyi (Δ CT) ortalama değer \pm standart sapma şeklinde verildi. NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin sperm kalitesi ve seminal plazma SOD aktivitesi arasındaki korelasyon katsayısını belirlemek amacı ile Spearman correlation testi kullanıldı. İstatistiksel analizler için SPSS 20.0 programı kullanıldı ve $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Çalışma Populasyonunun Semen Parametreleri

Çalışmaya, yaş ortalaması 32.8 ± 4.7 (26-43) yıl olan, asthenozoospermik ve oligoasthenozoospermik 41 hastadan oluşan çalışma grubu ile yaş ortalaması 29.8 ± 4.0 (26-41) yıl olan, normozoospermik 48 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edildi. Çalışma grubu ile sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması ve semen parametreleri tablo 3'te verilmektedir. Bu veriler doğrultusunda istatistiksel olarak yapılan değerlendirmede iki grup arasında yaş ortalaması açısından fark saptandı ($P=0.003$) (tablo 3). Yapılan istatistiksel değerlendirmede sperm konsantrasyonu ($50.3 \times 10^6/\text{ml}$ ve $86.7 \times 10^6/\text{ml}$), canlılık (%77 ve %90), progresif hareketlilik (%32 ve %60) gibi temel semen parametreleri çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük ($P<0.001$) (tablo 3) iken iki grup arasında non-progresif hareketlilik (%14 ve %14) açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.630$) (tablo 3). Ayrıca hareketsiz sperm oranı (%52 ve %24) ve anormal spermatozoa oranı (%90 ve %84) çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $P<0.001$, $P=0.001$) (tablo 3).

Tablo 3. Kontrol ve Çalışma Grubunun Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n: 48)	Çalışma Grubu (n: 41)	P Değeri
Yaş (yıl)^a	29.8 ± 4.0	32.8 ± 4.7^b	0.003
Konsantrasyon ($10^6/\text{ml}$)^a	86.7 ± 54.8	50.3 ± 50.5^b	0.000
Canlılık (%)^a	90 ± 5	77 ± 13^b	0.000
Progresif hareketlilik (%)^a	60 ± 7	32 ± 12^b	0.000
Non- progresif hareketlilik (%)^a	14 ± 6	14 ± 7^b	0.630*
Hareketsiz sperm oranı (%)^a	24 ± 9	52 ± 16^b	0.000
Anormal spermatozoa oranı (%)^a	84 ± 9	90 ± 6^b	0.001

^a: veriler ortalama değer \pm standart sapma şeklinde verildi.

^b: Independent Sample Mann-Whitney U testi kullanılarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

*: istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

$P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışma grubu ile sağlıklı kontrol grubu sigara içen ve içmeyen olgular olmak üzere alt gruplara ayrıldı. Kontrol grubunda sigara içen 30 olgu (yaş ortalaması 29.5 ± 3.9), sigara içmeyen 18 olgu (yaş ortalaması 30.3 ± 4.2) bulunur iken çalışma

grubunda sigara içen 25 olgu (yaş ortalaması 32.7±4.3), sigara içmeyen 16 olgu (yaş ortalaması 32.9±5.5) bulunmaktadır.

Sigara içen çalışma grubu ile sağlıklı kontrol grubunun semen parametreleri tablo 4’te verilmektedir. Bu veriler doğrultusunda sigara içen çalışma grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak yapılan değerlendirmede sperm konsantrasyonu (60.9x10⁶/ml ve 91.2x10⁶/ml), canlılık (%76 ve %89), progresif hareketlilik (%33 ve %61) gibi temel semen parametreleri çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük (sırasıyla $P=0.016$, $P<0.001$, $P<0.001$) (tablo 4) iken iki grup arasında non-progresif hareketlilik (%14 ve %13) açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.392$) (tablo 4). Ayrıca hareketsiz sperm oranı (%51 ve %25) ve anormal spermatozoa oranı (%89 ve %84) çalışma grubunda kontrol grubuna göre yüksekti (sırasıyla $P<0.001$, $P=0.051$) (tablo 4).

Tablo 4. Sigara İçen Kontrol ve Çalışma Grubunun Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması

Sigara İçen Olgular			
	Kontrol Grubu (n: 30)	Çalışma Grubu (n: 25)	<i>P</i> Değeri
Yaş (yıl) ^a	29.5 ± 3.9	32.7 ± 4.3 ^b	0.006
Konsantrasyon (10 ⁶ /ml) ^a	91.2 ± 59.2	60.9 ± 60.5 ^b	0.016
Canlılık (%) ^a	89 ± 6	76 ± 14 ^b	0.000
Progresif hareketlilik (%) ^a	61 ± 7	33 ± 12 ^b	0.000
Non-progresif hareketlilik (%) ^a	13 ± 6	14 ± 6 ^b	0.392*
Hareketsiz sperm oranı (%) ^a	25 ± 8	51 ± 15 ^b	0.000
Anormal spermatozoa oranı (%) ^a	84 ± 9	89 ± 7 ^b	0.050

^a : veriler ortalama değer ± standart sapma şeklinde verildi.

^b : Independent Sample Mann-Whitney U testi kullanılarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

* : istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

$P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sigara içmeyen çalışma grubu ile sağlıklı kontrol grubunun semen parametreleri tablo 5’te verilmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede sperm konsantrasyonu (33.7x10⁶/ml ve 79.3x10⁶/ml), canlılık (%78 ve %91), progresif hareketlilik (%31 ve %60) gibi temel semen parametreleri çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük ($P<0.001$) (tablo 5) iken iki grup arasında non-progresif hareketlilik (%14 ve %15) açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.851$) (tablo 5). Ayrıca hareketsiz sperm oranı (%54 ve %23) ve anormal

spermatozoa oranı (%92 ve %82) çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $P<0.001$, $P=0.004$) (tablo 5).

Tablo 5. Sigara İçmeyen Kontrol ve Çalışma Grubunun Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması

Sigara İçmeyen Olgular			
	Kontrol Grubu (n: 18)	Çalışma Grubu (n: 16)	P Değeri
Yaş (yıl)^a	30.3 ± 4.2	32.9 ± 5.5 ^b	0.198 [*]
Konsantrasyon (10⁶/ml)^a	79.3 ± 47.2	33.7 ± 21.8 ^b	0.000
Canlılık (%)^a	91 ± 3	78 ± 12 ^b	0.000
Progresif hareketlilik (%)^a	60 ± 6	31 ± 13 ^b	0.000
Non-progresif hareketlilik (%)^a	15 ± 7	14 ± 9 ^b	0.851 [*]
Hareketsiz sperm oranı (%)^a	23 ± 10	54 ± 19 ^b	0.000
Anormal spermatozoa oranı (%)^a	82 ± 11	92 ± 3 ^b	0.004

^a: veriler ortalama değer ± standart sapma şeklinde verildi.

