



T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JAB1 PROTEİNİN FERTİL VE İNFERTİL İNSAN SPERMİNDE
LOKALİZASYONUNUN İMMUNOSİTOKİMYASAL OLARAK
SAPTANMASI, SPERM KAPASİTASYONU VE
MORFOLOJİSİ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ

Hakan Kesici

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Doç.Dr. Hüseyin Aslan

TOKAT 2013



T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JAB1 PROTEİNİN FERTİL VE İNFERTİL İNSAN SPERMİNDE
LOKALİZASYONUNUN İMMUNOSİTOKİMYASAL OLARAK
SAPTANMASI, SPERM KAPASİTASYONU VE
MORFOLOJİSİ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ

Hakan Kesici

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Doç.Dr. Hüseyin Aslan

TOKAT 2013

JAB1 PROTEİNİN FERTİL VE İNFERTİL İNSAN SPERMİNDE
LOKALİZASYONUNUN İMMUNOSİTOKİMYASAL OLARAK
SAPTANMASI, SPERM KAPASİTASYONU VE MORFOLOJİSİ İLE
İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ.

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: / /

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Başkan :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih vesayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul
edilmiştir.

Enstitü Müdürü:

Mühür

İmza

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.



(.../.../2013)

Hakan KESİCİ

İmzası

TEŞEKKÜR

BaŐta tez danıŐman hocam Sayın Doç.Dr. Hüseýin ASLAN ve yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Sevil ÇAYLI, Doç.Dr. Fikret ERDEMİR, Yrd. Doç.Dr. Fikret GEVREK, Yrd. Doç.Dr. Ali AKBAŐ ve Yrd. Doç.Dr. Ufuk TAŐ hocalarıma ve her daim yanımda olan ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen biricik fedakâr eŐim Dr.Esra KESİCİ'ye Őükranlarımı sunar ve Uzm. Zafer İsmail KARACA ve Öğr. Gör. Murat UYSAL'a her türlü destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim...



ÖZET

Jab1 Proteinin Fertil ve İnfertil İnsan Sperminde Lokalizasyonunun İmmunositokimyasal Olarak Saptanması, Sperm Kapasitasyonu ve Morfolojisi İle İlişkisinin Belirlenmesi.

Semen analizi erkek fertilizasyon potansiyelini belirlemede oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu amaçla sağlıklı ve hasta bireylerin semenleri makroskobik ve mikroskobik analizlere tabi tutulur. Makroskobik olarak renk, koku, vizkozite, likefaksiyon süresi ve Power of Hydrogen (pH) olarak değerlendirilirken; mikroskobik olarak da herhangi bir istenmeyen hücre veya partikül varlığı, lökosit, eritrosit, epitel, sperm morfolojisi, hareketli/hareketsiz sperm sayısı olarak analiz edilir. Nasıl ki bu değişkenlerin sperm fonksiyonlarını değerlendirmede oldukça önemli katkıları olabileceğine inanmaktayız. Aynı şekilde spermdeki JAB1 v.b. proteinlerin varlığı, oranı ve bulunduğu yerin'de sperm fonksiyonlarını değerlendirmede önemli bilgiler vereceğine ve ileriki yıllarda ICSI ve IVF gibi işlemlerde veya bu sahalardaki çalışmalarda bizlere önemli ışık tutacağına inanmaktayız.

Bu nedenle çalışmadaki amacımız fertil ve infertil bireylerin semen örneklerinde JAB1 proteinin insan spermindeki varlığını tespit etmek, bu protein sperme var ise lokalizasyonunu immunositokimyasal yöntemlerle göstermek ve bu proteinin sperm kapasitasyonu ve morfolojisi ile ilişkisini de stereolojik metotlarla belirlemektir.

Çalışmamızın sonucunda fertil bireylerin sperm hücrelerinde JAB1 proteini bulunmazken veya bazı sperm hücrelerinde sınırlı sayıda olduğu bulunurken infertil bireylerin sperm hücrelerinde JAB1 proteinin varlığı gözlemlendi. Aynı bireylerin semenlerini kapasitasyona tabi tutulduğunda hem fertil ve hemde infertil bireylerin sperm

hücrelerinde JAB1 proteinin miktarı sıfırncı saatle birinci saat arasında fazla fark olmamakla beraber sıfırncı saatle dördüncü saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p \leq 0,05$). Bunun yanı sıra morfolojisi bozuk sperm hücrelerinde JAB1 proteininin daha yoğun bir şekilde bulunduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak: JAB1 proteini infertil bireylerde, fertil bireylere oranla; bozuk morfolojiye sahip spermelerde düzgün morfolojiye sahip spermelere oranla daha fazla bulunduğu ve kapasitasyon süresi arttıkça boyanma şiddetinde arttığı görüldü ($p \leq 0,05$).

Anahtar sözcükler: JAB1/CSN5 proteini, infertilite, semen ve spermiyogram analizi, immünositokimya, kapasitasyon.

ABSTRACT

The determination of JAB1 localization in fertile and infertile human sperm by immunocytochemistry and its relationship with sperm capacitation and morphology.

Semen analysis has a crucial role in determining the male fertilization potential. Thus the macroscopic and microscopic examination of semen samples were evaluated in the healthy and sick individuals. The initial macroscopic evaluation considers; liquefaction, appearance (colour, odour, consistency), viscosity and power of hydrogen (pH). The microscopical parameters considered in a semen analysis are; sperm morphology, motility and presence of cell (leucocyte and erythrocyte) other than spermatozoa. Similarly to these parameters, the presence, rate and localization of JAB1 protein in the sperms may will provide important information assessing the sperm functions and better understanding of the ICSI and IVF studies.

The objective of this study was to determine the presence and cellular localization of the JAB1 protein in the sperm by immunohistochemistry. In addition, evaluation of the relationship between this protein and cellular morphology and sperm capacitation by stereological methods.

As a result of this study, there was no to minimal staining with JAB1 for sperm cells from fertile individuals and there were a JAB1 protein in the large part of the sperms from infertile individuals which was statistically significant. When semen subjected to capacitation, there were no significant difference between the first hour and zero-hour for the amount of the JAB1 protein in the fertile and infertile individuals while there were significantly significant differentiation between the fourth hour and zero-hour. In addition,

immunohistochemical examination showed there were significantly large amount of JAB1 in the morphologically abnormal sperms.

Key words: JAB1/CSN5 protein, infertility, semen and spermiogram analysis, immunohistochemistry, capacitation.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR	3
2.1. İnfertilitenin Değerlendirilmesi	3
2.1.1. Semen Analizi (Spermiyogram)	4
2.1.2. Sperm Örneğinin Alınması	4
2.1.3. Semen Örneğinin Değerlendirilmesi (WHO, 2010)	5
2.1.4. Semen'in Makroskopik İncelemesi	5
2.1.4.1. Likefikasyon (Semen'in Çözünürlüğü)	6
2.1.4.2. Görünüm.....	6
2.1.4.3. Volüm.....	6
2.1.4.4. pH.....	7
2.1.5. Semen'in Mikroskopik İncelemesi.....	7
2.1.5.1. Konsantrasyon	7
2.1.5.2. Motilite	9
2.1.5.3. Dünya Sağlık Örgütüne Göre Sperm Motilitesinin Değerlendirilmesi9	
2.1.5.4. Morfolojik Değerlendirme.....	10
2.1.5.4.1. Kruger Kriterleri (1986).....	11
2.1.5.4.2. WHO Kriterleri:.....	12
2.2. Ejekülat (Semen).....	13
2.3. Hücre Siklusu.....	14
2.3.1. Siklinler:	15
a) Proteinlerin Ubiquitin Modifikasyonu	16

b) Proteinlerin Deubiquinasyonu	16
2.3.2. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK):	16
2.3.3. Siklin bağımlı kinazların inhibitörleri:	17
2.3.3.1. Cip/Kip ailesi:	17
2.3.3.2. INK4/ARF ailesi:	17
2.3.3.3. p27:.....	18
2.3.3.4. SKP 2.....	19
2.3.3.5. JAB1.....	20
3. MATERYAL VE METOD.....	30
3.1. Spermiyogram:.....	30
3.2. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi:	31
3.3. Morfolojik Ölçüm ve Değerlendirme:.....	31
3.4. Maksimum Feret Aralığı:	31
3.5. Minimum Feret Aralığı:	32
3.6. Tarafsız Sayım Çerçevesi	33
3.7. Kapasitasyon Çalışmaları:	34
3.8. Darkness Factor (Karanlık Faktörü/Boyanma Şiddeti).....	38
3.9. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	41
3.9.1. Triton X-100 Hazırlanması.....	41
3.9.2. PBS Hazırlanması:	41
3.9.3. BSA (Bovine serum albumin) Hazırlanması	41
3.9.4. %10 Formaldehitin Hazırlanması:	42
3.10. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	42
3.10.1. Antikorun Hazırlanışı	42
3.10.2. Antikorla Muamele Aşaması.....	43
3.10.3. DAB'ın Hazırlanışı.....	43
3.11. Kruger Strict Kriterleri'ne Göre Diff-Quick Boyama Tekniği	44
3.12. Diff-Quick Boyama Yöntemi	45
3.13. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65

6. KAYNAKÇA.....76



TABLolar LİSTESİ

- Tablo 1:** Semen analizi için en düşük referans değerleri. (5.persentil ve %95 güvenlik aralıkları) [3, 7].....10
- Tablo 2:** Fertil ve İnfertil bireylerin sperm hücrelerinin JAB1 antikoru ile pozitif ve negatif boyanan bölgelerinin boyanma oranlarının yaklaşık yüzdelerik değerleri.....46
- Tablo 3:** Fertil ve İnfertil bireylerin JAB1 antikoru ile pozitif ve negatif boyanan sperm hücrelerin boyanma derecelerine göre sperm hücresinin bölgelerinin ortalama morfolojik ölçümleri ve hesaplamaları.53
- Tablo 4:** Fertil ve İnfertil bireylerin 0, 1 ve 4 saatlik kapasitasyonu sonucundaki JAB1 antikoru ile pozitif boyanan sperm hücrelerinin, darkness faktörü ile hesaplanmasının sonucunda elde edilen değerlerin tablosu.63

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Makler sperm sayım kamerası ve Makler sperm sayım kamerasının yakın görünümü[].....	8
Şekil 2: Makler kamerasında semen örneğinin damlatılarak hazırlanması[14].	8
Şekil 3: Makler kamerasında spermlerin görüntüsü.	9
Şekil 4: Memeli sperminin boyun kısmının enine kesitinin şematik çizimi [].....	12
Şekil 5 : Memeli sperminin baş, boyun, kuyruk kısmının şematik çizimi [19].	13
Şekil 6: Hücre siklusunda siklin-siklin bağımlı kinaz (CDK) kompleks ekspresyonu.	15
Şekil 7: Hücre siklusunda siklin-CDK kompleks ekspresyonu ve p27 etkileşimi [].	18
Şekil 8: Sinyal transdüksiyon yolları. [].	19
Şekil 9: COP9 signalosomenin alt ünitelerinin etkileşim modeli [].	20
Şekil 10: p27 ^{kip1} 'in Degradasyonu []......	21
Şekil 11: Jab1/CSN5'in hedefleri ve regülasyonları [].	22
Şekil 12: Jab1/CSN5 moleküler mekanizmaları genel bakış []......	23
Şekil 13: Kanserde diğer önemli sinyal yolları ile Jab1/CSN5 çapraz ilişkisinin diyagramı [50].	24
Şekil 14: P27 aracılı hücre siklusu kontrolünde JAB1/CSN5 fonksiyonunun modellenmesi[41].....	26
Şekil 15: AP-1 transkripsiyon aracılı düzenlenmesinde JAB1/CSN5 fonksiyonunun modeli [42].	26
Şekil 16: Bir algoritmanın grafik gösterimi.[58]	32
Şekil 17: İki boyutlu kesit alanlarında profillerin örneklenişini gösterir diyagram.....	33
Şekil 18: Fertil bir bireyin sperminde JAB1 proteinin varlığının/yokluğunun veya varolma şiddetinin immünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenmesinin gösterilmesi	47

- Şekil 19:** İnfertil bir bireyin spermünde JAB1 proteinin varlığının/yokluğunun veya varolma şiddetinin immünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenmesinin gösterilmesi 48
- Şekil 19:** Sperm hücrelerinin farklı bölgelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonunda ölçüm esnasındaki görüntüsü. Jab 1 antikoru ile pozitif boyanma, X100 büyütme. 61
- Şekil 20:** Sperm hücrelerinin farklı bölgelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonunda ölçüm esnasındaki görüntüsü. Jab 1 antikoru ile pozitif boyanma, X100 büyütme. 61
- Şekil 21:** Fertil bireye ait boyanmayan sperm hücrelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonunda ölçüm esnasındaki görüntüsü. Jab 1 antikoru ile negatif boyanma, X100 büyütme. 62
- Şekil 22:** Fertil bireye ait sperm hücrelerinin farklı bölgelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonunda ölçüm esnasındaki görüntüsü. Jab 1 antikoru ile negatif boyanma, X100 büyütme. 62
- Şekil 23:** İnfertil bireye ait sperm hücrelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonu ile ölçümü ve sayımı. Jab 1 antikoru ile pozitif boyanma, X100 büyütme. 63

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

WHO	World Health Organization
JAB1	Jun-Activation Domain Binding Protein 1
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
ICSI	Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
SRÖ	Sistemik Rastgele Örnekleme
RB	Retinoblastom Proteini
SRC	Steroid Reseptör CO aktivatör
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
SKP 2	S-Phase Kinase–Associated Protein 2
SCF	Skp1/Cullin/F-Box
PGP 9,5 / UCHL-1	The Neuron Cytoplasmic Protein Gene Product 9,5
COP9	Constitutive Photomorphogenic 9
CSN5	COP9 Signalosome Subunit 5
DNA	Deoksiribonükleik Asit
pH	Power of Hydrogen
GnRH	Gonadotropin Serbestleştirici Hormon

FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
LH	Luteinleştirici Hormon
LFA-1	Lymphocyte Function Associated antigen 1
TBS	Tris Buffered Saline
BSA	Bovine Serum Albümin
PBS	Phosphate Buffered Saline
DAB	3, 3'-Diaminobenzidine
Her2/Neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
p27	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B (p27 ^{Kip1})
Smad7	Mothers against decapentaplegic homolog 7
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
AP-1	Aktivatör Protein 1
NP	Nazal Polipozis
CRS	Kronik Rinosinüoit
MİF	Makrofaj Migrasyon İnhibitör Faktör
HTF	Human Tubal Fluid
ER	Endoplazmik Retikulum

PR	Progesterone Receptor
γ	Gama
IR	Immuno Response
DSB	Double Strain Break
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
HR	Homolog Rekombinant



1. GİRİŞ

Bu çalışmanın amacı, fertil ve infertil bireylerin JAB1(jun-activation domain binding protein 1) proteinin varlığını saptamak, bu protein spermdede var ise lokalizasyonunu göstermek ve aynı zamanda bu proteinin sperm kapasitasyonu ve morfolojisi ile ilişkisini de stereolojik metotlarla belirlemektir.

Erkek infertilitesi, bir erkeğin normal bir kadın partner varlığında korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen, bir yılın sonunda konsepsiyon meydana gelmemesi veya çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite, çiftlerin ruh sağlığı ile sosyal yaşamlarını etkileyen önemli bir sorun olup Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008 yılında 6,5 milyon çiftin çocuk sahibi olamama nedeniyle infertilite kliniklerine başvurduğu bilinmektedir [1]. Evli çiftlerde yaklaşık olarak %10-15 oranında infertilite görülmektedir. İnfertilite sebepleri incelenirken olguların %50'sinde sadece kadın faktörünün, %30'unda sadece erkek faktörünün ve geri kalan %20'lik grupta da hem erkek hem de kadın faktörünün sorumlu olduğunu biliyoruz [1, 2]. Erkek infertilitesi değişik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenler; Sistemik ve kronik hastalıklar, genetik sebepler, hormonal bozukluklar, diyabet, böbrek yetmezliği gibi metabolik hastalıklar, inmemiş testis gibi patolojik durumlar, beslenme bozuklukları, çevre kirliliğinin artması ve bağımlılık yapıcı maddelerin kullanımı gibi çevresel sebepler ile ürogenital sistem infeksiyonları olarak sıralanabilir [1, 2].

Her geçen gün infertil erkek sayısının artığının bildirilmesi [3], spermin hassas yapısının ve özelliğinin moleküler düzeyde incelenmesine ve buradan hareketle daha ayrıntılı kesin tanı konulabilecek moleküler düzeyde ayırıcıların bulunup geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Sadece semen parametrelerinin günümüzün rutin kriterlerine dayanarak

incelenmesi sonucu bir erkeğin fertil olup olmadığının kesin olarak belirlenmesi çok zordur. Günümüzde kullandığımız rutin kriterlere ve belirteçlere göre yüksek sperm konsantrasyonlarına sahip bir erkek bireyin sperm hücresi ovosit fertilizasyonunu başaramazken, düşük sperm konsantrasyonuna sahip bazı erkek bireylerin sperm hücreleri ovosit fertilizasyonunu başarabilmektedir [4]. Moleküler belirteçler aracılığı ile bir bireyin semenindeki matür (olgun) ve immatür (olgunlaşmamış) spermelerin varlığı ve miktarının belirlenmesi ile bir bireye fertil veya infertil tanısının konulması daha isabetli olacaktır. Bu moleküler belirteçler ve ayraçların bulunup klinikte kullanılması IVF (İn Vitro Fertilizasyon) / ICSI (Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu) için kliniklere başvurmadan önce veya IVF / ICSI yöntemi uygulanmadan önce bu moleküler belirteçlerle semen hakkında ayrıntılı bilgi sahibi olmamız, hem hastanın maddi ve manevi yıpranmasının önüne geçebileceği hemde daha ucuz maliyetlerle daha isabetli kararlar alınabileceği kanaatindeyiz. Bu nedenle JAB1 proteininin insan spermindeki varlığının belirlenmesi, sperm kapasitasyonu ve morfolojisi ile ilişkisi olup olmadığının tespit edilmesinin ilerideki klinik çalışmalara önemli katkılarının olabileceğini düşünüyoruz.

2. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

2.1. İnfertilitenin Değerlendirilmesi

Çiftler herhangi bir korunma yöntemi uygulamayarak bir yıl boyunca WHO'nun belirlediği ölçütlere uygun olarak üç günde bir düzenli ilişkiye girerek (WHO göre bu düzenli cinsel yaşam olarak kabul edilmektedir) herhangi bir gebelik veya konsepsiyon sağlanamamasına infertilite denir. Eğer çiftlerin o güne kadar hiç konsepsiyonu veya gebeliği sağlanamamışsa Primer İnfertilite; fakat çiftlerin daha önce bir çocuk sahibi olmuş olmaları veya daha önceki bir gebeliğinin olmasından sonra ikinci veya üçüncü gebelikleri sağlanamıyorsa buna Sekonder İnfertilite denir. Günümüzün tıp bilgisiyle tedavi edilemeyen infertiliteye ise Sterilite veya Kalıcı kısırlık denilmektedir [4].

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda dünya genelinde infertilite oranının %10 ila %15 arasında olduğu gösterilmiştir. Erkekteki infertilite %15 ila %30 da kadındaki problemle beraber görülürken; %10 ila %30 da sadece erkeğe dayalı sorun olarak karşımıza çıkmaktadır [4]. Erkek bireylerde infertiliteye neden olan birçok etmen vardır. Isıya bağlı olarak kronik yüksek ateş, ilişki öncesi sıcak duş vb., radyasyon, esrar, alkol, tütün mamülleri, ilaçlar (tarımsal ilaçlar da bunlara dahildir), altın ve kurşun gibi metallerin kullanılması sonucu bazı hormonal bozukluklar, cinsel yollarla bulaşabilen hastalıklar ve XXY gibi bazı kromozomal hastalıklar gibi etmenler de erkek infertilitesinin sebebinin teşkil edebilirler. İlgili erkek bireylerde ayrıntılı bir spermogram testi, kruger strickt testi, Eosin Y testi, bunların yanı sıra seminal plazmalarında antisperm antikor ölçümlerinin yapılması, postkoidal teste tabi tutulması, o bireyin fertilite kapasitesi hakkında önemli bilgiler vermektedir [5].

2.1.1. Semen Analizi (Spermiyogram)

İnfertil çiftlerde yarıya yakın bir oranda erkekte problem olduğu belirlenmiştir [6]. Erkek faktörünü ortaya koyan en basit test; kolay, ucuz ve kısa zamanda sonuç vermesinden dolayı spermiyogram testidir [6]. Spermiyogram, semen örneğinin makroskopik ve mikroskopik yönünden incelenmesidir. Semen örneği, makroskopik olarak; renk, koku, vizkozite, likefaksiyon süresi ve pH yönünden değerlendirilirken; mikroskopik olarak da; motilitesi, morfolojisi ve aglutinasyonu yönünden değerlendirilir.

2.1.2. Sperm Örneğinin Alınması

Androloji laboratuvarına gelen fertil ve infertil bireylere, sperm numunesi vermeden önceki 3-5 günlük dönemde cinsel perhize uymaları önerilmektedir. Bazı androloji uzmanlarına göre 2-7 günlük cinsel perhiz süresi uygun görünse de WHO tarafından 3 günden daha az süren cinsel perhizlerde semendeki sperm sayısının azaldığı, 5 günden daha uzun süren perhizlerde ise semendeki sperm sayısının yeterli olduğu fakat hareketliliğinin azaldığı bildirilmiştir. Bunlara ek olarak 5 günden daha uzun süreli yapılan cinsel perhizlerde, spermalarının akrozom bölgelerinin içeriğinin azaldığı gösterilmiştir [3]. Önerilen cinsel perhiz sürelerine uyulduğunda ve semen analizlerinin ayrıntılı bir şekilde yapılması neticesinde, testislerdeki spermatogenetik aktivite hakkında ve aksesuar bezlerin fonksiyonuna ilişkin daha doğru bir bilgi elde edilebilmektedir [3, 6]. Androloji laboratuvarına başvuran fertil ve infertil bireylerin önce anamnezi (öyküsü) alınır. Daha sonra bireylere steril, kapaklı kutular verilerek bu amaçla düzenlenmiş, semen odasında semen vermeleri kullanmaları sağlanır. Semen numunesinin toplandığı kaplar kimyasal ve biyolojik yönden yapılan testlerle toksik olmadığı belirtilmiş steril kapaklı kaplar olması gerekmektedir [3, 6].

2.1.3. Semen Örneğinin Değerlendirilmesi (WHO, 2010)

Semen analizinin çabuk sonuç vermesi, kolay elde edilebilmesi ve maliyetinin düşük olması nedeniyle erkek infertilitesinde ilk başvuru test olma özelliğini korumaktadır. Androloji laboratuvarımızda makroskobik ve mikroskobik olarak yapılan bu testler, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlemiş olduğu en güncel bilgiler ve kriterlere uyularak yapılmaktadır. WHO'nun bu konuda yayınlamış olduğu el kitabının beşinci baskısında, dördüncü baskısına ek olarak semen analizi bölümü yeniden gözden geçirilerek ayrıntılı bir şekilde düzenlenmiştir. Buna göre analizlere ilişkin hesaplamalar ve yorumlamalar ile sperm hazırlama aşamalarına ilişkin ayrıntılı bilgiler eklenmiştir. Örneklemeye ve sayım hatalarına yönelik olarak kriyoprezervasyonla ilgili yeni kriterler ortaya konmuştur. Ayrıca testis fonksiyonlarının ortaya konulmasında, sperm konsantrasyonunun incelenmesi yerine total sperm sayısına bakmanın daha doğru bir yaklaşım olduğu kabul edilmiştir. Bunlara ek olarak azospermi tanısı için alınan örneklerin santifürüj edilmeden direkt olarak 37°C'deki etüvde likefiye olana kadar bekletilmesi ve daha sonra doğrudan incelenmesi önerilmiştir. Dördüncü baskıya kıyasla bu baskıdaki en büyük farklılık, sperm hücrelerinin hareketliliklerinin değerlendirilmesinde göze çarpmaktadır. a, b, c ve d şeklinde sınıflandırılan sperm hücreleri bu yeni baskısında lineer progresif hareketli, progresif hareketli, non-progresif hareketli ve hareketsiz şeklinde katagorize edilmiştir [7].

2.1.4. Semen Makroskopik İncelemesi

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Androloji Laboratuvarı'na başvuran bireylerden alınmış numuneler, öncelikle 37°C deki etüve konmaktadır. Sonrasında makroskopik ve mikroskobik incelemelere tabi tutulmaktadır.

Bu incelemelerde; semen içeriği koagülasyon, aglütinasyon, likefikasyon, viskozite, görünüm, volüm, renk, koku ve gerektiğinde pH özellikleri ile mikroskopik yönden morfolojileri WHO'ya veya Kruger strick kriterlerine göre değerlendirilmektedir.

2.1.4.1. Likefikasyon (Semenin Çözünürlüğü)

Ejekulasyondan sonra koagüle olan semenin, prostattan salgılanılan proteolitik enzimler vasıtasıyla 10-30 dakika içerisinde likefiye olması beklenir [8]. Eğer bireylerden alınan numuneler 37°C'de (etüvde) 15-45 dakika içerisinde likefiye olmazlar ise vizkozitesi yönünde de incelenerek vizkozite derecesi belirtilir [3].

2.1.4.2. Görünüm

Sağlıklı bir semenin parlak açık sarı, krem, açık gri renkte ve homojen bir görünüm içeren yapıya sahip olması bunun yanında kendine özgü bir kokusunun olması gerekmektedir. Eğer semende cerahat bulunuyor (pyospermi) ise ya da uzun süreli bir cinsel perhiz uygulanmış ise numunenin sarı renkte olduğu görülür [3, 8]

2.1.4.3. Volüm

Semen hacminin normal sınırları 1,5-6 ml olarak kabul edilirken, 1 ml'den az ise hipospermi, 6 ml'den fazla ise hiperspermi olarak adlandırılmaktadır. Cinsel perhiz süresinin uzun olması durumunda hiperspermiyle karşılaşılırken; kısa cinsel perhiz süresi ve ejakulatör kanallarda darlık durumlarında ise hipospermi ile karşılaşılabilir [3, 6]

2.1.4.4. pH

Semenin normal pH değerleri 7,2-8 kabul edilmekte olup akut enfeksiyon gibi durumlarda bu değer 8'in üzerine çıkabilmektedir. pH'ı 7,2 nin altında olması ise alkali özelliğe sahip prostat sıvısının semen içindeki miktarının azlığından dolayı ortaya çıktığı düşünülebilir [3].

2.1.5. Semen Mikroskopik İncelemesi

Sürüntü yayması yapılmış, tespit edilmiş, boyanmış sperm yaymaları ışık mikroskopisi seviyesinde incelenerek sınıflandırılır [9 , 10]. Bu esnada sperm konsantrasyonu, morfolojisi, hareketliliği ve yuvarlak hücre sayısı yönünden değerlendirilme yapılmaktadır. Canlı sperm ile Papanikolaou yöntemiyle boyanmış spermler arasında belirgin bir farklılık olmamakla beraber işlemler sırasındaki büzüşmeye bağlı olarak boyanmış sperm başının biraz daha küçük olduğu görülür [11]. Fakat %95 oranındaki bir güven aralığı ile değerlendirme yapılmasına olanak sağlamaktadır. Boyalı spermlerde baş uzunluğu 3-5 µm, genişliği ise 2-3 µm olarak ölçülmektedir ve normal başın şekli oval görünümündedir [3, 11, 12]. (Şekil 5).

2.1.5.1. Konsantrasyon

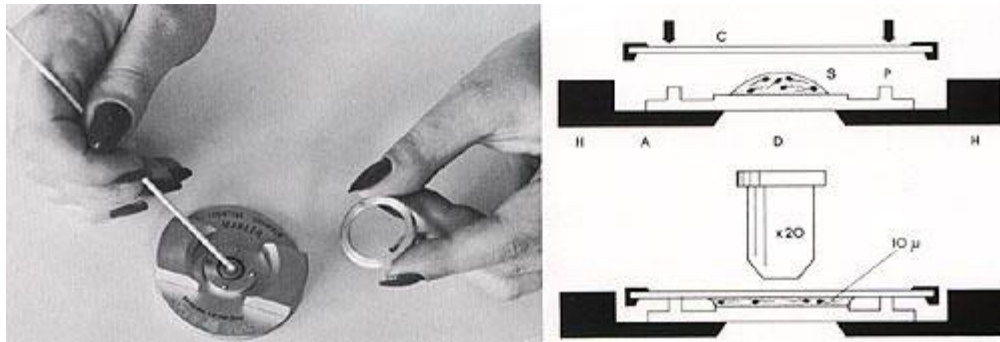
Günümüzde spermiyogram sayımları ve morfolojik yönden incelenmeleri otomatik cihazlarla yapılmaya başlanmış olsa bile hala birçok hastahanelerde spermiyogram sayımları 1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından geliştirilen sperm sayımı için özel tasarlanmış "Makler Sperm Sayım Kamerası" kullanılarak yapılmaktadır (Şekil 1,2). Makler Sperm Sayım Kamerasının 10 µm derinliğine sahip olması, spermatozoanın tek bir düzlemde serbest olarak hareket etmesine olanak

sağlamaktadır. Buda bize hareketlilik yüzdeleri hakkında daha doğru bir sonuç verilmesini sağlar [4, 13].



Şekil 1: Makler sperm sayım kamerası ve Makler sperm sayım kamerasının yakın görünümü[14].

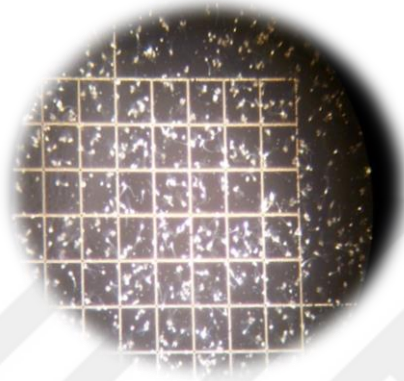
Makler sperm sayım kamerası ile sayım yapmak için 5 μ l (bir damla) sayım kamerasının üzerine damlatılır ve X20'lik objektif ile sperm sayılır. Makler Sperm Sayım kamerasındaki 100 karelik alanda bulunan sperm hücreleri sayılırsa daha doğru bir sonuç elde edilir. Eğer 10 karelik alandaki motil ve non-motil sperm hücreleri sayılmış ise 10 μ l derinlikte göz önünde bulundurularak bu sayı 10^6 ile çarpılır ve mililitredeki ($X10^6$ /ml) sperm sayısı hesaplanmış olur [14].



Şekil 2: Makler kamerasında semen örneğinin damlatılarak hazırlanması[14].

2.1.5.2. Motilite

Konsantrasyon sayımına benzer şekilde motilitenin değerlendirilmesi de x20 lik objektif ile 100 karedeki sperm hücreleri sayılır (Şekil 3). Yüzelik olarak motilite değerini elde etmek için motil sperm sayısı, total sperm sayısına bölünür [13].



Şekil 3: Makler kamerasında spermelerin görüntüsü.

2.1.5.3. Dünya Sağlık Örgütüne Göre Sperm Motilitesinin

Değerlendirilmesi

- A- İleri hızlı doğrusal hareket (lineer progresif).
- B- İleri yavaş doğrusal olmayan hareket (non-lineer progresif).
- C- Yerinde hareketli (non-progresif motilite).
- D- Hareketsiz (non motile).

Normospermi: Morfoloji, motilite, konsantrasyon yönünden normal değerler aralığında olan ejakülata denir.

Oligospermi: Sperm sayısının <20 milyon/ml olmasına oligospermi denir.

Oligoteratospermi: Spermlerin multiliterlerinin normal olduğu fakat morfolojilerinin bozuk ve konsantrasyonunun düşük olduğu ejakulata denir.

Teratospermi: Spermlerin motilitesinin ve konsantrasyonunun normal fakat morfolojisinin bozuk olduğu ejakulattır.

Astenospermi: Sperm motilitesinin düşük olduğu ejakulata denir.

Azospermik: Ejekulatta spermin bulunmaması durumuna denir.

Dünya sağlık örgütü'nün 2010 verilerine göre konsantrasyon, motilite ve morfoloji için normal olarak kabul edilen semen analizi için en düşük referans değerleri aşağıdaki Tablo 1'de verilmiştir (5.persentil ve %95 güvenlik aralıklı) [3].

Tablo 1: Semen analizi için en düşük referans değerleri. (5.persentil ve %95 güvenlik aralıkları) [3, 7].