^b: Independent Sample Mann-Whitney U testi kullanılarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

*: istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

$P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sigara kullanımının konsantrasyon, canlılık, progresif hareketlilik, non-progresif hareketlilik, hareketsiz sperm oranı, anormal spermatozoa oranı gibi temel semen kalite parametrelerine olan etkilerini bir başka açıdan incelediğimizde; çalışma grubunun sigara içen olgularının temel semen kalite parametrelerini sigara içmeyen olguları ile istatistiksel olarak karşılaştırdık (tablo 6). Yapılan istatistiksel değerlendirmede çalışma grubunun sigara içen olgularının temel semen kalite parametreleri sigara içmeyen olgularına göre anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0.05$) (tablo 6).

Tablo 6. Çalışma Grubunda Sigara Kullanımının Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması

Çalışma Grubu			
	Sigara İçen Olgular (n: 25)	Sigara İçmeyen Olgular (n: 16)	P Değeri ^b
Yaş (yıl) ^a	32.7 ± 4.3	32.9 ± 5.5	0.925 [*]
Konsantrasyon (10 ⁶ /ml) ^a	60.9 ± 60.5	33.7 ± 21.8	0.245 [*]
Canlılık (%) ^a	76 ± 14	78 ± 12	0.925 [*]
Progresif hareketlilik (%) ^a	33 ± 12	31 ± 13	0.640 [*]
Non-progresif hareketlilik (%) ^a	14 ± 6	14 ± 9	0.758 [*]
Hareketsiz sperm oranı (%) ^a	51 ± 15	54 ± 19	0.862 [*]
Anormal spermatozoa oranı (%) ^a	89 ± 7	92 ± 3	0.272 [*]

^a : veriler ortalama değer ± standart sapma şeklinde verildi.

^b : P değeri Independent Sample Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplandı.

* : istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kontrol grubunun sigara içen olgularının temel semen kalite parametrelerini sigara içmeyen olguları ile istatistiksel olarak karşılaştırdığımız da ise kontrol grubunun sigara içen olgularının temel semen kalite parametreleri sigara içmeyen olgularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P>0.05) (tablo 7).

Tablo 7. Kontrol Grubunda Sigara Kullanımının Semen Parametreleri Açısından Karşılaştırılması

Kontrol Grubu			
	Sigara İçen Olgular (n: 30)	Sigara İçmeyen Olgular (n: 18)	P Değeri ^b
Yaş (yıl) ^a	29.5 ± 3.9	30.3 ± 4.2	0.545 [*]
Konsantrasyon (10 ⁶ /ml) ^a	91.2 ± 59.2	79.3 ± 47.2	0.617 [*]
Canlılık (%) ^a	89 ± 6	91 ± 3	0.369 [*]
Progresif hareketlilik (%) ^a	61 ± 7	60 ± 6	0.790 [*]
Non-progresif hareketlilik (%) ^a	13 ± 6	15 ± 7	0.508 [*]
Hareketsiz sperm oranı (%) ^a	25 ± 8	23 ± 10	0.331 [*]
Anormal spermatozoa oranı (%) ^a	84 ± 9	82 ± 11	0.693 [*]

^a : veriler ortalama değer ± standart sapma şeklinde verildi.

^b : P değeri Independent Sample Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplandı.

* : istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.2. Spermatozoada NRF2 Antioksidan Genin mRNA Ekspresyon Düzeyi

Sperm hareketliliği farklı olan erkek olguların spermatozoalarında NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyi kantitatif gerçek zamanlı PZR ile ölçüldü. Çalışma grubunun NRF2 mRNA ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak

kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.633$) (tablo 8) (şekil 7).

Tablo 8. Kontrol ve Çalışma Grubunun NRF2 Antioksidan Gen Ekspresyonu

	Kontrol Grubu (n: 48) ^a	Çalışma Grubu (n: 41) ^a	P Değeri ^b
NRF2^c	5.34 ± 2.67	5.94 ± 3.20	0.633 [*]

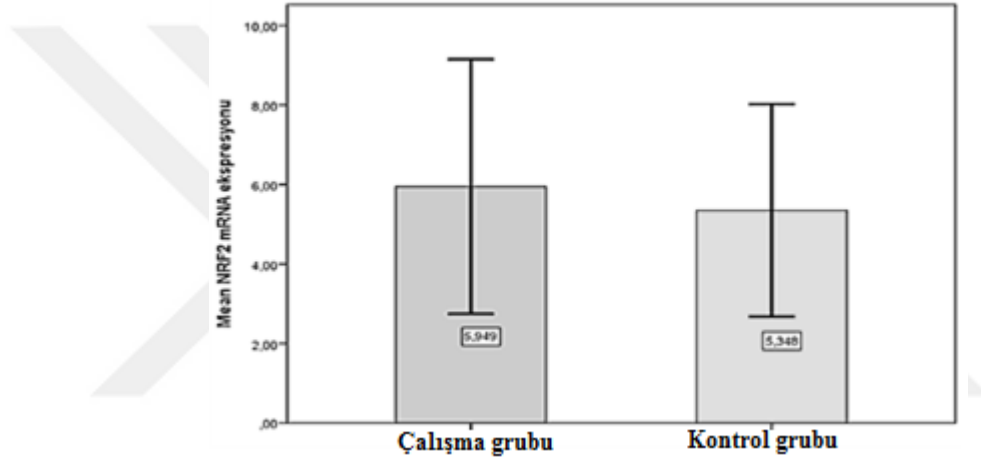
^a: veriler ortalama değer ± standart sapma şeklinde verildi.

^b: P değeri Independent Sample Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplandı.

^{*}: istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

^c: $\Delta CT = (C_T, \text{antioksidan gen} - C_T, \text{GAPDH})$

$P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 7. Çalışma Grubu ve Kontrol Grubunun Ortalama NRF2 mRNA Ekspresyonu.

5.3. Seminal Plazma SOD Aktivitesi

Çalışma ve kontrol grubunun seminal Plazma SOD aktivitesi tablo 9'da sunulmuştur. Çalışma ve kontrol grubunun ortalama seminal plazma SOD aktivite değerleri sırasıyla $99,6 \pm 34,4$ ve $100,2 \pm 20,4$ 'dur (tablo 9). Çalışma grubunun seminal plazma SOD aktivitesi istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.502$) (tablo 9) (şekil 8).

Tablo 9. Kontrol ve Çalışma Grubunun Seminal Plazma SOD Aktivitesi

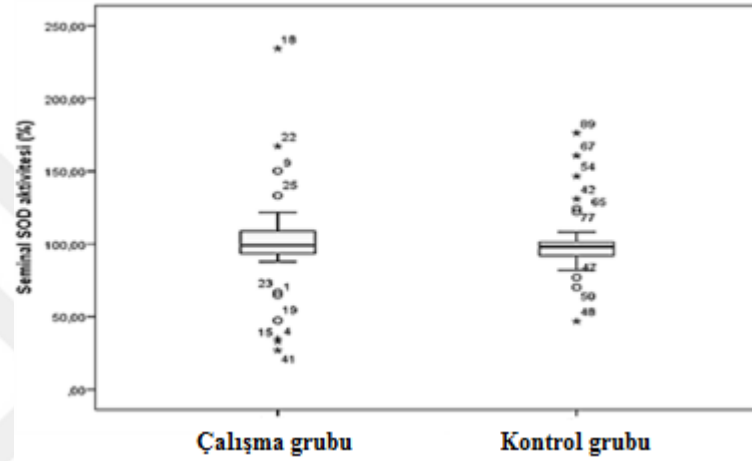
	Kontrol Grubu (n: 48)	Çalışma Grubu (n: 41)	P Değeri
Seminal Plazma SOD Aktivitesi (%)^a	100.2 ± 20.4	99.6 ± 34.4 ^b	0.502 [*]

^a: veriler ortalama değer ± standart sapma şeklinde verildi.

^b: Independent Sample Mann-Whitney U testi kullanılarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

^{*}: istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 8. Çalışma Grubu ve Kontrol Grubunun Seminal Plazma SOD Aktivitesi.

5.4. NRF2 mRNA Ekspresyon Düzeyinin Sperm Kalitesi ve Seminal Plazma SOD Aktivitesi Arasındaki Korelasyonu

Spearman korelasyon analizi sonucunda NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin konsantrasyon, progresif ve non-progresif hareketlilik, hareketsiz sperm oranı, anormal spermatozoa oranı gibi temel semen parametreleri ile aralarında bir ilişki olmadığı ($P>0.05$) (tablo 10), fakat NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin çalışma grubunda canlılık ile ilişkili olduğu saptandı ($P=0.043$) (tablo 10). Anlamlılık değeri 0.043 olan bu negatif ilişki zayıf düzeyde (%31) olduğundan istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Ayrıca NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin seminal plazma SOD aktivitesi ile aralarında bir ilişki olmadığı saptandı ($P=0.533$) (tablo 10).

Tablo 10. NRF2 mRNA Ekspresyon Düzeyinin Sperm Kalitesi ve Seminal Plazma SOD Aktivitesi Arasındaki Korelasyonu

	Kontrol Grubu (n: 48)		Çalışma Grubu (n: 41)	
	Korelasyon katsayısı ^a	<i>P</i> Değeri	Korelasyon katsayısı ^a	<i>P</i> Değeri
Sperm konsantrasyonu	0.003	0.984	0.013	0.934
Sperm canlılığı	0.121	0.412	-0.318	0.043
Sperm progresif hareketlilik	-0.111	0.452	0.055	0.734
Sperm non-progresif hareketlilik	-0.106	0.475	0.075	0.640
Sperm hareketsiz sperm oranı	0.025	0.866	-0.052	0.747
Sperm anormal spermatozoa oranı	-0.036	0.810	-0.002	0.988
Seminal Plazma SOD aktivitesi	0.054	0.713	0.100	0.533

^a : korelasyon katsayısı Spearman correlation testi kullanılarak hesaplandı.
P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.5. Seminal Plazma SOD Aktivitesinin Sperm Kalitesi Arasındaki Korelasyonu

Spearman korelasyon analizi sonucunda Seminal plazma SOD aktivitesinin konsantrasyon, canlılık, progresif ve non-progresif hareketlilik, hareketsiz sperm oranı gibi temel semen parametreleri ile aralarında bir ilişki olmadığı (*P*>0.05) (tablo 11), fakat seminal plazma SOD aktivitesinin çalışma grubunda anormal spermatozoa oranı ile ilişkili olduğu saptandı (*P*=0.041) (tablo 11). Anlamlılık değeri 0.041 olan bu negatif ilişki zayıf düzeyde (%32) olduğundan istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi.

Tablo 11. Seminal Plazma SOD Aktivitesinin Sperm Kalitesi Arasındaki Korelasyonu

	Kontrol Grubu (n: 48)		Çalışma Grubu (n: 41)	
	Korelasyon katsayısı ^a	<i>P</i> Değeri	Korelasyon katsayısı ^a	<i>P</i> Değeri
Sperm konsantrasyonu	0.125	0.399	0.262	0.097
Sperm canlılığı	-0.188	0.200	0.051	0.753
Sperm progresif hareketlilik	0.093	0.531	-0.029	0.858
Sperm non-progresif hareketlilik	0.094	0.524	-0.012	0.941
Sperm hareketsiz sperm oranı	-0.174	0.237	0.051	0.749
Sperm anormal spermatozoa oranı	0.221	0.132	-0.325	0.041

^a : korelasyon katsayısı Spearman correlation testi kullanılarak hesaplandı.
P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sperm hareketliliğinde bozulma, yüksek seviyelerde sperm canlılığında azalma ve düşük spermatogenezis ile ilişkili olan oksidatif stress erkek infertilitesinin en yaygın sebeplerinden biri sayılmaktadır (16,22). NRF2, ROT'a karşı koruma için önemli olan antioksidan enzimleri kodlayan genlerin bazal ve indüklenebilir transkripsiyonunu düzenlemektedir (14,24). Yapılan çalışmalarda insan ejakulat spermatozoasında mRNA'nın varlığı belirlenerek (120,121,122) olgun spermatozoa mRNA'larının spermatogenez sırasında transkribe edildiği ve teşhis amaçlı kullanılabileceği bildirilmiştir (123). Genel olarak, bu transkriptlerin spermiyogenezisin kalıntısı olduğu kabul edilmekte (122,124,125) iken, henüz bu transkriptlerin fonksiyonu veya amacı hakkında çok az bilgi mevcuttur (121,122). Olgun insan spermatozoasında tespit edilen bu mRNA'lar insan testislerinde eksprese edilenler ile uyumlu bulunmuştur (121,122). Bu nedenle ejakulat spermatozodaki mRNA'lar spermatogenezisteki olayların anlaşılmasını sağlayabilmektedir (122,124). Sığırların spermatozoalarında bulunan mRNA transkriptlerinin fonksiyonel rolünü belirlemeyi amaç edinen bir çalışmada, bu tür sperm RNA profillerinin erkek gamet kalitesinin moleküler teşhisi için uygun olduğu sonucunu desteklemektedir (125).