Semen Parametreleri	En düşük referansdeğer
Hacim (ml)	≥1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (10 ⁶)	39 (33-46)
Konsantrasyon (10 ⁶ /ml)	≥15 (12-16)
Total motilite (PR+NP,%)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm,%)	>%58 (55-63)
Morfoloji (normal formlar)	≥%14 (3.0-4.0) (Kruger)
pH	>7.2

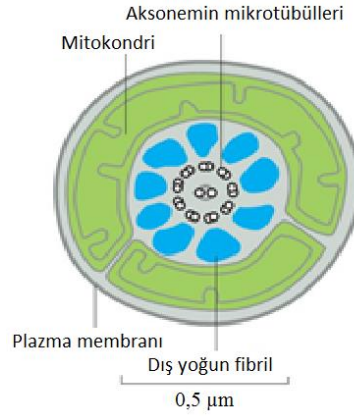
2.1.5.4. Morfolojik Değerlendirme

Kliniklerde yaygın olarak morfolojik değerlendirmede kullanılan iki farklı kriter vardır. Bunlardan Kruger strict kriteri'ne göre normal değer >%14 olması gerekirken

WHO'ya göre normal değer $> \%30$ olmalıdır [15]. Bu kriterlere göre mikroskop altında analiz yapılırken spermelerin baş, boyun ve kuyruk gibi bölgelerindeki anomalilere bakılarak morfolojik analiz yapılır [13, 16]. Bunun için önce semen lam üzerine yayılır ve sonrasında işlem için uygun boya seçilerek boyama yapılır (WHO için Papanicolaou ve Kruger strict kriterleri için Diff-Quick veya Spermac boyama yöntemi). Hazırlanan preparat uygun solüsyon ve lamel ile kapatılır. 100'lük objektif altında immersiyon yağı damlatılarak 100 veya 200 sperm hücresi analiz edilir ve % normal cinsinden sonuç rapor edilir [13, 17]

2.1.5.4.1. KRUGER KRİTERLERİ (1986)

Sperm hücresinin baş bölgesi düzgün oval bir morfolojide olması gerekir. Ayrıca akrozom başın ön kısmının $\%40$ ile $\%70$ ' ini kaplamalıdır. Normal bir sperm hücresinin baş bölgesinin eni 2 ila 3 μm arasında iken baş bölgesinin uzunluğu 3 ila 5 μm arasında olmalıdır. Baş bölgesinin eninin uzunluğuna olan oranı $2/3$ veya $3/5$ arasında olmalıdır. Borderline baş formları anormal olarak sınıflanır. Başın uzun eksenini ile boyunun uzun eksenini aynı hizada olmalıdır. Eğer sitoplazmik artık var ise baş büyüklüğünün yarısından büyük olursa bu anormal sperm hücresi olarak kabul edilir. Sperm hücresinin orta kısmının eni 0,5 μm (şekil 4), boyu ise sperm başının 1,5 katı uzunlukta olmalıdır. Ayrıca orta kısım, başın uzun eksenini boyunca bağlanmış bir silindir şeklinde olmalıdır. Normal bir sperm hücresinin kuyruk uzunluğu 35 ila 45 μm aralığında ve düzgün bir yapıda olmalıdır. Kalınlığı sperm orta kısmından biraz daha ince olmalıdır. Bu kriterlere uymayan sperm hücreleri anormal sperm hücreleri olarak kabul edilir [12, 13, 16, 18].



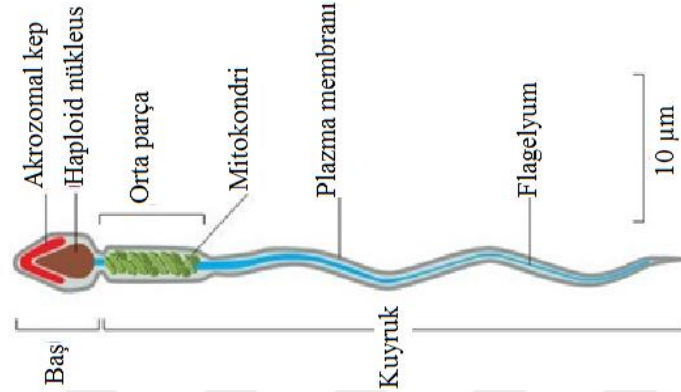
Şekil 4: Memeli sperminin boyun kısmının enine kesitinin şematik çizimi [19].

2.1.5.4.2. WHO KRİTERLERİ:

Sperm hücrelerinin akrozomal bölgesinin baş bölgesine oranı en az $1/3$ olmalıdır (Şekil 5). Ayrıca başın eninin boyuna oranı $1/2$ ile $1/3$ arasında olmalıdır. Normal bir sperm hücresinin baş bölgesinin uzunluğu 3 ila 5 μm aralığında iken genişliği ise 2 ila 3 μm aralığındadır. Baş bölgesinin morfolojisi düzgün kenarlı ve oval şeklinde olmalıdır. WHO kriterlerine göre sperm hücresinin boyun bölgesinin normal olması gereken kriterleri belirtilmemiştir.

WHO'ya göre sperm hücresinin orta kısmının dışı düzgün hatlı ve silindirik şeklinde olmalıdır, orta kısmının en/boy oranı $1/3$ den küçük olmamalıdır. Eğer sitoplazmik artık var ise ve bu artık baş bölgesinin yarısından daha büyükse bu sperm hücreleri anormal olarak kabul edilir. Kuyruk 35-45 μm aralığında, silindirik şekilli, düzgün süturlu bir yapıda olmalı. Tek bir sperm hücresinde birtane kuyruk olmalı, çatallanma veya katlanma olmamalıdır [3]. WHO kriterleri ile Kruger strict kriterleri arasında farklar bulunmaktadır. Biz çalışmamızda Kruger strict kriterlerini baz alarak değerlendirme yaptık. Morfolojik değerlendirme için 100'lük objektif altında immersiyon yağı damlatılarak, 100 ila 200 arasında sperm hücresinin incelenmesi gerekmektedir.

Kruger strict kriterlerine göre normal sperm sayısının oranı %14'den fazla olan bireyin fertilizasyon oranı %81 ila %91 arasında, %14'den küçük olan bireylerde ise fertilizasyon oranı %37 olarak bildirilmiştir [12, 20].



Şekil 5 : Memeli spermının baş, boyun, kuyruk kısmının şematik çizimi [19].

2.2. Ejekülat (Semen)

Epididimis ve duktus deferens kaslarının sempatik sinir sistemi aracılığıyla uyarılıp peristaltik kasılmasına neden olduktan sonra semen epididimis, duktus deferens ve vas deferensin ampüllasından geçtikten sonra ejakülatör kanaldan ilerleyerek prostatik üretraya ulaşır. Ejakülatör kanalın asitliğini düşürmek için seminal keseler aracılığıyla 2-3 ml arasındaki alkali sıvıyı üretraya aktarır [8]. Bunun akabinde 1-2 ml lik prostat sıvısı prostat kaslarının kontraksiyonuyla salınır ve tüm seminal sıvı prostatik üretradan üretraya aktarılmış olur. Ejakülasyonun mesaneye geri kaçışını (retrograt) önlenmek için mesane boynundaki sfinkter kapatılır ve daha sonrasında üretra kaslarının kontraksiyonu sayesinde ejakülat üretradan dışarıya atılır [8]. İnsan semeninin plazma kısmının üçte birlik kısmını prostattan salgılanan sıvı teşkil ederken üçte ikilik kısmını ise seminal keselerden salgılanan sıvılar oluşturur. Testisler tarafından üretilen spermatozoa ile birlikte toplam semen hacmi 3-6 ml miktarında olmalıdır [12]. pH değeri 7,2 ile 7,8

arasında değişen seminal plazma, hem pH tamponu olarak hem de spermatozoanın taşınmasında görev almaktadır. pH değeri 6,2'nin altına indiğinde spermatozoalar hareket yeteneklerini kaybedecekleri için seminal plazma sıvısı vajinanın pH'ını yükseltir. Normal bir bireye ait ejakülatın %90'lık kısmını seminal plazma, %10'luk kısmını ise spermatozoa teşkil eder. Seminal plazma belirtilen normal miktardan az olduğu durumlarda spermatozoalar hareket yeteneklerini kaybederler. Seminal plazma miktarı çok yüksek olduğu durumlarda ise sperm hücrelerinin konsantrasyonları düşecektir [8].

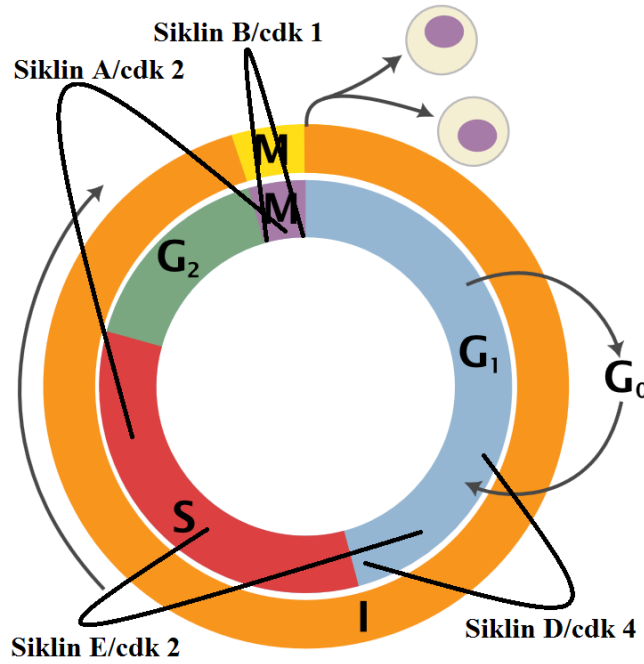
2.3. Hücre Siklusu

Hücrelerin düzenli çoğalması için bir takım faktörlere, sitümüle ve inhibe eden ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Eğer bu ajanların miktarlarında bir değişme olursa hücre ya apoptoza gider ya da hücreyi tümörleşmeye sokar. Bu sitümülatörler ve inhibitörler siklinler ve siklin bağımlı kinazlar aracılığı ile düzenlenmektedir. 15'den fazla siklin tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları siklin D, E, A ve B dir. Bunlar hücre siklusunda art arda bir ya da daha fazla siklin bağımlı kinazlar (CDK)'a bağlanır. Bir diğeri siklin bağımlı kinazlardır. Bu siklin bağımlı kinazlarda inhibitörleri aracılığıyla düzenlenirler (Şekil 6). Bunlarada siklin bağımlı kinaz inhibitörleri denir. Başlıca iki tane CDK inhibitörü vardır.

Bunlar:

1-Cip/Kip ailesi (p21^{kip1}, p27^{kip1} ve p57^{kip2})

2-INK4/ARF ailesi (p14^{ARF}, p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d})



Şekil 6: Hücre siklusunda siklin-siklin bağımlı kinaz (CDK) kompleks ekspresyonu.

CDK'ların görevi hücre siklusunda bir sonraki faza geçerken hedef proteinleri fosforile etmektir. Hücre siklusu boyunca düzenli olarak inaktif formda salınan CDK'lar ancak siklinlere bağlandıktan sonra fosforile olup aktif forma geçerler [21].

2.3.1. Siklinler:

Hücresel döngüde yeralan düzenleyici proteinlerin birçoğu ubiquitin veya ubiquitin benzeri proteinlerle birleşip değişime uğramaktadır. Bu değişimler genellikle proteinin aktivitesinde, yarılanma ömründe, sinyal iletiminde ve diğer moleküllerle etkileşiminde ve hücre içindeki konumunda değer kazanır. Siklinler hücresel döngüde kendine özgü fazlarda sentezlenerek, CDK'ları aktive ettikten sonra stabil olmayan bir yapıya sahip oldukları için ubiquitin-proteazom yoluyla yıkılmak suretiyle seviyeleri süratle düşer [22]. Ubikitin-proteazom yolları şu şekilde görev alırlar:

a) Proteinlerin Ubiquitin Modifikasyonu

Proteinlerin ubiquitin modifikasyonunun önemi hücre siklusunun düzenlenmesinde, nöral ağ morfogenezinde, immün sistemin düzenlenmesinde veya inflamatuvar reaksiyonlarda, stres ve ekstrasellüler uyarılara hücrel cevapta, DNA onarımında ve organellerin işleyişi gibi önemli yollarda görev almaktadır [22].

b) Proteinlerin Deubiquinasyonu

Protein modifikasyonunun tersi olan protein deubiquinasyonu thiol proteaz enzimleri aracılığıyla gerçekleşir [22].

2.3.2. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK):

Hücre döngüsünde fazlar arasında ilerlerken hedef proteinler CDK'lar tarafından fosforile edilirler. Hücre siklusu boyunca düzenli olarak inaktif formda salınan CDK'lar ancak siklinlere bağlandıktan sonra fosforile olup aktif forma geçerler [21]. G0 veya erken G1 döngüsünde dinlenme pozisyonunda olan hücreler growth hormonu gibi büyüme faktörleri ile uyarıldığında hücrel döngüde ilk basamak olarak Siklin D ve siklinE miktarı artış göstererek siklin D-CDK4 ve CDK6'ya; siklin E ise CDK2'ye bağlanarak aktive olurlar. Hücrel döngüde G1→S eşiğini aşarak hücreyi DNA fazına sokmak için siklin D-CDK6 ve siklin E-CDK2 bileşeni Retinoblastom Proteinini (RB) fosforile eder. Aktif halde bulunan siklin E-CDK2 yapısı DNA replikasyonunun başlamasını ve hücrel döngünün S fazında ilerlemesini sağlar. G2→M geçişinde siklin A ve siklin B'ler CDK'lar ile kompleks oluşturup kritik olayları regüle etmektedirler. Burada siklin A, CDK2'ye bağlanarak aktive eder. Mitotik profazdaki reaksiyonları siklin A-CDK2 bileşkesi düzenler. Hücrenin profazdan çıkması siklin B-CDK1 yapısının

aktifliğini kaybetmesiyle gerçekleşir [22]. CDK inhibitörleri, siklin-CDK bileşeninin aktive olmasıyla düzenlenirler [23, 24].

2.3.3. Siklin bağımlı kinazların inhibitörleri:

Ortamda CDK'lar bulunduğu için hücre sürekli bölünmeye girmek isteyecektir. Fakat bu CDK inhibitörleri aracılığıyla baskılanırsa hücre tümörleşmesi engellenmiş olacaktır. İki tane önemli siklin bağımlı kinaz inhibitör ailesi vardır. Bunlar:

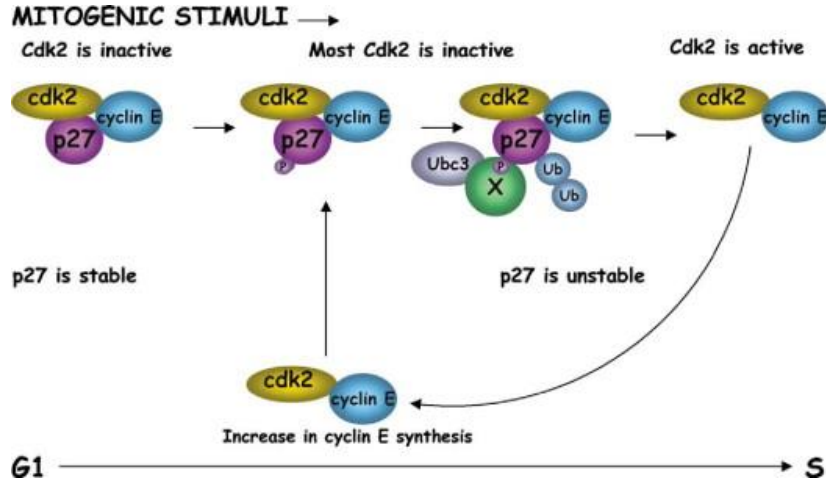
2.3.3.1. Cip/Kip ailesi:

(p21^{cip1}, p27^{kip1} ve p57^{kip2})

2.3.3.2. INK4/ARF ailesi:

(p14^{ARF}, p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d})

Hücrelerin düzensiz bir şekilde çoğalmasının (proliferasyon) sebebi hücrel döngüdeki kontrolü sağlayan siklin ve CDK'ların aktivasyonlarının düzen ve dengelerinin bozulmasıdır [23]. Siklin ve CDK'ların düzensiz salınımları, pek çok insan kanserlerinin sebebini oluşturmaktadır. CDK inhibitörlerinin yapılarının bozulması, CDK'ların ve siklinlerin düzen ve dengelerinin bozulmasına, bu mutasyonel bozulma da hücrenin düzensiz çoğalmasına sebep olur. Hücre döngüsünün düzeninde kilit rol oynayan dört önemli regülatör vardır. Bunlar: p16^{INK4a}, Siklin D, CDK4 ve RB dir. Bu regülatörlerden herhangi birinin düzenindeki bir mutasyon veya bozulma pekçok kanserin sebebini oluşturur. Bu bozulma hücre döngüsündeki kontrol mekanizmalarının bozulması veya kaybolması yoluyla olur [23].



Şekil 7: Hücre siklusunda siklin-CDK kompleks ekspresyonu ve p27 etkileşimi [25].