Bu çalışmaya yaş ortalaması 32.8 ± 4.7 (26-43) yıl olan, asthenozoospermik ve oligoasthenozoospermik 41 hastadan oluşan çalışma grubu ile yaş ortalaması 29.8 ± 4.0 (26-41) yıl olan, normozoospermik 48 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edildi. Sperm hareketliliği farklı olan bu erkek olguların spermatozoalarında NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyinin konsantrasyon, canlılık, progresif ve non-progresif hareketlilik, hareketsiz sperm oranı, anormal spermatozoa oranı gibi temel semen parametreleri ile aralarında bir ilişki olmadığı saptandı ($P > 0.05$) (tablo 10). Ayrıca NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin seminal plazma SOD aktivitesi ile de aralarında bir ilişki olmadığı belirlendi ($P = 0.533$) (tablo 10). Bu veriler NRF2'nin, erkek infertilitesi ile ilişkili ROT'un tahmin edilmesinde tek başına bir belirteç olarak kullanılmasının uygun olmadığını düşündürmektedir.

Spermatozoanın nükleer kondensasyonunu, kapasitasyonunu ve sperm fonksiyonunu içeren molekülleri kodlayan farklı mRNA transkriptlerinin seviyelerini

değerlendiren bazı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda proto-onkoproteinlerin ve nitrik oksit in hareketlilik, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, sperm hücre fonksiyonu, sperm fizyolojisi ve fertilizasyon için hayati önem taşıyan bazı aşamalarda görev aldığı bildirilmiştir (126,127).

Bu çalışmalarda sperm kalitesinin sperm mRNA dağılımı ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür. Bu hipotezi test etmek için Lambard ve arkadaşları aynı semen örneğinden yüksek ve düşük hareketli spermleri izole ederek bu iki popülasyonda nükleer kondensasyon (protamines 1 ve 2) ve kapasitasyonu [endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS), nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve c-myc] içeren molekülleri kodlayan farklı mRNA transkriptlerini değerlendirmişlerdir. Düşük hareketli spermlerde Prm-1 mRNA miktarının yüksek olduğu, yüksek hareketli sperm örneklerinin çoğunda eNOS ve nNOS transkriptlerinin tespit edilemediği, fakat düşük hareketli spermlerde tespit edildiği bildirilmiştir (122). Bu nedenle sperm mRNA profillerinin analiz edilmesi, bir tanı aracı ve prognoz değeri olarak fertilizasyon için yararlı olabileceği gibi normal fertil erkeklerin genetik yapısının anlaşılmasında da kullanılabileceği gösterilmiştir (122).

Steger grubu da infertil erkekler ve kontrol grubu arasında hem testikular biopsi hem de ejakulat spermatozoada protamin-1/protamin-2 oranı ve Bcl2 mRNA ekspresyon içeriği arasında anlamlı farklılıklar bildirmiştir. Kontrol grubuna göre infertil erkeklerde önemli ölçüde anormal protamin oranları ve Bcl2 mRNA ekspresyon içeriği bulunmuştur. Bu veriler bu moleküllerin erkek infertilitesini tahmin etmede yararlı bir biomarkır olabileceğini düşündürmüştür (128).

Voltaj bağımlı anyon kanal (voltage-dependent anion channel=VDAC) genlerinin mRNA düzeyindeki farklılıklar normozoospermili fertil kontrol grubu ile idiopatik asthenozoospermili infertil hastaların yüksek hareketli ve düşük hareketli spermatozoalarında rapor edilmiştir (129). Bu çalışmaların neticesinde, düşük kalitede insan sperminin, belirli genlerin anormal sperm mRNA içerikleri ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (122,128,129).

Bu çalışmamızda NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin temel sperm kalite parametreleri ile ilişkili olmadığı saptandı (tablo 10). Bu veriler NRF2'nin tek başına hem erkek infertilitesinin etyolojisinin belirlenmesinde hem de sperm

fonksiyonlarında ROT ile ilişkili defektlerin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmasının uygun olmadığını düşündürmektedir.

NRF2 genindeki bozukluklara ve insan hastalıkları arasındaki ilişkiye ışık tutmak için NRF2 geninde polimorfizmler araştırılmıştır. Bu sonuçlar, NRF2 geninin genetik analizi için moleküler bir temel oluşturması yanında polimorfizmler ile bu hastalıkların ilişkisine dair kanıtlar sunmuştur. Ayrıca mevcut deliller diğer oksidatif stres ilişkili hastalık süreçlerinde NRF2'nin rolünü araştırmanın etkili olacağını da bildirmiştir. Fakat NRF2'nin erkek üreme fonksiyonu üzerindeki etkileri araştırılamamıştır (130,131).

Nakamura ve arkadaşlarının yaptığı çalışma erkek fertilitesinde NRF2'nin rolünü gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışmada NRF2 knockout erkek farelerde testiküler spermatogenezin kronik oksidatif stress ile bozulmaya son derece duyarlı olduğunu ve spermatogenezin oksidatif bozulmasını önlemede transkripsiyon faktörü NRF2'nin kritik bir rol oynadığını göstermektedir (14). İnsanlarda erkek fertilitesi ile NRF2-ARE sinyal yolağı arasındaki ilişki büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu sonuçlara dayanarak, erkeklerde düşük sperm kalitesi ve infertilite ile NRF2'nin ilişkisi araştırılmalıdır (5). NRF2 ekspresyonundaki azalmanın regülatör genlerin anormal fonksiyonu veya NRF2'deki genetik varyasyonlardan kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (81). NRF2 geni apoptozis, antioksidan savunma ve hücre sağ kalımı esnasında transkripsiyon genlerinin anahtar regülatörü olduğundan (62,81), NRF2'nin anormal ekspresyonu erkek üreme sisteminde sadece ROT seviyesini değil, spermatogenezde görevli genlerin geniş bir kısmını etkileyebileceği, bu nedenle anormal NRF2 düzeyinin defektif sperm fonksiyonlarının anlaşılmasında moleküler mekanizmalardan biri olabileceği düşünülmektedir (81). Çalışmamızda düşük sperm hareketliliği olan erkek olguların spermatozoalarında NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.633$) (tablo 8) (şekil 7). Bu veriler NRF2 geninin insan spermatogenezinde önemli rol oynadığını ileri süren diğer çalışmalar ile uyumlu değildir (81). Ancak, bu çalışmada çalışma ve kontrol grubu sınırlı sayıda ele alındığından daha geniş bir populasyonda daha fazla araştırma yapılmasının uygun olacağı düşünüldü.

NRF2 geninin promotor bölgesindeki polimorfizimlerin NRF2 mRNA ekspresyonunu etkileyebileceği ve bu polimorfizimlerin insanlarda spermatogenez defektleri ile ilişkili olduğu bir diğer çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışma insanlarda defektif spermatogenez ile NRF2 promotorundaki fonksiyonel polimorfizimler arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu gösteren ilk çalışma olmaktadır (5).