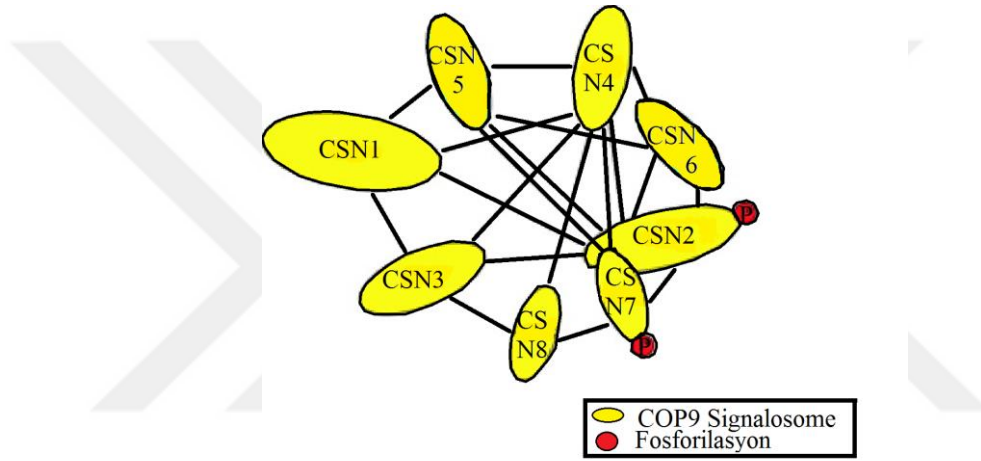
2.3.3.3. p27:

p27, CDK inhibitörü (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B ($p27^{Kip1}$)) olup insanda CDKN1B geni ile kodlanan enzim inhibitörleridir [26]. Hücre döngüsünde rol alan p27, G1→S aşamasına geçerken düzenleyici role sahip olan siklin E-CDK2 ve S döngüsünden mitotik profaza geçişteki (S→G2→M) siklin A-CDK2 bileşeninin potansiyel inhibitörüdür [27, 28]. (Şekil 7, 8). Bilindiği üzere p27 hücrenin kanserleşmesini baskılamada görevlidir. Fakat p27 nin mutasyonlara uğrayarak bozulması sonucu oluşan kanserleşme insanlarda çok az görülen durumdur [29]. Fakat hücresel döngüde regülatör özelliği olan p27 proteinin döngüsünün kırılması, hücrelerdeki miktarının azalması veya yokluğunun birçok kanser vakalarında görülmesinde, bu kanserlerin yayılmasında ve yaşamla bağdaşmamasında rolü olduğu bildirilmiştir [30]. p27'nin sitoplazmada veya nükleusta bulunduğu yerin ve hücre içindeki salınım miktarı arasında bağlantı vardır [31, 32, 33]. Önceki yıllarda yapılan çalışmalar, meme ve kolorektal karsinomlarda artmış tümör derecesi ve lenf nodu metastazı veya yaşamla bağdaşmayan vakalarda artmış p27 ekspresyonunun olduğunu

[39]. p27'nin proteazomal yıkımında rol alan skp2'nin ubiquinasyon için önemli olduğu gösterilmiştir [39, 40].

2.3.3.5. JAB1

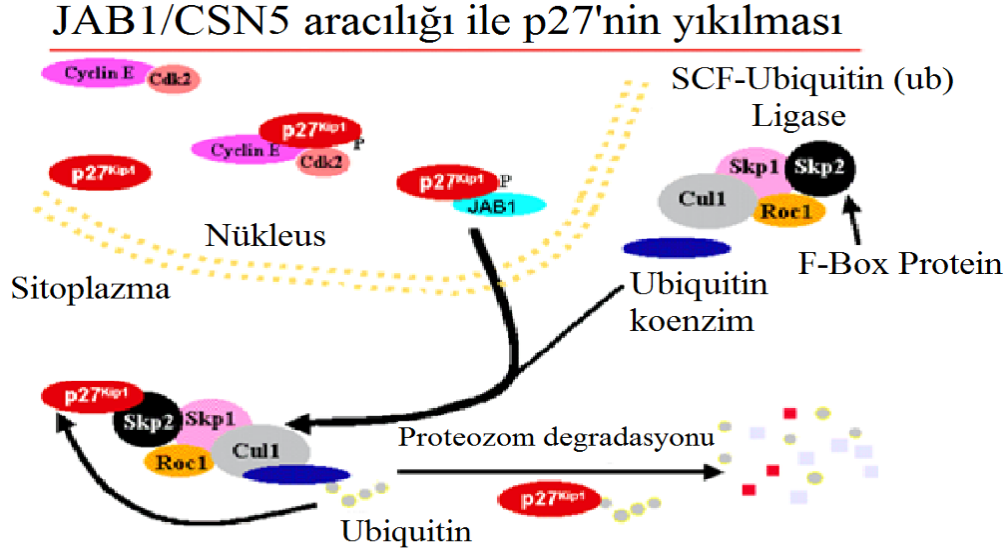
Jun activation domain-binding protein-1 (JAB1), Constitutive Photomorphogenic (COP9) Multiprotein Kompleksi'nin komponenti olan bir proteindir (Şekil 9). JAB1, COP9 signalasomunun 5'inci alt ünitesi olarak bilinir.



Şekil 9: COP9 signalasomunun alt ünitelerinin etkileşim modeli [41].

COP9 signalasomunun kütle dağılımı ve altbirim-altbirimi etkileşimleri temelinde, CSN kompleksinin bir modeli oluşturulmuştur (Şekil 9) [41]. CSN5 (JAB1) ilk kez hücre çoğalmasında rol alan gen düzenleyici AP-1 proteinin (c-jun/c-fos protoonkogen) koaktivatörü olarak bildirilmiştir [42]. Regülatör multi protein yapısında olan COP9, protein stabilitesini düzenlemede, gen transkripsiyonunda ve sinyal dönüşümünde önemli rol oynar. CSN5 (JAB1) bu multi proteinin beşinci alt ünitesidir. Bu yüzden JAB1, CSN5 olarak da adlandırılır [43, 44]. Nükleer export proteini olan CSN5 (JAB1), p27'nin çekirdekten sitoplazmaya taşınmasında ve burada p27 proteininin,

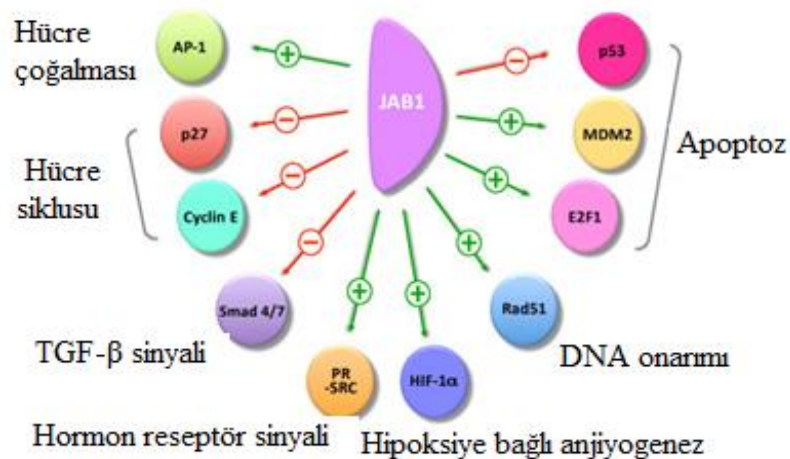
The Neuron Cytoplasmic Protein Gene Product 9,5 (PGP 9,5) ve CSN5 aracılığı ile degradasyonunda görev alır [45, 46].



Şekil 10: JAB1/CSN5'in etkin rolü ile p27^{kip1}'in degradasyonu [47].

JAB1/CSN5, COP9 signalosomunun bir komponentidir. JAB1, p27'i nukleustan sitoplazmaya taşıyarak burada F-Box protein ailesinin SCF kompleksinin substrat tanıma alt birimi olan Skp2'ye bağlanarak ubiquitin proteasome degradation yoluyla yıkımını sağlar (Şekil 10). Aynı zamanda JAB1/CSN5, TGF-β'i, "Mothers Against Decapentaplegic Homolog 7 (Smad7)" ye bağlamak ve bozulmasını desteklemek yoluyla (ilerletmek suretiyle) regüle eder. TGF-β ailesi üyeleri, hücre büyümesi, diferansiasyonu, apoptozisi ve morfogenezin şekillenmesini/şekillenme sürecini içeren geniş bir biyolojik aktivite dizisine sahiptir [42]. COP9 signalosome kompleksi ise ilk olarak 1996'da Chamovitz ve ark. tarafından bitkilerde ışık aracılı gelişimin/büyümenin bir regülatörü olarak izole edilmiştir. 450 kd ağırlığında 8 alt üiteden oluşan multikompleks soluble bir proteindir [42]. Hem in vivo hem in vitro olarak PGP 9,5'un JAB1 ile ilişkisi gösterilmiş olup ayrıca akciğer kanseri hücrelerinde nukleusta JAB1 ve PGP 9,5'un, p27

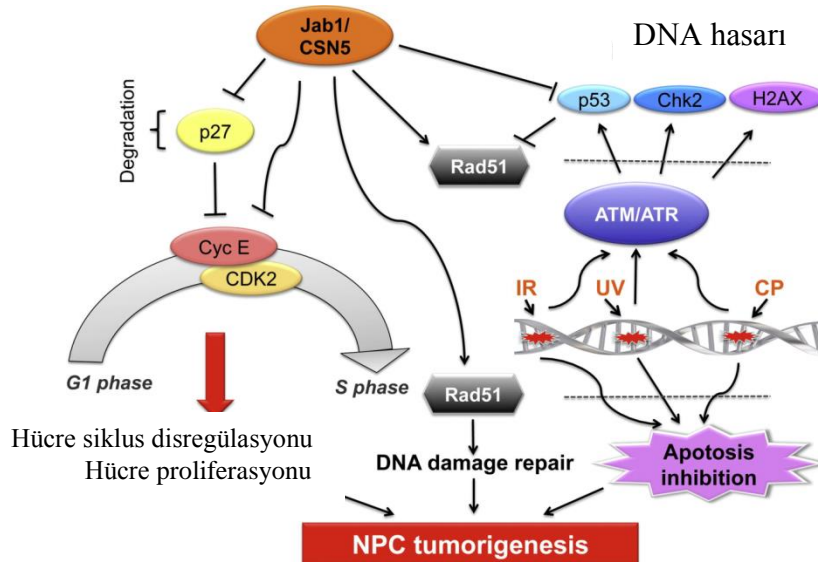
içeren heteromerik bir kompleksin parçaları olabileceği gösterilmiştir[42]. JAB1 ve PGP 9,5'un nükleer lokalizasyonunun, p27'nin nukleusta azalmış seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur. Tersine kontakt inhibisyonla PGP 9,5 ve JAB1 perinükleer veya sitoplazmik yerleşim gösterirse, p27 yalnızca nukleusta lokalize olmaktadır. Bu nedenle PGP 9,5, JAB1 ile olan etkileşimi ve nükleer translokasyonu ile p27 degradasyonunda rol alabilmektedir [45, 46]. JAB1/CSN5 ilk olarak Claret ve ark. tarafından hücre proliferasyonunda görev alan gen regülatörü olan aktivatör protein 1 (AP-1) koaktivatörü olarak tanımlanmıştır. Kwok ve ark. 1998'de, Ferlich ve ark. ise 1999'da JAB1/CSN5'in diğer CSN alt ünitelerine benzemeyen şekilde CSN kompleksten bağımsız olarak da çalışabildiği gösterilmiştir [64]. Yine Kwok ve ark. 1998'de, Ferlich ve ark. ise 1999'da Arabidopsis ve Drosophila'da CSN alt ünitelerinde meydana gelmiş mutasyonların bunların gelişimlerinin durmalarına ya da ölümlerine neden olduğu gösterilmiştir [42]. Gerek CSN kompleksine bağımlı gerekse CSN kompleksinden bağımsız JAB1/CSN5'in çok çeşitli proteinlerle ortak çalışmak yolu ile pek çok biyolojik süreçte görev aldığı gösterilmiştir [67].



Şekil 11: Jab1/CSN5'in hedefleri ve regülasyonları [48].

Şekil 11’de yeşil ok ve artı (+) işaretleri Jab1/CSN5-positive etkileşimi gösterir; kırmızı oklar ve eksi (-) işaretleri Jab1/CSN5-negatif etkileşimi gösterir. Kısaltmalar: AP-1, activator protein 1; HIF-1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; MDM2, murine double minute 2; PR, progesterone receptor, SRC-1, steroid receptor coactivator 1; TRC8, translocation in renal carcinoma [49].

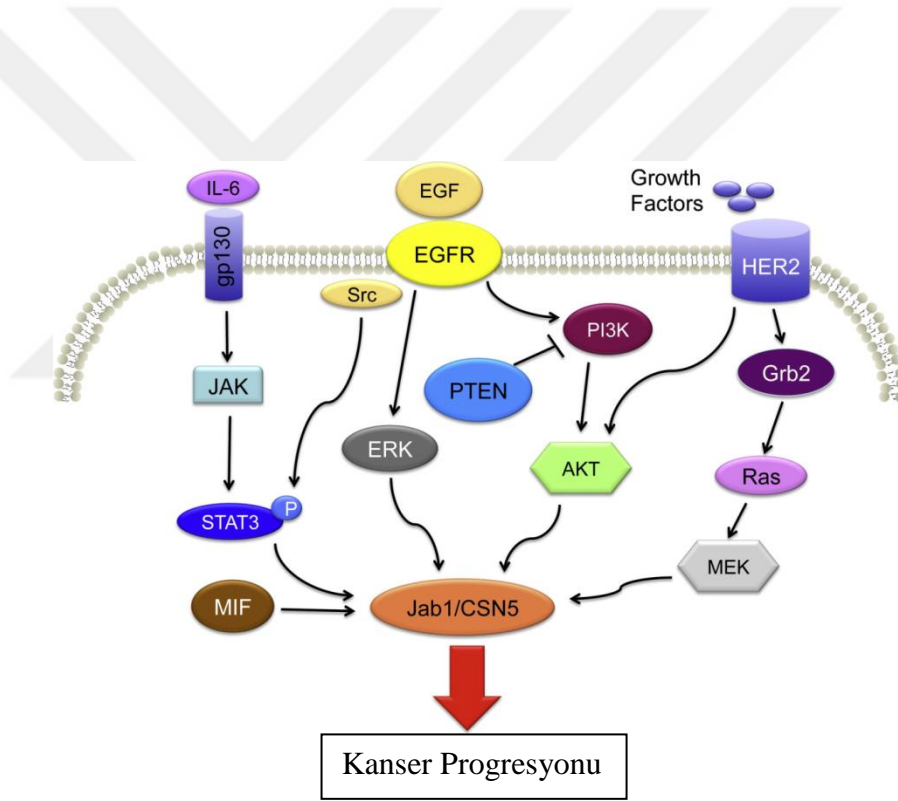
JAB1/CSN5 nin ortak çalıştığı proteinlerden en önemlisi p27 dir. p27-JAB1 ortak etkileşimi ile spesifik bir CDK inhibitörü olan p27 proteinine bağlanarak p27’yi nukleustan sitoplazmaya taşıyıp p27’nin 26s proteozom aracılı degradasyonunu artırdığı ve bu yolla p27 düzeyini azalttığı Tomoda ve arkadaşları tarafından 1999’da gösterilmiştir. Sui ve ark. yaptıkları çalışmada, JAB1’in spesifik olarak CDK inhibitörü p27 proteinine bağlanarak, p27’yi nukleustan sitoplazmaya taşıyarak ubiquitin-proteozom sistemi ile degradasyonunu artırdığı ve hücre içinde p27 düzeyini azalttığı gösterilmiştir [49].



Şekil 12: Jab1/CSN5 moleküler mekanizmaları genel bakış [50].

Jab1/CSN5 protein yıkımı ile p27 hücre döngüsü inhibitörü düzeyleri negatif

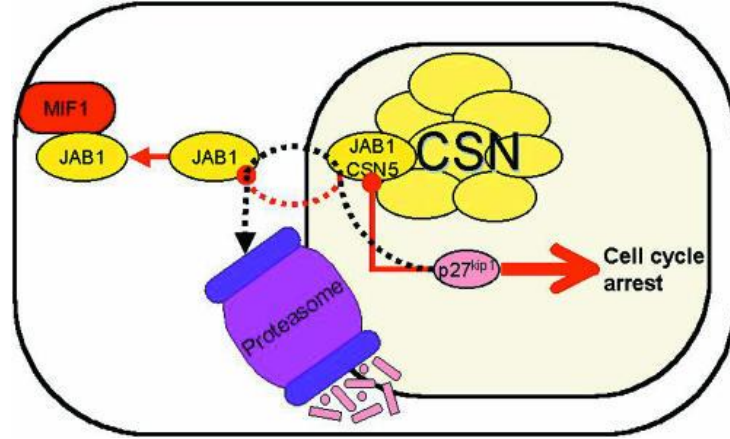
düzenlenmesi sonucu, hücre döngüsü regülasyon bozukluğu ve gelişmiş hücre çoğalması ile sonuçlanır. Ayrıca Jab1/CSN5, DNA hasarı onarım ve NPC apoptoz inhibisyonuna yol açan p53 ve RAD51'i düzenler [50]. (Şekil 12). Buna ek olarak JAB1-p27^{kip1} etkileşimindeki fonksiyonel rolü, tirozin kinaz growth reseptör HER-2/neu çalışmasıyla kanıtlandı [51 , 52 , 53]. Yang ve ark. tarafından 2000 yılında bu reseptörün overekspresyonuna bağlı kanser türlerinde artış olduğu gösterilmiştir. Her2/Neu, p27'yi down regüle ederek tirozin kinaz yolu ile hücre çoğalmasını stimüle eder, Her2/Neu p27 degradasyonunu ise JAB1'nın sitoplazmaya geçişini aktive ederek yapar [53].