Çalışma grubumuzun seminal plazma SOD aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmadığını gözlemledik ($P=0.502$) (tablo 9) (şekil 8). İnsan seminal plazmada ve spermatozoada SOD izoenzimleri en önemli antioksidan enzimlerden biri olarak kabul edilmektedir (5,20). Spermatozoa, oksidatif saldırıdan birçok somatik hücreyi koruyan SOD gibi savunma enzimlerini içeren küçük sitoplazmaya sahiptir (49,54) ve spermatozoal SOD aktivitesinin, oksidatif strese karşı spermatozoal hücrelerin korunmasında önemli rolü olduğu ayrıca SOD aktivitesinin oksidatif strese karşı birincil enzimik savunma olduğu bildirilmiştir (27,54,59). SOD, $\cdot O_2^-$ ve H_2O_2 arasındaki dengenin sağlanmasında fizyolojik bir rol oynarken, bu enzimin yüksek seviyesi bozulmuş sperm fonksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (59).

Kobayashi ve arkadaşlarının insan seminal plazma ve spermatozoada yaptıkları bir çalışmada seminal plazmanın SOD aktivitesi içerdiği bildirilmiş ve insan spermatozoasının SOD aktivitesi ile hareketli spermatozoalar arasında anlamlı bir korelasyonun olduğu gösterilmiştir. Fakat seminal plazmanın SOD aktivitesi ile sperm konsantrasyonu ve hareketliliği arasında bir ilişki gösterilememiştir (33). Fakat bir diğer çalışmada seminal plazma SOD aktivitesi ile spermatozoal progresif hareketlilik arasında pozitif korelasyon bildirilmiştir (60).

Yapılan diğer bazı çalışmalarda da seminal plazmanın SOD aktivitesinin hem hareketli spermatozoalar arasında (132) hem de sperm sayısı ve progresif hareketlilik arasında anlamlı bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (133).

Buna karşılık fertil ve infertil erkek seminal plazmalarında SOD enzim aktivitesi kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Fakat İnfertil grubun SOD enzim aktivitesi ile sperm hareketliliği arasında negatif anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (134).

Buna rağmen Sanocka ve arkadaşları infertil erkeklerin seminal plazma SOD aktivitelerinin fertil bireylere göre anlamlı olarak arttığını göstermiştir (135).

Yapılan bir diğer çalışmada elde edilen veriler oligoasthenozoospermik hastalarda total seminal SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (5).

Spermatozoa ve seminal plazma SOD aktivitelerinin sperm kalitesine olan etkilerini belirlemeyi amaçlayan bir diğer çalışmada fertil ve infertil grupta spermatozoa ve/veya seminal plazmanın SOD aktivitesi arasında anlamlı bir farklılık belirlenememiştir. Spermatozoa ve/veya seminal plazma SOD aktivitesi ile sperm hareketliliği ve konsantrasyon arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (136). Bu farklı sonuçların kullanılan metotların farklı olmasından kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (134).

Çalışmamızda seminal plazma SOD aktivitesinin konsantrasyon, canlılık, progresif ve non-progresif hareketlilik, hareketsiz sperm oranı, anormal spermatozoa oranı gibi temel semen kalite parametreleri ile aralarında bir ilişki olmadığı saptandı ($P>0.05$) (tablo 11). Bu veriler doğrultusunda seminal plazma SOD aktivitesinin sperm kalitesi ile aralarında anlamlı bir ilişkinin olmadığı sonucuna varıldı. Ayrıca bu çalışmada yapılan SOD araştırmasının sperm fertilizasyon potansiyelini belirlemek için bir belirteç olarak kullanılmasının uygun olmadığı sonucuna varıldı.

Sigaranın fertilité üzerine olan etkileri genellikle temel semen parametreleri kullanılarak yapılmıştır. Sigara kullanımı ile temel semen parametreleri arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sperm kalitesi üzerine sigaranın olası etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada sigara içen, hiç içmeyen ve sigarayı bırakmış gönüllü erkeklerde sperm yoğunluğu, hareketlilik ve morfolojik özellikleri üzerinde sigara kullanımının istatistiksel olarak anlamlı etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (137).

Diğer taraftan infertil erkek popülasyonunda sigara kullanımının semen kalitesi üzerine olası etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda sigaranın semen miktarı, sperm yoğunluğu, total sperm sayısı, hareketlilik ve canlılık üzerine olumsuz etkileri rapor edilmiştir (138,139,140).

Çalışmamızda kontrol grubunda sigara içen 30 olgu (yaş ortalaması 29.5±3.9), sigara içmeyen 18 olgu (yaş ortalaması 30.3±4.2) bulunur iken çalışma grubunda sigara içen 25 olgu (yaş ortalaması 32.7±4.3), sigara içmeyen 16 olgu (yaş ortalaması 32.9±5.5) bulunmaktadır (tablo 4) (tablo 5). Sigara kullanımının konsantrasyon, canlılık, progresif hareketlilik, non-progresif hareketlilik, hareketsiz sperm oranı, anormal spermatozoa oranı gibi temel semen kalite parametrelerine olan etkilerine baktığımızda; çalışma grubunun sigara içen olgularının temel semen kalite parametreleri sigara içmeyen olguları ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0.05$) (tablo 6). Benzer şekilde kontrol grubunun sigara içen olgularının temel semen kalite parametreleri sigara içmeyen olguları ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0.05$) (tablo 7). Bu veriler doğrultusunda sigaranın semen kalitesini etkilemediği sonucuna varıldı. Sigaranın fertilité üzerine olan etkileriyle ilgili yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçların elde edildiği görülmektedir. Çalışmalardaki bu farklı sonuçların tüketilen sigaranın içim süresi, miktarı gibi etkenlerden kaynaklanabileceği de düşünölmelidir.

Sonuç olarak bu çalışma ile düşük sperm hareketliliği olan erkeklerin spermatozoalarında NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyi ve seminal plazma SOD aktivitesi, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Ayrıca NRF2 antioksidan genin mRNA ekspresyon düzeyinin sperm kalite parametreleri ile ilişkili olmadığı saptandı. Bu bulgular NRF2 antioksidan düzeyin defektif sperm fonksiyonları ile ilişkili olmadığını göstermektedir. Ayrıca NRF2'nin tek başına hem erkek infertilitesinin etyolojisinin belirlenmesinde hem de sperm fonksiyonlarında ROT ile ilişkili defektlerin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmasının uygun olmadığını önermektedir. Ancak, bu çalışmada çalışma ve kontrol grubu sınırlı sayıda ele alındı. Daha geniş bir popülasyonda daha fazla araştırma yapılmasının uygun olacağı düşünöldü.