Şekil 13: Kanserde diğer önemli sinyal yolları ile Jab1/CSN5 çapraz ilişkisinin diyagramı [50].

Kanserde JAB1/CSN5'in ekspresyonu ve IL-6/STAT3, EGFR/ERK, PI3K/AKT, HER2/Ras ile regülasyonu [50] (Şekil 13). Birkaç yıl önce yapılan son çalışmalarda ise JAB1'nın spesifik olarak CDK inhibitörü p27 proteinine bağlanarak, p27'yi nukleustan sitoplazmaya taşıyarak ubiquitin proteozom sistemi ile degradasyonunu arttırdığı ve

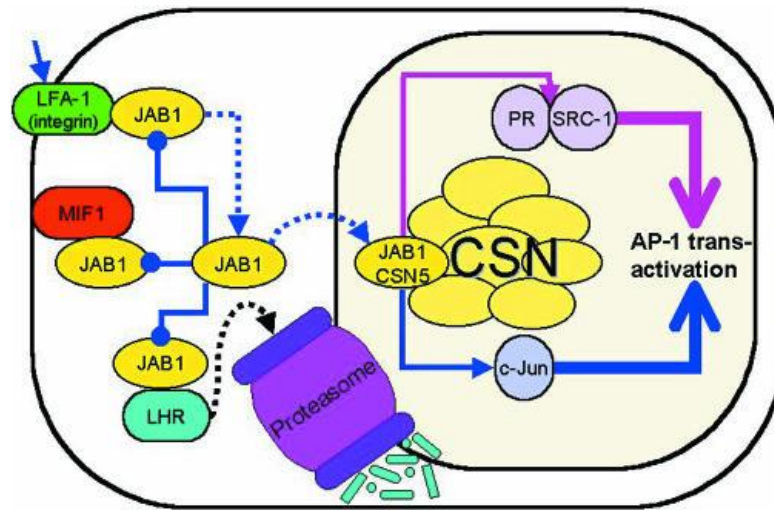
hücre içinde p27 düzeyini azalttığı gösterilmiştir. JAB1'nin çekirdekteki fonksiyonlarının yanısıra plazma membranında da fonksiyonu vardır [42]. Bianchi ve ark. 2000 yılında yaptıkları çalışmada, geçici olarak Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) (adezyon proteini) salgılayan bazı hücrelerde JAB1'nin aynı membran bölgesinde LFA-1'i zenginleştirdiğini göstermişlerdir [42]. CSN kompleksi hiçbir zaman membranda gösterilememiş olduğundan, JAB1'nin bu formunun CSN bağımsız formu olduğunu düşünmüşler. Aynı zamanda bu hücrelere ne zaman suni ya da fizyolojik ligandlarla muamele edilse membran JAB1'lerinin kaybolduğu ve aşama aşama sitoplazmadan çekirdeğe geçtikleri görülmüş. Buradan da JAB1 LFA-1 ilişkisinin çok spesifik olduğu sonucunu çıkarmışlardır. JAB1'nin; pankreatik duktal karsinom, laringeal skuamöz hücreli karsinom, akciğer adenokarsinomu, baş-boyun kanserleri, invaziv meme kanserleri, pitüiter tümörler, anaplastik büyük hücreli lenfomalar ve tiroid medüller karsinomu gibi daha pek çok tümörlerde artmış ekspresyonu tanımlanmıştır [22, 46]. Diğer bir JAB1 sitokin ilişkisi de Kleemann ve arkadaşları tarafından 2000 yılında aydınlatılmıştır. Bu çalışma JAB1'nin p27 ile hücre siklus kontrolündeki rolünü anlamada aydınlatıcı olmuştur. Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MİF) bir antiinflamatuvar faktördür ve eksojen (dışardan) uygulandığında intrasellüler JAB1'ni bağlar. MİF-JAB1 kompleksi sitozolde görülür. MİF'in JAB1 üzerinde inhibe edici etkisi vardır. Böylece MİF'in, JAB1 bağımlı p27 degradasyonunu durdurduğu gösterilmiştir [41].



Şekil 14: P27 aracılı hücre siklusu kontrolünde JAB1/CSN5 fonksiyonunun modellenmesi[41].

İçi dolu çemberlerle biten ince çizgiler inhibitör etkileşimlerini gösteriyor. Kapalı ok başlarıyla biten ince çizgiler stimulan etkileşimlerini gösteriyor. Noktalı çizgiler protein hareketlerini gösteriyor.

p27'nin JAB1'a bağlanması, p27'nin nükleustan sitoplazmaya eş zamanlı taşınmasına, bozulmasına ve hücre döngüsünde ilerlemesine yol açar: MIF'e JAB1'ın bağlanması ise nükleusta P27'nin birikmesine ve hücre döngüsünün arrestine (durmasına) yol açar (Şekil 14).



Şekil 15: AP-1 transkripsiyon aracılı düzenlenmesinde JAB1/CSN5 fonksiyonunun modeli [42].

Şekil 15’de çizgi renklerinin özel fonksiyonları: Mavi, c-Jun aracılı trans, pembe, hormon reseptör aracılı transaktivasyonunun. Dolu daireler ile biten ince çizgiler inhibitör etkileşimleri temsil eder. Kapalı ok uçları ile biten ince çizgiler uyarıcı etkileşimleri temsil eder. Noktalı çizgiler protein hareketi gösterir.

Jab1, c-Jun sayesinde AP-1 transaktivasyonuna aracılık eder. LFA-1, MIF veya LHR ile JAB1 etkileşimi, AP-1 transaktivasyonunu engeller. AP-1 transaktivasyonda nükleustan ekstrasellüler yüzeye yeniden dağılan serbest JAB1, LFA1’e bağlanır. Aynı zamanda PR ve SRC-1, JAB1/CSN5 bağlanması, AP-1 transaktivasyonunu indükler. CSN içindeki protein-protein etkileşimleri belirtilmemiş [42].

JAB1 hücre proliferasyonunun kontrolü ve multiple proteinlerin stabilitesine katılan çok fonksiyonlu bir proteindir. JAB1’nın aşırı salgılanması insan kanserlerinin patogenezinin sorumlu görülmüştür. JAB1 birkaç anahtar proteini regüle eder ve böylece hücre siklusu progresyonunda, genom stabilitesinde ve hücre yaşamında değişiklik meydana getirir. Fakat bu hücre sel sinyal yollarında JAB1 aktivitesinin biyolojik önemi henüz tam olarak belirlenmemiştir [54]. JAB1 eksikliği olan farelerin saf embriyoları ve heterozigot hücreleri analiz edildiğinde, farelerde apoptozun hızlanmasına bağlı olarak erken embriyonik ölümlerle sonuçlandığı görülür. JAB1 ekspresyonunun kaybı, hem primer embriyonik fibroblastları, hemde γ (gama) radyasyonunun indüklediği osteosarkoma hücrelerini duyarlı hale getirdiği görülür. Ayrıca spontan DNA hasarı ve homolog rekombinant defektlerini arttırmasıyla korele olarak da DNA onarım proteini olan Rad51 seviyesinde azalış ve p53 seviyesinde artış görülür. Dahası, biriken p53 doğrudan Rad51 proteinine bağlanarak, aktivitesini inhibe ederek, JAB1 eksikliği olan hücrelerde homolog rekombinant onarım defekti altında

yatan önemli bir mekanizmayı temsil etmektedir. Buna göre, JAB1 verimli bir DNA onarımı, kurduğu mekanik bağlantılarla genom bütünlüğünün korunması ve hücrel sağkalım için gereklidir [54]. Eksojen ajanların sebep olduğu lezyonlar, DNA'nın spontan bozulması, replikasyon hataları ve diğer tipteki hasarlar normal metabolik aktivitelerle sonuçlanır [55]. Hasarlı DNA'nın onarımı, genomik bütünlük ve hücrel sağkalım bakımından çok önemlidir [56]. Tian ve ark. yaptıkları çalışmalarda, eksojen DNA hasar uyarısı olmadığında, JAB1 eksikliği olan embriyolar ve osteosarkoma hücrelerinde spontan gelişen genom fenotip bozukluğunda artış gördüler. Bu bulgular doğrultusunda, JAB1 eksikliği olan hücrelerin spontan DNA kırıklarına yol açtığını ve böylelikle JAB1'nin eksikliğinin DNA onarımını etkileyebildiğini gösterdiler [54]. Çift zincir kırılması [Double Strain Break (DSB)] en ölümcül DNA hasarıdır. DSB ya düzgün bir şekilde onarılır, genomik bütünlük düzeltilir ya da onarılmaz ve hücrel ölüm, genomik düzensizlik ve kanser gibi ciddi sonuçlar meydana gelir [56]. DSB'lerin onarımı için memeli hücrelerinde bir dizi yöntem geliştirilmiştir ve bunların en önemlisi de DNA replikasyonu esnasında S fazı boyunca predominant halde bulunan homolog rekombinantdır (HR). Çünkü HR hatasızdır ve genom bakımından ve hücrel sağ kalımında kritik bir role sahiptir [57, 58]. Ökaryotlarda DNA onarım proteini olan Rad51, DSB'lerin HR aracılığıyla onarım yaparken nükleoprotein iplikçiklerini şekle sokarak ve DNA ikili iplikçikleri arasında iplikçikleri değişim yaparak merkezi bir rol oynar [59, 60]. Rad51'in, eksojen DNA hasarı ajanlarına ve çoğalan hücrelerdeki ani oluşan kromozom kırıklarına karşı verdiği tepki, embriyonik sağ kalım için önemlidir [61, 62].

Çevredeki fiziksel ve kimyasal faktörler tarafından DNA'nın yapısal bütünlüğü sürekli olarak değişime zorlanmaktadır. Tian ve ark. elde ettikleri sonuçlara göre, artmış sayıdaki spontan DNA kırığının, azalmış Rad51 ekspresyonuyla ilişkili olması, JAB1

eksikliği olan hücrelerde spontan DNA kırıklarının artması, DNA onarımında hata olduğunu göstermişlerdir. Bu, JAB1 eksikliği olan farelerdeki embriyonik letaliteyi ve bozulmuş büyüme kapasitesiyle JAB1^{+/-} Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)'lardaki hücre ölümü artışının sebebini açıklayabilir [54]. İnsan rekombinant Rad51 proteini, genom bütünlüğü ve kanser gelişimi bakımından anahtar bir proteindir [59, 63]. JAB1'da olduğu gibi Rad51'in de artmış ekspresyonu, çeşitli kötü huylu kanser tiplerinde (akciğer, göğüs, pankreas) görüldüğü rapor edilmiştir [64]. Ek olarak, kötü huylu transformasyonu indükleyen farklılaşmış hücre tiplerinin bir kısmında aşırı miktarda Rad51 gözlemlenir [65, 66]. İnsan rekombinansında Rad51, genom bütünlüğü ve kanser gelişimi bakımından anahtar bir proteindir. DNA hasarının yol açtığı hücre ölümleri ve hücre siklusunun durmasına karşı, çoğalan hücreleri öldürmek için, pek çok kemoterapotik ilaç kullanılmıştır. Ama bu terapötik ajanların hücrelerin DNA'sını tamir yetenekleri azalmıştır. Bu nedenle, Rad51'in inhibisyonu, kanser hücrelerini kemoterapi ve radyoterapiye hassas hale getirmenin yolu olarak keşfedilmiştir. JAB1 eksikliğinde Rad51 seviyesinin azalması, JAB1'nin inhibisyonunu olanaklı kılarak, bu hücrelerin DNA hasarı veren kemoterapotik ajanlara veya Immuno Response (İR) karşı hassasiyet geliştirmesine neden olur. JAB1'nin inhibisyonu sadece kanserli hücrelerin proliferasyonunu durdurmaz, aynı zamanda kanser terapisinden sonra DNA HR onarımını azaltır [54]. JAB1 ve Rad51 inhibisyonu arasındaki ilişki, ilaç ve İR terapötik dayanım daha ileri çalışmaların konusu olabilir. JAB1 gen hedefli embriyolarında, DSB onarımındaki defektler, homozigot JAB1 baskılanmış farelerde hücre ölümüne yol açar. Bu onlara JAB1 eksikliği olan hücreler ve embriyolarda, p53'ün birikmesinin Rad51'in promotor aktivitesini baskıladığı ve HR onarım defektlerinde majör mekanizma olarak rol aldığını düşündürdü [54].

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda yaşları 18-50 arasında olan, Üroloji kliniğine müracaat eden 20 fertil bireyin ve 20 infertil hastanın semen örnekleri alınarak, 20 kişiden oluşan iki gruba ayrıldı. Birinci grubumuz fertil bireylerden oluşurken ikinci grubumuz infertil bireylerden oluşmaktaydı. Her iki grubun bireyelerine semen analizi (Spermiyogram) yapıldıktan sonra arta kalan semen örnekleri aşağıda belirtilen deneysel amaçlı çalışmalar için kullanıldı. Steril kutular içerisinde hasta gruplarından elde edilen örnekler 37⁰C'de likefiye edilip, spermiyogram özelliklerine göre; hacim, konsantrasyon, motilite ve morfoloji yönünden değerlendirildi. Semen örneğinin artakalan kısmı kapasitasyon çalışmalarında kullanıldı. Sperm seleksiyon yöntemi olan isolate gradient (%45-%85) ile yıkandı, sperm ve seminal sıvı içeriği normal santrifügasyon ile birbirinden ayrıldı. Elde edilen sperm peleti, HTF (Human tubal fluid) ile muamele edilip, sperm örneği morfoloji, immunositokimya ve kapasitasyon çalışmaları için kullanıldı. Çalışmada kullandığımız labaratuvar testleri şu şekildedir:

3.1. Spermiyogram:

Spermiyogram, semen örneğinin makroskobik ve mikroskobik yönünden incelenmesidir. Semen örneği, makroskobik olarak; renk, koku, vizkozite, likefaksiyon süresi ve pH yönünden değerlendirilirken; mikroskobik olarak da; motilitesi, morfolojisi ve aglitünasyonu yönünden değerlendirilir. Sperm konsantrasyonu, motilitesi [(A- İleri hızlı doğrusal progresif hareket (lineer progresif), B- İleri yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan hızlı hareket (non-lineer progresif), C- Progresif olmayan hareket (yerinde hareketli) (non-progresif motilite), D- Hareketsiz (non motile)] ve hacmi WHO kriterleri göz önüne alınarak Makler chamber sayım kamerası ile sayılarak değerlendirildi.

3.2. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi:

Yukarıda belirtildiği şekilde yıkanıp muamele edilen sperm örneği lamalar üzerine yayılıp Diff-Quik boyası ile aşağıda belirttiğimiz aşamalardan geçirilerek boyandıktan sonra, Kruger kriterlerine dayalı sperm morfolojisinin değerlendirilmesi yapıldı.

3.3. Morfolojik Ölçüm ve Değerlendirme:

Isolate gradientle seçilmiş ve normal yıkama ile elde edilmiş sperm örnekleri lamalar üzerine yayıldıktan sonra bu slaytlar üzerinde JAB1 proteinin lokalizasyonu immunositokimya ile belirlendi. JAB1 ile pozitif reaksiyon gösteren sperm bölgeleri morfolojik yönden değerlendirildi. Boyanmanın olduğu bölgeler (kuyruk, baş, boyun, akrozom, ekvatoryal bölge gibi) her bir hastada 200 sperm olmak koşuluyla değerlendirilip, bu bölgelerin uzunluk, genişlik, alan ve hacimleri hesaplandı. Ayrıca normal semen örneklerindeki spermler, isolate ile seçilmiş olan hareketli spermlerle karşılaştırılıp, yukarıda belirtilen parametreler yönünden farklılıkların olup olmadığına bakıldı.

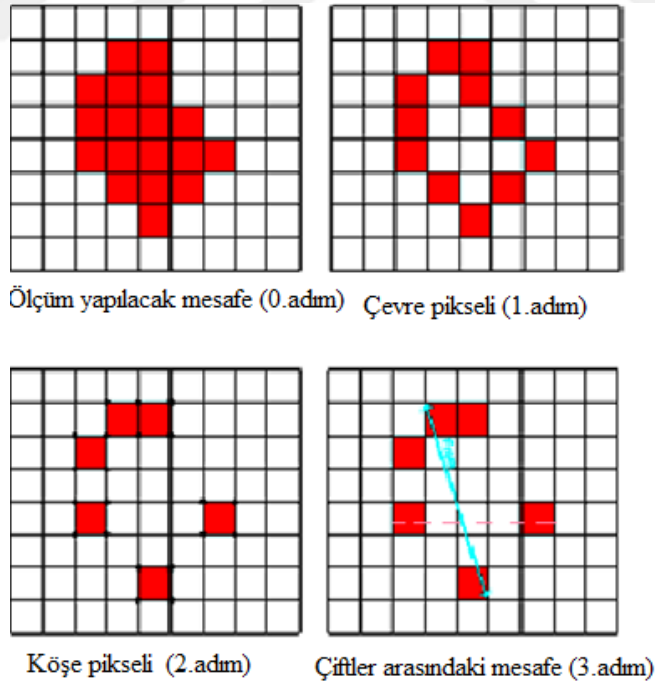
3.4. Maksimum Feret Aralığı:

Maksimum feret çapı mikron olarak ifade edilir ve görüntü yakalandığı zamanki açışal dönüşten bağımsız olarak parçacığın en büyük boyutunu temsil eder. Maksimum feret çapı, nesnenin çevresinde ki köşelerde bulunan pikseller izole edildikten sonra her köşe pikseli arasındaki mesafe alınarak hesaplanır. Bu algoritmanın grafik sunumu şekil 16'de görülmüyor. Piksel olarak en uzun boyutu tespit edildikten sonra, tespit edilen bu değer doğabilecek hatalardan kaçınmak için özel hesaplama teknikleri kullanılarak, görünen boyutların alana göre doğrudan hesaplanması ile mikrona dönüştürülür. Elde

edilen mikron cinsindeki bu değer maksimum feret (max feret) olarak adlandırılır [67, 68].

3.5. Minimum Feret Aralığı:

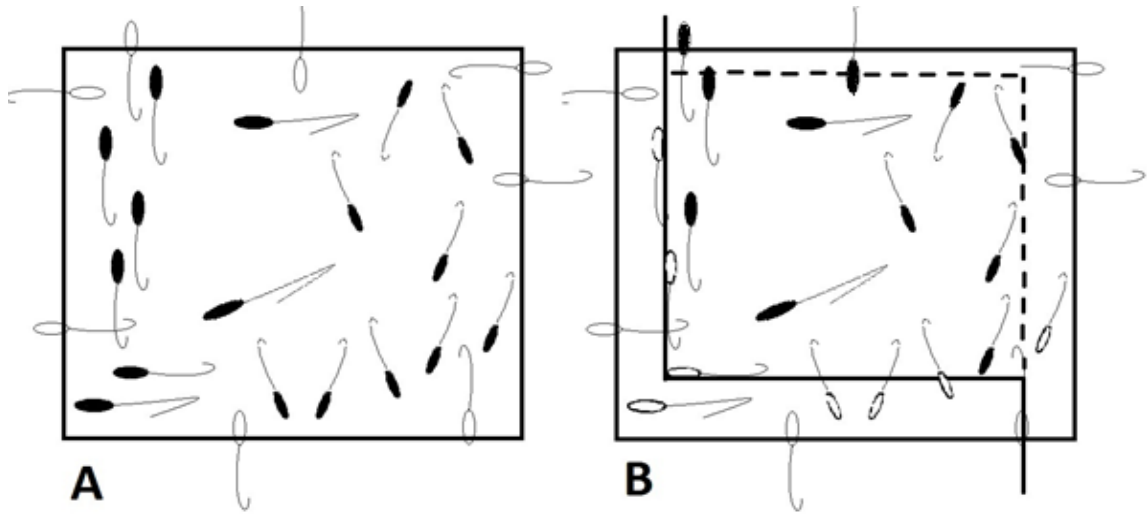
Minumum feret çapı mikron olarak ifade edilir ve görüntü yakalandığı zamanki açısal dönüşten bağımsız olarak parçacığın en küçük boyutunu temsil eder. Minumum feret çapı, nesnenin çevresindeki köşelerde bulunan pikseller izole edildikten sonra her köşe pikseli arasındaki mesafe alınarak hesaplanır. Bu algoritmanın grafik sunumu şekil 16'de görülüyor. Piksel olarak en küçük boyutu tespit edildikten sonra, tespit edilen bu değer doğabilecek hatalardan kaçınmak için özel hesaplama teknikleri kullanılarak, görünen boyutların alana göre doğrudan hesaplanması ile mikrona dönüştürülür. Elde edilen mikron cinsindeki bu değer minimum feret (min feret) olarak adlandırılır [67, 68].



Şekil 16: Bir algoritmanın (Sperm başının) grafik gösterimi.[68]

3.6. Tarafsız Sayım Çerçevesi

En doğru partikül sayımı için şuan günümüzde pek çok alanda kullanılan en etkin ve güvenilir sayım alanı tarafsız sayım çerçevesidir. Gundersen 1977’de bu tarafsız sayım çerçevesinin partikül izdüşümlerinin gerçek sayı değerine en yakın ve doğru bir şekilde sayma olanağını kazandırdığını geometrik hesaplamalar ile matematiksel olarak kanıtlamıştır [69].



Şekil 17: İki boyutlu kesit alanlarında profillerin örneklenişini gösterir diyagram.

A: Sperm yayması yapılmış bir preparattaki örneklenen alanlardan birinin şekli.

B: Tarafsız sayım çerçevesi kullanılarak sperm yayması yapılmış bir preparattaki örneklenen alanlardan birinin şekli.

Şekil 17-A da sperm yayması yapılmış bir preparattaki örneklenen alanlardan birinin şekli görülmektedir. Sperm hücrelerinin tüm bölümleri görüntü alanımız içerisinde bulunanlar siyah, kenarlara temas edenler veya bir kısmının görüntü alanımız içerisinde diğer kısmının görüntü alanımız dışında olanlar beyaz renkte gösterildi. Kullanacağımız sayım kuralına göre sayılan sperm hücrelerinin sayısı farklı çıkabilir. Örneğin şekil 17-A

daki sadece siyah boyanmış sperm hücreleri sayılırsa elde edeceğimiz sayı 17 olurken, kenarlara temas eden sperm hücreleride sayıma dahil edilirse bu sefer sonucu 25 buluruz. Görüntü alanımızın kenarlarına değenlerin yarısını hesaba katacak olursak bu sefer elde ettiğimiz sayım 21 olacaktır. Şekil 17-A için şimdiye kadar uyguladığımız sayım metotlarının hiçbirisi tarafsız değildir. Yani bu sayım metotlarının hepsinde gerçek değerden sistematik olarak uzaklaşır.

Şekil 17-B de ise 1977 yılında Gundersen tarafından geliştirilen bir tarafsız sayım çerçevesi ve bu çerçevenin kullanım prensibi ile uygulanmış doğru bir sayım işlemi gösterilmiştir. Bu uygulama şekline göre çerçeve içerisinde olanlara ilave olarak çerçevemizin üst ve sağ kenarlarına (kesikli çizgiyle gösterilen kısım) değen sperm hücreleri sayıma katılır. Fakat alt ve sol kenarlara ve bunların uzantılarına (düz siyah çizgili kenar/yasaklanmış kenar) değen sperm hücreleri sayım dışı bırakılır. Bu sayım metoduna göre sayım alanımızda 11 tane sperm hücresi (siyah renkte olanlar) sayılmaktadır. Bu sayım metoduna göre görüntülediğimiz alan tarafsız sayım çerçevesi ile daraltıldığından buradan elde ettiğimiz sayısal değerler daha öncekiler ile direkt olarak karşılaştıramayız. Ancak bir düzlemdeki partikül sayısını belirli bir alan ile tarafsız bir sayım şeklinde gösterebileceğimiz yegane ve en pratik kural budur [69].

3.7. Kapasitasyon Çalışmaları

3.7.1. Spermatozoaların Kapasitasyonu

Kapasitasyon, sperm hücresinin kadın genital sistemi içersine girdikten sonra oositi fertilize edebilme yeteneği kazanmasına denir. Sperm hücresi ejakülasyondan hemen sonra kadın genital sistemine girse ve motil olsa bile oositi fertilize etme yeteneğine/kapasitesine sahip değildir. Fakat kadın genital sisteminde belli bir aşamayı ve

mesafeyi katettikten sonra burada bulunan bazı faktörlerin yardımı ve etkisiyle sperm hücreleri oositi fertilize edebilme yeteneğine ve kapasitesine sahip olabilirler. Kapasitasyonda protein kinazlar tarafından belirli proteinlerin fosforilasyonu sayesinde, sperm hücrelerinin membranlarında ve hücre içinde bir dizi olaylar ve değişimler meydana gelir. Bu değişimler sperm hücresinin hiperaktif motiliteye, akrozom reaksiyonuna bununla birlikte oolemma ile sperm membranının füzyonunun meydana gelmesi için çevre ortamından gelecek bir takım fizyolojik sitümleri alabilecek pozisyona gelmesidir. Yanagimachi'nin 1994 yılında yayınlamış olduğu makalede kapasitasyon için geçen sürenin her insanda farklı zaman dilimlerine sahip olduğu bildirmiştir [70].

Kapasitasyonun önemi kadar; dekapasitasyon (kapasitasyon önleyici), dekapasitasyon faktörleri ve bu dekapasitasyonun sürecide önemlidir. Spermatozoalar kapasitasyona uğrarken bu dekapasitasyon faktörlerinden arındırılırlar ve tubaların ampullalarında uygun ortam bulunduğu fertilizasyon gerçekleşebilir. Sperm hücreleri Epididimiste, kuyruk hareketlerinin daha güçlü olması için sperm plazma zarında disülfid bağları oluşur. Bunun yanı sıra hücre zarlarında meydana gelen bazı maturasyonların sonucunda da sinyal iletim sistemi olgunlaşarak sperm hücrelerinin hiperaktivitesi ve akrozom reaksiyonunun oluşabilmesi için gerekli ortam sağlanmış olur. Fakat sperm hücreleri epididimiste kapasitasyon baskılayıcı faktörler veya eksik olan bazı etmenler nedeniyle oositi fertilize edebilme yeteneğine henüz sahip değildirler. Seminal veziküllerden salgılanılan dekapasitasyon faktörleri de ejakülasyon sırasında semene katılarak sperm hücrelerinin/spermatozoların erken kapasite olmalarını engellemiş olurlar. Bu dekapasitasyonun olması önemlidir. Çünkü kapasite olan sperm hücresinin oositi dölliyebilme yeteneği/kapasitesi bir süre sonra sona ermektedir. Bu sona erme

spermatozoaların yumurta hücresine ulaşmadan gerçekleşirse infertilite görülür. Dişi genital sistemine giren sperm hücreleri serviks, uterus ve tubalar içerisinde bu dekapasitasyon etmenlerinden ve faktörlerinden sperm hücresini arındırırlar. Akabinde sperm hücrelerinin membranında ki kolesterolün bağlanması ve dışarı atılması gerçekleşir. Bu olay spermatozoaların kapasitasyonu için en önemli olaylardan biridir [71]. Tuba uterinanın epiteline tutunmuş olan spermatozoalar kapasitasyona uğradıktan sonra hiperaktif motilite kabiliyetini kazanarak buradan ayrılıp oosite doğru ilerlerler [72]. Kapasitasyon G-protein bağımlı, cAMP-bağımlı, redoks-bağımlı, kinaz-bağımlı, ve kalsiyum-bağımlı bir olaydır[73].

Oviduktal ortamın taklit edildiği invitro ortamda seminal plazmanın bulunmaması gerekir. Yoksa bu seminal plazmanın varlığı kapasitasyonun oluşmasını baskılar. Kapasitasyonun oluşabilmesi için ortamda enerji kaynakları, serum albümin, glikoz ve bikarbonat iyonları olmalıdır. Albümin, kapasitasyonda en önemli basamaklardan biri olan membrandaki kolesterolü bağlar ve arındırır bunun sonucunda membranın biyofiziksel özellikleri değişir ve hücre zarının fluiditesini yükselterek çevreden gelecek olan sinyal ve uyarılara açık ve etkin bir hale gelir. Kapasitasyon esnasında insan spermünde, kalsiyum iyon konsantrasyonu, progesteron ve zona proteinlerine olan hassasiyeti artar. Kapasitasyon spermatozoaların geçici bir süreliğine kazanmış oldukları bir işlevdir. Bütün spermatozoalar aynı anda kapasitasyona başlayıp aynı anda kapasitasyondan çıkmazlar. Her biri farklı farklı zamanlarda kapasite olurlar ve belli bir sürenin sonunda da (farklı farklı zamanlarda da) bu kapasitasyon kabiliyetinden çıkarlar ve dölleme yeteneğini kaybederler. Hatta bazı spermatozoalar kapasitasyonunu tamamladığında bazı spermatozoalar kapasitasyonuna yeni başlamış olurlar. Sperm hücrelerinin invitro şartlarda kapasitasyonunu sağlamak için ortamda mutlaka kalsiyum

iyonunun bulunması gerekir. Çünkü kalsiyum iyonunun fosfatlar, fosfodiesterazlar ve adenil siklazlar gibi pek çok hücre içi enzimlerin reaksiyonlarında etkin rollere sahip olduğu bilinmekte. Kalsiyumun hücre içindeki miktarının artışının mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmasının yanında Dragileva ve ark. 1999'da kalsiyum girişini, kalsiyum pompası(Ca-Mg-ATPaz)'nın ayarladığı yönünde görüş bildirmiştir [74]. Bunun yanı sıra hücre membranındaki kalsiyum kanallarının açılması söz konusu olabilir, ama Florman 1994 de yapmış olduğu çalışmada spermatozoalarda voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının bulunduğunu kesin olarak gösterememiştir [75]. Sperm hücrelerinin iç ortamının pH'nın yükseltilmesi yani alkalizasyonu, kalsiyum kanallarının açılmasına ve hücre içersine kalsiyum iyonlarının gimesini ve artmasını sağlar [76]. Kapasitasyon mekanizmasının başlamasını uyaran bir diğer önemli etmen sperm hücrelerinin içindeki pH'nın yükselmesidir. Holappa 1999'da sperm hücrelerinin bulunduğu ortamda HCO₃ iyonlarının bulunması gerektiği ve bu hücrelerde Na bağımlı Cl-HCO₃ pompasının bulunduğu gösterilmesi, sperm hücrelerinin içinin alkali olmasının gerekliliğini belirtmiştir [77]. Birçok çalışma hücre içindeki cAMP miktarının artmasının pH ve kalsiyumun miktarının artmasıyla ilişkili olduğu belirtilmesine karşın diğer çalışmalarda kalsiyumun artmasının cAMP'ı arttırdığı yönünde görüş bildirmişlerdir [78].

Bu bilgiler doğrultusunda fertil bireylere ait semen örneği isolate gradient ile yıkandıktan sonra, elde edilen sperm peletleri human tubal fluid (HTF) solüsyonu ile resuspende edilip (Yöntem kısmında anlatılan işlemlere tabii tutuldu) ve hiç bekletilmeden lamlara yayılarak kurutuldu. Sonra tespit edilip immunositokimyasal boyama yöntemiyle lamlar işlemlerden geçirildi ve lamlar Aqueous-Mount Solüsyon'u ile kapatılıp incelenmek üzere kurumaya bırakıldı. Bu bizim sıfıncı saat JAB1 grubumuzdu. Sonra spermlerin kapasitasyonunu sağlamak amacıyla elimizde kalan

semen örneğini Human Tubal Fluid Solüsyon'lu karışım ile 37 °C'de etüvde 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda bu karışımdan bir miktar (10 µl) alınarak lamlara yayıldı ve kurutuldu. Sonra tespit edilip immunositokimyasal boyama yöntemiyle lamlar işlemlerden geçirildi, JAB1 Rabbit Polyclonal Antikoru (Abcam ab12184) ile boyandı ve lamlar Aqueous-Mount Solüsyon'u ile kapatılıp incelenmek üzere kurumaya bırakıldı. Bu da bizim birinci saat JAB1 grubumuz oldu. Sonra elimizde kalan semen Human Tubal Fluid Solüsyon'lu karışım 37 °C'de etüvde 3 saat daha bekletildi (Yani toplamda 4 saat bekletildi.) 4 saat sonunda bu karışımdan bir miktar (10 µl) alınarak lamlara yayıldı ve kurutuldu. Sonra tespit edilip immunositokimyasal boyama yöntemiyle lamlar işlemlerden geçirildi ve lamlar Aqueous-Mount Solüsyon'u ile kapatılıp incelenmek üzere kurumaya bırakıldı. Bu da bizim dördüncü saat JAB1 grubumuz oldu. İmmunositokimyasal boyama sonucunda JAB1 lokalizasyonunda, kapasitasyona bağlı olarak bir farklılığın olup olmadığı 0, 1 ve 4. saatlerdeki boyanmalar mikroskopik (Nikon E200 ECLIPSE ve Nikon Digital Sight DS-U2, Basic Research NIS-Elements BR) iş istasyonu ile incelemeye ve analize tabi tutularak karşılaştırıldı.