7. KAYNAKLAR

1. Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trend (Mosher ve Pratt 1991).
2. Male infertility (de Kretser 1997).
3. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care (Boivin ve ark. 2007).
4. Infertility in men: recent advances and continuing controversies (De Kretser ve Baker 1999).
5. Genetic variation in the Nrf2 promoter associates with defective spermatogenesis in humans (Yu ve ark. 2012).
6. Seminal Sıvı ve Sperme Oksidatif Stres ve Antioksidanlar (Demirtaş ve Üntan 2011).
7. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri (Koca ve Karadeniz 2003)
8. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects (de Lamirande ve Gagnon 1995).
9. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells (Hanukoglu 2006).
10. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients (Diplock 1998).
11. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species (Yu 1994).
12. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study (Ou ve ark. 2002).
13. Effect of sperm preparation techniques by density gradient on intraindividual variation of sperm motility (Hammoud ve ark. 2007).
14. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner (Nakamura ve ark. 2010).
15. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? (Halliwell ve ark. 1992).
16. Reactive oxygen species and sperm physiology (de Lamirande ve ark.1997).
17. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients (Kodama ve ark. 1997).
18. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11 (Aitken ve ark. 2007).
19. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa (Duru ve ark. 2000).
20. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa (Peeker ve ark. 1997).
21. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa (Aitken ve Clarkson 1987).
22. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility (Baker ve Aitken 2005).
23. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids (de Lamirande ve ark. 1993)
24. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress (Kaspar ve ark. 2009).
25. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? (Cummins ve ark 1994).
26. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients (Aitken ve West 1990).
27. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity (Alvarez ve ark. 1987).
28. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions (Aitken ve ark. 1994).
29. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa (Griveau ve ark. 1995).
30. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology (Griveau ve Le Lannou 1997).
31. Semende reaktif oksijen türüleri ve antioksidanlar (Yılmaz ve ark. 2008).
32. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa. Its effect on sperm motility (Alvarez ve Storey 1982).
33. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility. Superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa (Kobayashi ve ark. 1991).

34. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function (Gomez ve ark. 1998).
35. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility (Kessopoulou ve ark. 1995).
36. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story (Drevet 2006).
37. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk (Aitken ve Fisher 1994).
38. Oxidative stress during the interaction of gametes (Miesel ve ark. 1993).
39. The antioxidants of higher plants (Larson 1988).
40. Antioxidant enzymes and human diseases (Mates ve ark. 1999).
41. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) (McCord ve Fridovich 1969).
42. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization (Weisiger ve Fridovich 1973).
43. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight (Marklund 1982).
44. Superoxide dismutases and their impact upon human health (Johnson ve Giulivi 2005).
45. Heparin affinity patterns of extracellular-superoxide dismutase from human tissues and plasma (Sandström ve ark. 1993).
46. Binding of human extracellular-superoxide dismutase C to cultured cell lines and to blood cells (Marklund ve Karlsson 1989).
47. Turnover of extracellular-superoxide dismutase in tissues (Karlsson ve ark. 1994).
48. Expression of human extracellular-superoxide dismutase in chinese hamster ovary cells and characterization of the product (Tibell ve ark. 1987).
49. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation reactions in semen (Menella ve Jones 1980).
50. Semen selenium content and sperm mitochondrial volume in human and some animal species (Saaranen ve ark. 1989).
51. Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process (Griveau ve ark. 1995).
52. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa (De Lamirande ve Gagnon 1993).
53. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk (Aitken ve Fisher 1994).
54. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation (Alvarez ve Storey 1989).
55. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma (Jeulin ve ark. 1989).
56. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function (Aitken ve ark. 1989).
57. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa (Aitken ve ark. 1993).
58. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa (Storey 1997).
59. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function (Aitken ve ark. 1996).
60. Seminal plasma can be a predictive factor for male infertility (Kurpisz ve ark. 1996).
61. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa (de Lamirande ve Gagnon 1995).
62. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway (Kensler ve ark. 2007).
63. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice (Chan ve Kan 1999).
64. The "beta-like-globin" gene domain in human erythroid cells (Tuan ve ark. 1985).
65. In vivo protein-DNA interactions at the beta-globin gene locus (Ikuta ve Kan 1991).
66. Isolation of cDNA encoding the human NF-E2 protein (Chan ve ark. 1993).
67. Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast (Chan ve ark. 1993).
68. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region (Moi ve ark. 1994).
69. Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3 (Kobayashi ve ark. 1999).

70. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development (Chan ve ark. 1996).
71. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles (Itoh ve ark. 2003).
72. Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization (Chan ve ark. 1995).
73. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site (Oyake ve ark. 1996).
74. Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer (Muto ve ark. 1998).
75. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species (Kobayashi ve Yamamoto 2006).
76. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development (Shivdasani ve ark. 1995).
77. Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2 (Shivdasani ve Orkin 1995).
78. Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice (Chan ve ark. 1998).
79. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements (Itoh ve ark. 1997).
80. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway (Zhang 2006).
81. Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility (Chen ve ark. 2012).
82. Complexity of CNC transcription factors as revealed by gene targeting of the Nrf3 locus (Derjuga ve ark. 2004).
83. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer (Jaramillo ve Zhang 2013).
84. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant response elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain (Itoh ve ark. 1999).
85. Isolation of NFE2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the b-globin locus control region (Moi ve ark. 1994).
86. Nuclear import and export signals in control of Nrf2 (Jain ve ark. 2005).
87. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation (Nioi ve ark. 2005).
88. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription (Katoh ve ark. 2001).
89. RXRa inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2 (Wang ve ark. 2013).
90. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles (Itoh ve ark. 2004).
91. Long range interaction of cis-DNA elements mediated by architectural transcription factor Bach1 (Yoshida ve ark. 1999).
92. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2 (Kobayashi ve ark. 2004).
93. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress (Zhang ve Hannink 2003).
94. Oxidative stress and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1 (Kobayashi ve ark. 2006).
95. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes (Kang ve ark. 2004).
96. Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1 (Li ve ark. 2004).
97. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model (Tong ve ark. 2006).
98. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a 'tethering' mechanism: A two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex (McMahon ve ark. 2006).
99. Two-site substrate recognition model for Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism (Tong ve ark. 2006).
100. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation (Wakabayashi ve ark. 2003).
101. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm (Zipper ve Mulcahy 2002).

102. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers (Wakabayashi ve ark. 2004).
103. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity (Rushmore ve ark. 1991).
104. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene (Venugopal ve Jaiswal 1996).
105. Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by transcription factor Nrf2 (Wild ve ark. 1999).
106. Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence (Erickson ve ark. 2002).
107. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain (Itoh ve ark. 1999).
108. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods (Santagati ve ark. 1997).
109. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2.baskı (Temizkan ve Arda 2004).
110. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions (Higuchi ve ark. 1993).
111. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays (Bustin 2000).
112. The real-time polymerase chain reaction (Kubista ve ark. 2006).
113. An overview of PCR platforms. In: Logan J, Edwards K, Saunders N eds, Real Time PCR: Current technology and applications (Logan ve Edwards 2009).
114. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA (Dragan ve ark. 2012).
115. Metal-enhanced PicoGreen fluorescence: application for double-stranded DNA quantification (Dragan ve ark. 2010).
116. Fluorometric determination of deoxyribonuclease I activity with PicoGreen (Choi ve Szoka 2000).
117. Development and characterization of a novel host cell DNA assay using ultra-sensitive fluorescent nucleic acid stain "PicoGreen" (Ikeda ve ark. 2009).
118. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications (Zipper ve ark. 2004).
119. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects (van der Velden ve ark. 2003).
120. Presence of RNA in the sperm nucleus (Pessot ve ark. 1989)
121. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis (Miller ve ark. 1999).
122. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation (Lambard ve ark. 2004).
123. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. (Grunewald ve ark. 2005).
124. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men (Ostermeier ve ark. 2002).
125. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa (Gilbert ve ark. 2007).
126. Presence and role of c-myc proto-oncogene product in mammalian sperm cell function (Naz ve ark. 1991).
127. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa (Herrero ve ark. 2003)
128. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men (Steger ve ark. 2008).
129. Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia (Liu ve ark. 2010).
130. Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene. (Yamamoto ve ark. 2004).
131. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury (Marzec ve ark. 2007).
132. Superoxide dismutase in human semen (Nissen ve Kreysel 1983).
133. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity (Shiva ve ark. 2011).
134. The effects of superoxide dismutase activity and total antioxidant status in seminal plasma on male infertility (Öner İyidoğan ve ark. 2003).
135. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility (Sanocka ve ark. 1997).

136. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility (Hsieh ve ark. 2002).
137. Sperm quality of healty smokers, ex-smokers, and never-smokers (Vogt ve ark. 1986).
138. Cigarette smoking and semen quality (Vine ve ark. 1996).
139. Effect of smoking on semen quality of infertile men in Shandong, China (Zhang ve ark. 2000).
140. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples (Künzle ve ark. 2003).



8. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Reyhan KARA

Doğum Tarihi: 15/06/1977

Doğum Yeri: Konya/Cihanbeyli

Yabancı Dili: İngilizce

ÖSYM, üniversitelerarası kurul yabancı dil sınavı (ÜDS), 4 Ekim 2009, fen bilimleri, ingilizce dil puanı: 55

İLETİŞİM BİLGİLERİ

Telefon: 0 507 310 0317

E-Posta: reyhan.kara@yahoo.com.tr

EĞİTİM DURUMU

Lise: (1996) Konya Atatürk Kız Lisesi

Lisans: (2002) Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

YAYINLAR

A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

A.1 Erol A, Reisli R, Reisli I, **Kara R**, Otelcioglu S. Effects of desflurane, sevoflurane and propofol on phagocytosis and respiratory burst activity of human polymorphonuclear leucocytes in bronchoalveolar lavage. *Eur J Anaesthesiol*, 2009;26:150-4.

A.2 Artac H, **Kara R**, Reisli I. In vivo modulation of the expressions of Fas and CD25 by intravenous immunoglobulin in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Med*, 2010;10:27-31.

A.3 Keles S, Artac H, **Kara R**, Gokturk B, Ozen A, Reisli I. Transient hypogammaglobulinemia and unclassified hypogammaglobulinemia: ‘Similarities and differences’. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010;21:843-51.

A.4 Artac H, Reisli I, **Kara R**, Pico-Knijnenburg I, Adin-Cinar S, Pekcan S, Jol-van der Zijde CM, et al. B-cell maturation and antibody responses in individuals carrying a mutated CD19 allele. *Genes Immun*, 2010;11:523-30.

A.5 Artac H, **Kara R**, Gokturk B, Reisli I. Reduced CD19 expression and decreased memory B cell numbers in transient hypogammaglobulinemia of infancy. *Clin Exp Med*, 2013;13:257-63.

A.6 Kars MD, **Kara R**, Gündoğdu Y, Kepceoğlu A, Kılıç HS. Femtosecond laser induced photodynamic therapy on 5-ALA treated SKMEL-30 cells: An efficient theranostic strategy to combat melanoma. *Biomed Pharmacother*, 2014.pii: S0753-3322(14)00049-3.

B. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler

B.1 I. Reisli, H. Artaç, **R. Kara**, S. Keles. Effects of intravenous immunoglobulin on T lymphocytes, early activation markers and CD95 expression of patients with primary immunodeficiency. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID), 4-7 October 2006, Budapest, Hungary.

B.2 I. Reisli, H. Artaç, S. Keles, **R. Kara**. Immunological and clinical features of pediatric patients with common variable immunodeficiency in Konya. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID), 4-7 October 2006, Budapest, Hungary.

B.3 Reisli I, Artaç H, **Kara R**, Van den Elsen PJ, Van der Burg M, Van Dongen JM. The spectrum of severe combined immunodeficiency in Konya, Turkey. XIIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 16-19 October 2008, s-Hertogenbosch, the Netherlands.

B.4 Artaç H, Reisli I, **Kara R**, Adin Cinar S, Pico-Knijnenburg I, Pekcan S, Van Dongen JM, Van der Burg M, Vanzelm MC. Consequences of heterozygous loss of CD19 expression. XIIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 16-19 October 2008, s-Hertogenbosch, the Netherlands.

B.5 Artaç H, Saglam I, **Kara R**, Reisli I. The change of lymphocytes subsets with age in children with transient hypogammaglobulinemia. XIIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 16-19 October 2008, s-Hertogenbosch, the Netherlands.

B.6 Artaç H, Yorulmaz A, **Kara R**, Reisli I. Retrospective evaluation of the patients who are followed with the diagnosis of primary immunodeficiency. XIIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 16-19 October 2008, s-Hertogenbosch, the Netherlands.

B.7 H. Artac, **R. Kara**, İ. Reisli. Intravenous Immunoglobulin Modulates the Expressions of Fas and CD25 in vivo in Primary Immunodeficiencies. XXVIIth Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2008, Barcelona.

B.8 Reisli. İ, H. Artaç, S. Pekcan, **R. Kara**, K. Yümlü, C. Karagöl, Ö. Çimen, M. Şen, M. Artaç. A Village Screening Study for CD19 Deficiency. XXVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2009, Warszawa.

B.9 Gokturk B, Artac H, Keles S, Yıldırım S, **Kara R**, Kırac M, Reisli I. Digeorge syndrome: Clinical heterogeneity can hamper the diagnosis. XIVth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID), October 2010, Istanbul, Turkey.

B.10 Gokturk B, Artac H, Kırac M, Keles S, **Kara R**, Reisli I. Evaluation of patients with ataxia telangiectasia. XIVth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID), October 2010, Istanbul, Turkey.

B.11 **Kara R**, Artac H, Keles S, Kırac M, Gokturk B, Reisli I. Evaluation of CD25 expression response on T cells in hypogammaglobulinemia. XIVth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID), October 2010, Istanbul, Turkey.

B.12 Keles S, Artac H, **Kara R**, Gokturk B, Ozen A, Reisli I. Transient hypogammaglobulinemia and unclassified hypogammaglobulinemia: 'Similarities and differences'. 29th congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), June 2010, London.

C. Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

C.1 Hasibe Artaç, Sevgi Keleş, **Reyhan Kara**, İsmail Reisli. Yaygın değişken immün yetersizlikli çocuk hastalarda klinik ve laboratuvar özellikler. Türk Pediatri Arşivi / Türk Ped Arş, 2007;42:24-8.

C.2 İlhami Sağlam, Hasibe Artaç, **Reyhan Kara**, Sevgi Pekcan, İsmail Reisli. Süt çocuğunun Geçici Hipogammaglobulinemisinde Lenfosit Alt Gruplarının Yaşla Birlikte Değişimi. Türkiye Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Derneği / Astım Alerji İmmünoloji, 2008;6:74-79.

C.3 Abdullah Yorulmaz, Hasibe Artaç, **Reyhan Kara**, Sevgi Keleş, İsmail Reisli. Primer İmmün Yetmezlikli 1054 Olgunun Retrospektif Değerlendirilmesi. Türkiye Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Derneği / Astım Alerji İmmünoloji, 2008;6:127-134.

C.4 İ. Reisli, H. Artaç, S. Pekcan, **R. Kara**, K. Yümlü, C. Karagöl, Ö. Çimen, M. Şen, M. Artaç. CD19 Molekül Eksikliği: Bir Köy Taraması. Türk Pediatri Arşivi, 2009;44:127-130.

C.5 **Reyhan KARA**, Bahar GÖKTÜRK, Aynur ACAR. Yaygın değişken immünyetmezliklerde bilinen genetik defektler. Asthma Allergy Immunol, 2014;12:59-69

D. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

D.1 H. Artaç, **R. Kara**, S. Keleş, İ. Reisli. Primer İmmün Yetmezlikli Hastalarda İntravenöz İmmünglobulinin T Lenfositler, Aktivasyon Belirleyicileri ve CD95 Ekspresyonuna Etkileri. XIV. Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi, 2006, Antalya.

D.2 Reyhan Kara, Hasibe Artaç, İsmail Reisli. Hipogammaglobulinemisi Olan Olgularda Mitojene CD25 Ekspresyon Yanıtının Değerlendirilmesi. XVI. Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi(AİD), 19-23 Kasım 2008, Girne / Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti.

D.3 İsmail Reisli, Hasibe Artaç, Sevgi Pekcan, **Reyhan Kara**, Kadir Yümlü, Cüneyt Karagöl, Ömer Çimen, Metin Şen, Mehmet Artaç. CD19 Molekül Eksikliği: Bir Köy Taraması. XVI. Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi (AİD), 19-23 Kasım 2008, Girne / Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti.

D.4 Reyhan Kara, Hasibe Artaç, Sevgi keleş, Bahar Göktürk, İsmail Reisli. Hafıza B Hücrelerinin 1-4 Yaş Arası Normal Değerleri. XVII. UlusalAlerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi (AİD), 3-7 Kasım 2009, Kemer / Antalya.

D.5 Hasibe Artaç, **Reyhan Kara**, Bahar Göktürk, İsmail Reisli. Süt Çocuğunun Geçici Hipogammaglobulinemisinde CD19 Kompleksi. XVII. Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi (AİD), 3-7 Kasım2009, Kemer / Antalya.

D.6 Bahar Göktürk, Hasibe Artaç, Sevgi keleş, Selman Yıldırım, **Reyhan Kara**, İsmail Reisli. Di-George Sendromlu 5 Olgunun Değerlendirilmesi. XVII. Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi (AİD), 3-7 Kasım 2009, Kemer / Antalya.

D.7 Meltem Demiral Kars, **Reyhan Kara**. Fotodinamik Tedavide Ön İlaç Olarak Kullanılan 5-ALA'nın Meme ve Cilt Kanseri Hücrelerine Etkisi. 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Eylül 2013, İzmir.

E. Alman Ödül Belgeleri

E.1 İsmail Reisli, Hasibe Artaç, Sevgi Pekcan, **Reyhan Kara**, Kadir Yümlü, Cüneyt Karagöl, Ömer Çimen, Metin Şen, Mehmet Artaç. CD19 Molekül Eksikliği: Bir Köy Taraması, XVI. Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi, 19-23 Kasım 2008, Girne / Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (**üçüncülük ödülü**)

E.2 İsmail Reisli, Hasibe Artaç, Sevgi Pekcan, **Reyhan Kara**, Kadir Yümlü, Cüneyt Karagöl, Ömer Çimen, Metin Şen, Mehmet Artaç. CD19 Molekül Eksikliği: Bir Köy Taraması, Türk Pediatri Kurumu, 2008, Sezai Bedrettin Tümay Armağanı (**İkincilik ödülü**)

E.3 Hasibe Artaç, **Reyhan Kara**, Bahar Göktürk, İsmail Reisli. Süt Çocuğunun geçici hipogammaglobulinemisinde CD19 Kompleksi, Türk Pediatri Kurumu, 2009, Sezai Bedrettin Tümay Armağanı (**İkincilik ödülü**)

9. EK A: ETİK KURUL KARAR FORMU

NECETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Sperm hareketliliği düşük olan erkeklerin spermatazoolarında NRF2 mRNA ekspresyon düzeyinin incelenmesi"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Aynur ACAR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü (BAP)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz: İlaç Dışı Araştırma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

ASLI GIBİDİR
Ömer KONDU
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Etik Kurul Sekreteryası

Sayfa 1

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>					
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	Araştırma Bütçe Formu				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU*	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER	<input checked="" type="checkbox"/>	İş Zaman Çizelgesi				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/119	Tarih: 24.04.2013					
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin Kurulumuza sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Rahmi ÖRS

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Rahmi ÖRS	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
rd. Doç. Dr. B. Cem SONER	Tıbbi Farmakoloji	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet KAYRAK	Kardiyoloji	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Tahir Kemal ŞAHİN	Halk Sağlığı	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sema TUNCER UZUN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input type="checkbox"/>	K: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Selim KUTLU	Fizyoloji	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Nazmi ZENGİN	Göz Hastalıkları	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. A.Sadık GİRİŞGİN	Acil Tıp	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Müslim YURTÇU	Çocuk Cerrahisi	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Figen GÜNEY	Nöroloji	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input type="checkbox"/>	K: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mustafa KULAKSIZOĞLU	İç Hastalıkları	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Aysun TOKER	Tabii Biyokimya	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input type="checkbox"/>	K: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İbrahim GÜNEY	İç Hastalıkları	N.E.U. Meram Tıp Fakültesi	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Osman ÖZKAN	Sağlık meslek mensubu olmayan üye	Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu Sekreteryası	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input checked="" type="checkbox"/>	H: <input type="checkbox"/>	
Av. Orhan DÜR	Hukuk	Serbest Avukat	E: <input checked="" type="checkbox"/>	K: <input type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	E: <input type="checkbox"/>	H: <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı

* Toplantıda Bulunma

Sayfa 2