3.8. Darkness Factor (Karanlık Faktörü/Boyanma Şiddeti)

İsminden de anlaşılacağı gibi karanlık seviyesinin değeridir. Bir beyaz kağıdın üzerine konulan siyah noktanın sıklığı/çokluğu ile doğru orantılı olan koyuluk seviyesinin/derecesinin/şiddetinin her bir basamağına verilen değerler ile boyanmama durumunda verilen sıfır değerlerinin sayılan partiküllerin sayısı ile çarpılması sonucu elde edilen sayısal değerler toplamına darkness faktörü denir. Yani bir yapının boyanma şiddeti/derecesi o yapıda bir derecede koyuluk (renk tonu farkı) meydana getirecek ve bu meydana gelen koyuluğun derecesine göre kendimiz bir değer belirliyoruz. Mesela

elimizde kırık DNA yapılarını boyayan bir boyamız olsun. Bu boya ile bir sperm hücresindeki kırık DNA'ları boyamak istediğimizde, o bölgede hiç kırık DNA molekülü yok ise herhangi bir boyanma olmayacaktır. Biz burada hiç boyanmayan hücreye darkness faktörü olarak vereceğimiz değer sıfırdır ve bunun darkness faktörü “0 x boyanmayan hücre sayısıdır.”. Yani hiç boyanma yok. Bir ya da birkaç DNA kırığı var ise o bölgede hafif bir koyuluk meydana gelecektir. Bu koyuluğa ise +1 değerini verecek olursak yapacağımız hesaplama “+1 x boyanan hücre sayısı” dır. Fakat ortamda birkaç taneden fazla DNA kırığı var ise boyanma biraz daha fazla olacağı için koyuluk dereceside bununla beraber doğru orantılı olarak artacaktır ve o bölge koyu görünecektir. Bu koyuluğun seviyesine/derecesine ise +2 değerini verecek olursak yapacağımız hesaplama “+2 x boyanan hücre sayısı” dır. Eğer ortamda çok fazla DNA molekülü kırığı var ise bununla beraber doğru orantılı olarak boyanma koyuluğu/derecesi de daha fazla olacaktır. Bu seviyedeki bir boyanmaya bizim vereceğimiz değer +3 olsun. Bunun darkness faktörü hesaplanması “+3 x boyanan hücre sayısı” dır. Sonra bunların hepsinin toplamı, toplam darkness faktör değerini bize verir. Yani: (0 x boyanmayan hücre sayısı)+(1 x boyanan hücre sayısı)+(2 x boyanan hücre sayısı)+(3 x boyanan hücre sayısı)]=toplam darkness factor değerini bize verir.

$$TDF = ((0xBn_0) + (1xBn_1) + (2xBn_2) + (3xBn_3))$$

TDF, toplam darkness factor; Bn_0 , boyanmayan sperm hücre sayısı; Bn_1 , +1 şiddetinde boyanan sperm hücre sayısı; Bn_2 , +2 şiddetinde boyanan sperm hücre sayısı; Bn_3 , +3 şiddetinde boyanan sperm hücre sayısı;

İmmünohistokimyasal boyama, aşağıda belirttiğimiz basamaklara uyularak yapıldı.

Bu basamaklar:

- 1- Yayma preparatı hazırlandı,
- 2- PBS ile yıkama yapıldı,
- 3- %3-4 formalin ile 5 dk oda sıcaklığında fiksasyona tabii tutuldu,
- 4- İki kez soğuk PBS'te yıkandı,
- 5- Permeabilizasyona tabii tutuldu.
- 6- PBS'li %0,25'lik Triton X-100 içerisinde inkübe edildi,
- 7- PBS'de 3x5 dk yıkama yapıldı,
- 8- Blocking ve incubation aşamalarına tabii tutuldu,
- 9- Hücreleri %1'lik BSA ile 30 dk inkübe edildi,
- 10- %1'lik BSA ile Antibody dilüe edilip, 60 dk odasıcaklığında inkübe edildi,
- 11- PBS ile 3x5 dk yıkama yapıldı,
- 12- %1'lik BSA içersinde seconder antibody ile dilüe edildip, 60 dk oda sıcaklığında inkübe edildi,
- 13- PBS'te 3x5 dk yıkama yapıldı,
- 14- DAP ile muamele edildi.
- 15- PBS1X ile 3x5 dk yıkama yapıldı,
- 16- Distile suda 1 dk yıkandı,
- 17- Hematoksilen solüsyonuna iki sefer daldırıp çıkartıldı,
- 18- Distile su ile yıkama yapıldı,
- 19- %45-%50-%60-%70-%80-%90-%96 ve mutlak alkol serilerinden geçirildi,
- 20- Aqueous-Mount Solüsyon'u ile preparatlarımız kapatıldı. Kurutulduktan sonra incelenmeye hazır hale getirildi.

3.9. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

3.9.1. Triton X-100 Hazırlanması

Triton X-100 stoğundan, % 0,25'lik Triton X-100 hazırlamak için;

100 ml PBS1X → 0,25 ml Triton X-100 ekleyip karıştırıyoruz.

0,25 ml triton X-100 den çekip falkon tüpümüze koyuyoruz. Üzerine 1X'lik Phosphate Buffered Saline (PBS)'imizden 100 ml ilave ediyoruz ve falkon tüpümüzün ağzını kapatıp vortekste iyice karıştırarak homojenize yapıyoruz.

3.9.2. PBS Hazırlanması:

PBS ile yıkama (5dk oda sıcaklığında PBS1X ile yıkama)

Tris Buffered Saline (TBS 20X'lik) den 50 ml alıp, bunun üzerine 950 ml distile su koyuyoruz. Böylece elimizde 1000 ml (1lt) 1X'lik PBS hazırlamış oluyoruz.

3.9.3. BSA (Bovine serum albumin) Hazırlanması

BSA ile Bloklama (15dk oda sıcaklığında %1 lik BSA ile bloklama)

BSA (Bovine serum albumin) %1 lik hazırlamak için. 100 ml PBS1X → 1 gr BSA gerekiyor. O halde 10 ml %1'lik BSA hazırlamak için; 10 ml PBS1X → 0,1 gr BSA hassas terazide toz halde olan BSA dan 0,1 gr tartacağız. Hassas terazide tartmış olduğumuz 0,1gr BSA'mızın üzerine 10 ml PBS1X ekliyoruz ve vortekste karıştırdıktan sonra elimizdeki bu çözelti %1 lik BSA dır.

3.9.4. %10 Formalinin Hazırlanması:

Pratikte stok, (~%40) formaldehit %100'lük gibi kabul edilerek hazırlanır [79]. 4 ml formaldehit üzerine 96 ml su eklenip %4'lük formalin elde edilir. Hazırlanan %4 formalin, gerçekte % 1,6 lık bir solüsyondur.

3.10. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Preparatlar %4 formalin ile 5 dk. fiksasyona tabi tutulduktan sonra distile suda 1-2 dk. bekletilerek yıkama işlemi yapıldı. Akabinde preparatlara yayma yapılan alanın çevresi Pappen Kalemi ile çizildi ve ardından %0,25 lik Triton X-100 ile 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Oda sıcaklığında 5 dk. PBS1X ile yıkama yapıldı ve preparatlarımıza oda sıcaklığında 15 dk. %1 lik BSA ile bloklama işlemi uygulandı. Ardından 15dk. BSA' da bekleyen lamaların üzerlerindeki sıvılar atıldı, PBS1X ile bir kez 5 dk. yıkama yapıldı ve lamaları eğerek üzerindeki bütün sıvılar uzaklaştırıldı.

3.10.1. Antikorun Hazırlanışı

Normal Antibody Diüalent'den 200µl çekildi ve eppendorf tüpünün içine konuldu. 200 µl antibody diüalent çekilip hazırlanan eppendorf tüpünün içine eklendi. JAB1 Rabbit Polyclonal Antikor'undan (Abcam ab12184) 4 µl çekildi ve bu 200 µl antibody diüalent içeren eppendorf tüpünün üzerine eklendi ve birkaç sefer pipetaj yapıldı. Ağzı kapatılıp parafilmelendi. Sonra vortekste hazırlanan antikor iyice homojenize oluncaya kadar karıştırıldı.

3.10.2. Antikorla Muamele Aşaması

Hazırlanan antikor pipetaj yapıp lamların üzerlerine konuldu. Preparatları nemli bir ortamda, oda sıcaklığında 60 dk bekletildi. Gece boyu antibodyde kalan preparatların üzerindeki antikorlar atıldı ve üzerleri PBS 1X ile 3 kere 5'er dk. yıkandı. Preparatların üzerlerine sekonder antibody (antikor) ler damlatıldı. Sensi Tek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody (Biyotinlenmiş Anti-Rabbit) den üzerine damlatıldı ve oda sıcaklığında, nemli bir ortamda 30 dk. bekletildi. Üzerindeki sekonder antibodyleri uzaklaştırdıktan sonra üzerlerine PBS1X damlatıp 3 kere 5'er dk. yıkama yapıldı. Sekonder antibody (Sensi Tek HRP) (Avidin HRP'li anti-rabit.)'yi üzerine damlatıp nemli bir ortamda 20 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar üzerlerindeki sekonder antikorları döküp; üzerlerini PBS1X ile 3 kere 5'er dk. yıkama işlemine tabi tutuldu. Aynı zamanda 3, 3'-Diaminobenzidine (DAB) hazırlandı.

3.10.3. DAB'ın Hazırlanışı

Derin dondurucudan aldığımız Sigma UREA H 202 ile Sigma Fast DAB kullanıldı. Bunları eppendorf tüplerinin içinde 2 ml (mililitre) distile su içinde çözüldü. Eppendorf tüpümüzün ağzını kapattıktan sonra eriyene kadar vortekslendi.

1. Hazırlanan bu karışım (DAB) ilgili lamlara damlatıldı.
2. Yeterli bir süre beklendikten sonra PBS1X ile 3 kere 5'er dk. yıkama yapıldı ve üzerlerindeki PBS1X'ler uzaklaştırıldı.
3. 1 dk. distile suda yıkama yapıldı.

4. Hematoksilene bir iki sefer batırılıp çıkarıldı. (Background görüntüsü oluşturmak istiyorsak hematoksilen ile bunu sağlayabiliriz).
5. Distile su ile yıkama yapıldı.
6. Sırasıyla %45-%50-%60-%70-%80-%90-%96 ve mutlak alkol serilerinden geçirildi.
7. Ksilen (xylene) 1-2-3 serilerinden geçirildi.
8. Kapatma aşamasına gelinerek Aqueous-Mount Solüsyon'u ile preparatlarımız kapatıldı.
9. Preparatlarımız kurumaları için oda sıcaklığında bekletildi ve kuruyan preparatlar incelenmek için hazır hale getirilmiş oldu. Hemen inceleme yapılmayacak ise veya inceleme yapıldıktan sonra ışık geçirmeyen kapalı bir lam saklama kabında buzdolabında saklanır.

3.11. Kruger Strict Kriterleri'ne Göre Diff-Quick Boyama Tekniği

1. 4µl likefiye olmuş, taze semen örneği lam üzerine damlatılarak yayma yapıldı.
2. Preparat 3-5 dakika dış ortamda kurutuldu.
3. Preparatlar 5 dakika şale içerisinde bulunan fiksatif (tesbit) solüstonu içerisinde bekletildi (Diff-Quick Fix: Fixative Solution Contains Fast Green (0.002 g/l) in Methanol).
4. Kurutularak Diff-Quick boyası ile boyandı.

3.12. Diff-Quick Boyama Yöntemi

1. I nolu boya içinde 1 dakika bekletildi. [I nolu boya: fosfat tamponu içerisinde Eozin Y (1,22 g/l)-pH 6.6 ve koruyucu madde olarak sodyum azid içerir. Diff-Quick I: Stain Solution I Contains Eosin Y (1.22 g/l) in phosphate buffer (pH 6.6) and 0.1% (w/v) sodium azide as preservative] ve Distile su ile yıkandı.

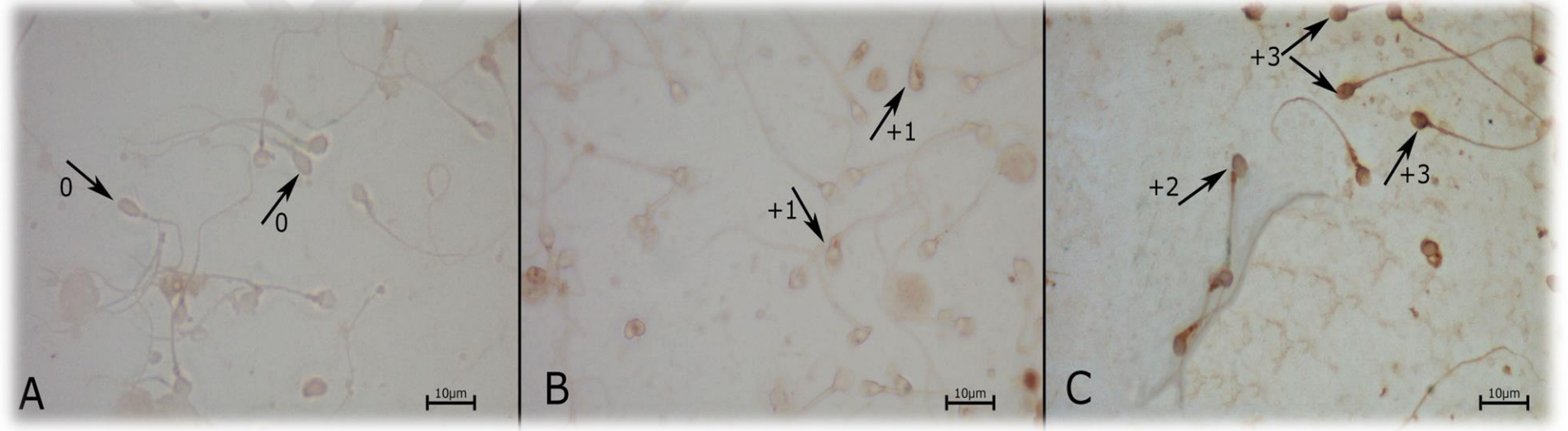
2. II nolu boya içinde 1 dakika bekletildi. [II nolu boya: fosfat tamponu içerisinde tiazin boyası (1,1 g/l) pH 6,6 içerir (Diff-Quick II: Stain Solution II Contains Thiazine Dye (1.1 g/l) in phosphate buffer (pH 6.6)].

3. Musluk suyu ile yıkandı ve Preparatlar kurutuldu.

4. Üzerine immersiyon yağı damlatılarak (X100) mikroskopta incelendi.

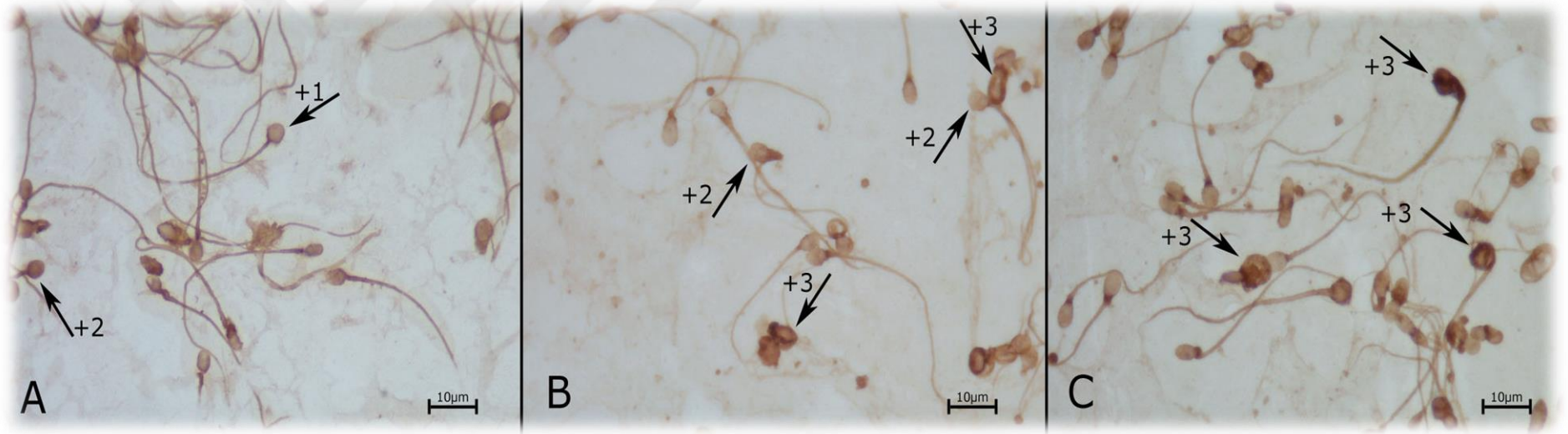
3.13. İstatistiksel Analiz

Sperm hücrelerinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan bölgelerin fertil ve infertil bireyler arasındaki karşılaştırılmasında “ki-kare testi” kullanıldı. Fertil ve infertil bireyler arasında sperm hücrelerine ait morfolojik ölçüm değerlerinin karşılaştırılması “student t-testi” ile yapıldı. Ölçüm değerleri açısından fertil ve infertil bireylerin kendi içindeki karşılaştırılmalarında ise “One-way ANOVA” istatistik yöntemi tercih edildi. Jab1 immunoreaktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan boyanma şiddetine (darkness faktörü) ilişkin grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalar sırasıyla “student t-testi” ve “One-way ANOVA” testi ile yapıldı. İstatistik testlerinin uygulanmasında SPSS V21.0 programı kullanıldı ve tüm karşılaştırmalarda $p < 0.05$ anlamlı bir farklılık olarak kabul edildi.



Şekil 18:Fertil bir bireyin sperminde JAB1 proteinin varlığının/yokluğunun veya varolma şiddetinin immünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenmesinin gösterilmesi

Fertil bir bireyin sperminde JAB1 proteinin varlığının/yokluğunun veya varolma şiddetinin immünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenmesi ve bunun 0., 1. ve 4.saatler sonundaki kapasitasyonundaki JAB1 proteinin varlığının ve boyanma şiddetinin darkness faktörü ile gösterilmesi. **A:** 0.saat (hiç kapasite edilmeyen); **B:**1 saat boyunca 37°C de, human tubal fluid solüsyonu içerisinde kapasite edilen sperm numunesi; **C:**4 saat boyunca 37°C de, human tubal fluid solüsyonu içerisinde kapasite edilen sperm numunesi. **0 numaralı ok:** JAB1 proteini ile boyanmayan sperm hücreleri. **+1 numaralı ok:** Darkness boyanma faktörüne göre +1 şiddetinde JAB1 proteini ile boyanan sperm hücresi. **+2 numaralı ok:** Darkness boyanma faktörüne göre +2 şiddetinde JAB1 proteini ile boyanan sperm hücresi. **+3 numaralı ok:** Darkness boyanma faktörüne göre +3 şiddetinde JAB1 proteini ile boyanan sperm hücresi.

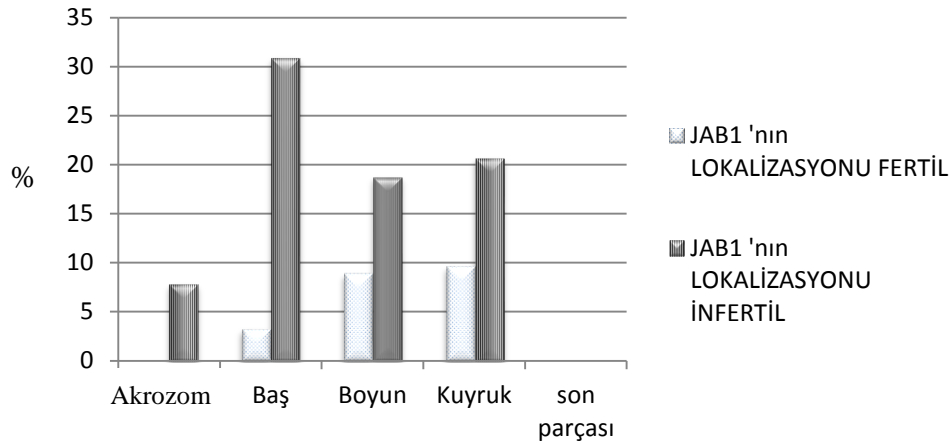


Şekil 19: İnfertil bir bireyin sperminde JAB1 proteinin varlığının/yokluğunun veya varolma şiddetinin immünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenmesinin gösterilmesi

İnfertil bir bireyin sperminde JAB1 proteinin varlığının/yokluğunun veya varolma şiddetinin immünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenmesi ve bunun 0., 1. ve 4.saatler sonundaki kapasitasyonundaki JAB1 proteinin varlığının ve boyanma şiddetinin darkness faktörü ile gösterilmesi. **A:** 0.saat (hiç kapasite edilmeyen); **B:** 1 saat boyunca 37°C de, human tubal fluid solüsyonu içerisinde kapasite edilen sperm numunesi; **C:**4 saat boyunca 37°C de, human tubal fluid solüsyonu içerisinde kapasite edilen sperm numunesi. **0 numaralı ok:** JAB1 proteini ile boyanmayan sperm hücreleri. **+1 numaralı ok:** Darkness boyanma faktörüne göre +1 şiddetinde JAB1 proteini ile boyanan sperm hücresi. **+2 numaralı ok:** Darkness boyanma faktörüne göre +2 şiddetinde JAB1 proteini ile boyanan sperm hücresi. **+3 numaralı ok:** Darkness boyanma faktörüne göre +3 şiddetinde JAB1 proteini ile boyanan sperm hücresi.

Aynı zamanda hiç boyanmayan fertil bireylerin sperm hücrelerinin sayısı hiç boyanmayan infertil bireylerin sperm hücrelerinin sayısından daha fazla olduğu görüldü (Tablo 2). Bunun yanı sıra boyanan sperm hücrelerinin boyanan bölgelerinin yüzdelik dağılımı Tablo 2’de görülmektedir. Fertil bireylerin % 21,8’i boyanırken infertil bireylerin % 78,2 boyanmaktaydı (Tablo 2). Fertil ve infertil bireylerin boyanan bölgelerinin boyanma yüzdelerini karşılaştırdığımızda fertil bireylerin sperm hücrelerinin akrozom bölgelerinde boyanma yüzde sıfır (% 0) iken infertil bireylerin sperm hücrelerinin bir kısmının ya akrozom bölgeleri olmadığı için ya da gerçekten akrozom bölgeleri boyandığından olsa gerek o bölgelerde % 7,9 oranında bir boyanma gözlemlendi (Tablo 2). Baş bölgelerinin boyanma oranları ise fertil bireylerde % 3,3 iken infertil bireylerin sperm hücrelerinde baş bölgesinin boyanma yüzdesi % 30,9’dı (Tablo 2). Aynı şekilde sperm boyun^{1*} ve kuyruk bölgelerini de karşılaştırdık. Fertil bireylerin sperm hücrelerinin boyun bölgelerinin boyanma yüzdesi % 8,9, kuyruk bölgesinin boyanma yüzdesi % 9,6 iken; infertil bireylerin boyun bölgesinin boyanma yüzdesi % 18,8, kuyruk bölgesinin boyanma yüzdesi ise 20,7 olarak bulundu (Tablo 2). Fertil bireye ait sperm hücrelerinin kendi içinde boyanan bölgelerinin boyanma oranlarının yüzdelik ifade ile dağılımı grafik 1, 2, 3’de görülmektedir.

¹ *Boyun ve mid-piece bölgelerini bir/ortak kabul ederek değerlendirdik. Çünkü ışık mikroskobu seviyesinde tam ayrımını yapamıyacağımızı düşündüğümüz için her iki bölgeyi bir kabul edip öyle değerlendirdik.



Grafik 1: Fertil ve İnfertil bireylerin sperm hücrelerinin JAB1 antikoru ile pozitif ve negatif boyanan bölgelerinin boyanma oranlarının yüzdelik değerlerinin grafiksel gösterilmesi.



Grafik 2 ve 3: Fertil ve İnfertil bireylerin sperm hücrelerinin JAB1 antikoru ile pozitif/negatif boyanan bölgelerinin boyanma oranlarının yüzdelik diliminin gösterilmesi.

Boyanan fertil bireyin sperm hücrelerini, kendi içinde boyanan bölgelerinin boyanma oranlarını yüzdelik bir dağılımla inceleyecek olursak akrozom bölgelerinde boyanma hiç yoktu (Şekil 18-A, 18-B, 18-C). En fazla kuyruk bölgesi sonra boyun bölgesi ve en az oranda da baş bölgesinin boyandığını gözlemledik (Tablo 2). Kuyruğun son parçasını ise ışık mikroskobu seviyesinde net bir şekilde ayırt edemediğimiz için o bölgeyi değerlendiremedik. Aynı şekilde Tablo 2’de infertil bireye ait sperm hücrelerinin

kendi içinde boyanan bölgelerinin boyanma oranlarının yüzdelerle ifade ile dağılımı görülmektedir.

İnfertil bireylerin sperm hücrelerini kendi içinde boyanan bölgelerinin boyanma oranlarını yüzdelerle bir dağılımla inceleyecek olursak en az boyanma akrozom bölgesinde, en fazla boyanan bölge ise baş bölgesi olduğu görülmektedir (Şekil 19-A, 19-B, 19-C). Geriye kalan boyun ve kuyruk bölgelerinin boyanma oranları ise; kuyruk bölgesi boyun bölgesine oranla çok az bir fazlalığı olduğu görülmekte (Tablo 2). Kuyruğun son parçasını ise ışık mikroskobu seviyesinde net bir şekilde ayırt edemediğimiz için o bölgeyi değerlendiremedik.

Fertil bireylerin +3, +2 ve +1 şiddetlerinde JAB1 antikoru ile boyanan sperm hücreleriyle, 0 şiddetinde (JAB1 antikoru ile boyanmayan) sperm hücrelerinin morfolojik ölçümlerinin karşılaştırmaları incelendi. Buna göre +3 şiddetinde boyanan fertil bir bireye ait sperm hücresinin baş bölgesinin alanı $17,07 \mu\text{m}^2$ bulundu. +2 şiddetinde boyanan sperm hücresinin baş bölgesinin alanı $13,86 \mu\text{m}^2$, +1 şiddetinde boyanan sperm hücresinin baş bölgesinin alanı $11,88 \mu\text{m}^2$ olarak bulundu. Hiç boyanmayan fertil bireyin baş bölgesinin alanı ise $11,02 \mu\text{m}^2$ olduğu bulundu (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan sperm hücresinin baş bölgesinin alanı ile hiç boyanmayan sperm hücresinin baş bölgesinin alanı arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda fark olduğu görüldü ($p \leq 0,001$). Aynı şekilde fertil bireyin +3 şiddetinde boyanan sperm hücresinin ekvatorial bölgesinin değeri $4,66 \mu\text{m}$ iken +2 şiddetinde boyanan sperm hücresinin ekvatorial bölgesinin ölçümü $4,20 \mu\text{m}$, +1 şiddetinde boyananın $3,89 \mu\text{m}$ iken hiç boyanmayan sperm hücresinin ekvatorial bölgesinin değeri $3,74 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan fertil bireylere ait sperm hücresinin ekvatorial bölgesinin ölçüm

değeriyle hiç boyanmayan fertil bireye ait sperm hücresinin ekvatorial bölgesinin ölüm değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda fark görülmektedir ($p \leq 0,001$).



Tablo 3: Fertil ve İnfertil bireylerin JAB1 antikoru ile pozitif boyanan ve boyanmayan sperm hücrelerin boyanma derecelerine göre sperm hücresinin bölgelerinin ortalama morfolojik ölçümleri ve hesaplamaları.

		Boyanma şiddeti	Area [μm^2]	Eqdia [μm]	Max feret [μm]	Min feret [μm]	Perimeter [μm]	Tail Length [μm]	Shape factor [μm]	Tail Length/Max feret [μm]	N
JAB1 pozitif boyanan hücrelerin morfolojik değerlendirilmesi	FERTİL	+3	17,07	4,66	6,93	3,23	16,32	52,97	0,79	7,64	73,00
		+2	13,86	4,20	4,94	3,70	13,46	53,38	0,89	10,81	107,00
		+1	11,88	3,89	4,65	3,32	12,53	50,65	0,88	10,89	200,00
		0	11,02	3,74	5,20	3,41	12,21	53,04	0,85	10,20	200,00
	İNFERTİL	+3	17,77	4,76	6,36	3,61	15,85	47,68	0,82	7,50	200,00
		+2	17,49	4,72	5,69	3,99	15,30	50,42	0,88	8,86	200,00
		+1	16,82	4,63	5,03	4,37	14,69	49,12	0,95	9,77	169,00
		0	12,19	3,94	5,51	2,85	13,46	50,63	0,81	9,19	122,00

Fertil ve infertil bireylerin JAB1 antikoru ile pozitif ve negatif boyanan sperm hücrelerin boyanma derecelerine göre sperm hücresinin bölgelerinin ortalama morfolojik ölçümleri ve hesaplamaları görülmektedir. Area: Spermin baş bölgesinin alanı, Eqdia: Sperm başının ekvatorial uzunluğu, Max feret: Sperm başının boyuna uzunluğu, Min feret: Sperm başının enine uzunluğu, Perimeter: Sperm başının çevresi, Tail length: Kuyruk uzunluğu, Shape factor: baş bölgesinin şekil yönünden uygunluğunun hesaplanması ile belirlenen değer, Tail length/Max feret: kuyruk uzunluğunun baş bölgesinin uzunluğuna oranı. N: Sayılan sperm sayısı.

Benzer şekilde fertil bireyin sperm hücrelerinin max feret [μm] ve min feret [μm] ölçümleri +3 şiddetinde boyananlarda sırasıyla 6,93 μm 'ye 3,23 μm iken +2 şiddetinde boyananlarda 4,94 μm ve 3,70 μm olarak ölçüldü. +1 şiddetinde boyananlarda ise 4,65'e 3,32 olarak ölçüldü. Hiç boyanma olmayan fertil bireyin max feret [μm] ve min feret [μm] değerleri sırasıyla 5,20'ye 3,41 olduğu görülmekte (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan fertil bireye ait sperm hücrelerinin hiç boyanmayan fertil bireye ait sperm hücrelerinin max feretleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunurken ($p \leq 0,001$); min feretleri arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık söz konusu değildi. Fertil bireyde sperm hücrelerinin çevresinin ölçümlerini değerlendirecek olursak; +3 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin baş bölgesinin çevresi 16,32 μm , +2 şiddetinde boyananın 13,46 μm ölçüldü. +1 şiddetinde boyanın 12,53 μm iken hiç boyanmayan fertil bireylerin sperm hücrelerinin baş bölgesinin çevresel uzunluğu ortalama 12,21 μm olarak ölçüldü (Tablo 3). Burada +3 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin baş bölgesinin çevresinin uzunluğu; hiç boyanmayan fertil bireyin sperm hücrelerinin baş bölgesinin çevresinin uzunluğu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p \leq 0,001$). Kuyruk uzunlukları bakımından da değerlendirecek olursak; +3 şiddetinde boyanmış fertil bireylerin kuyruk uzunluğu 52,97 μm , +2 şiddetinde boyanın 53,38 μm , +1 şiddetinde boyanın ki 50,65 μm iken hiç boyanmayan fertil bireylerin sperm hücrelerinin kuyruk bölgesinin uzunluğu 53,04 μm olarak ölçüldü (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan fertil bireylerin sperm hücrelerinin kuyruk bölgesinin uzunluğu, hiç boyanmayan fertil bireylerin sperm hücrelerinin kuyruk uzunluğu arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmedi ($p \geq 0,05$). Bununla beraber +3 şiddetinde boyanan fertil bireyin shape factor (Partiküllerin büyüklüklerinden bağımsız olarak partiküllerin şekillerini sayısal olarak tanımlayabilmek için mikroskopi ve görüntüleme analizinde kullanılan boyutsal

niceliklere shape factor denir) [80, 81, 82, 83], değeri 0,79 iken +2 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin shape factor değeri 0,89, +1 şiddetinde boyananlarda 0,88 ve hiç boyanmayan fertil bireylerin shape factor değeri 0,85 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Fakat bunların da +3 şiddetindeki shape factor değeriyle hiç boyanmayan fertil bireylerin shape factor değeri arasında istatistiksel olarak anlamlılık görülmemektedir. Gene fertil bireylerin sperm hücrelerinin boyanma şiddetleri ile kuyruk uzunluğu (Tail Length)/Max feret [μm] oranı arasındaki ilişkiye bakılacak olursa; +3 şiddetinde boyanan fertil bireylere ait sperm hücrelerinin oranı 7,64 iken, +2 şiddetinde boyanan fertil bireylere ait sperm hücrelerinin oranı 10,81 olarak bulundu. +1 şiddetinde boyanan fertil bireylere ait sperm hücrelerinin Tail Length/Max feret [μm] oranı 10,89 bulunurken, hiç boyanmayan fertil bireylerin sperm hücrelerinin Tail Length/Max feret [μm] oranı ise 10,20 olarak bulundu (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan fertil bireylere ait sperm hücrelerinin Tail Length/Max feret [μm] oranıyla hiç boyanmayan fertil bireylere ait sperm hücrelerinin Tail Length/Max feret [μm] oranı arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p \leq 0,001$).

İnfertil bireylerin +3, +2 ve +1 şiddetlerinde JAB1 antikoru ile boyanan sperm hücreleriyle, 0 şiddetinde (JAB1 antikoru ile boyanmayan) sperm hücrelerinin morfolojik ölçümlerinin karşılaştırmaları incelendi. +3 şiddetinde boyanan infertil bir bireye ait sperm hücrelerinin baş bölgesinin alanı $17,77 \mu\text{m}^2$ bulundu. +2 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin baş bölgesinin alanı $17,49 \mu\text{m}^2$, +1 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin baş bölgesinin alanı $16,82 \mu\text{m}^2$ bulundu. Hiç boyanmayan infertil bireyin baş bölgesinin alanı ise $12,19 \mu\text{m}^2$ olduğu bulundu (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin baş bölgesinin alanı ile hiç boyanmayan sperm hücrelerinin baş bölgesinin alanı arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda fark olduğu görüldü ($p \leq 0,001$). Aynı şekilde infertil bireyin +3 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin ekvatorial bölgesinin değeri $4,76 \mu\text{m}$ iken

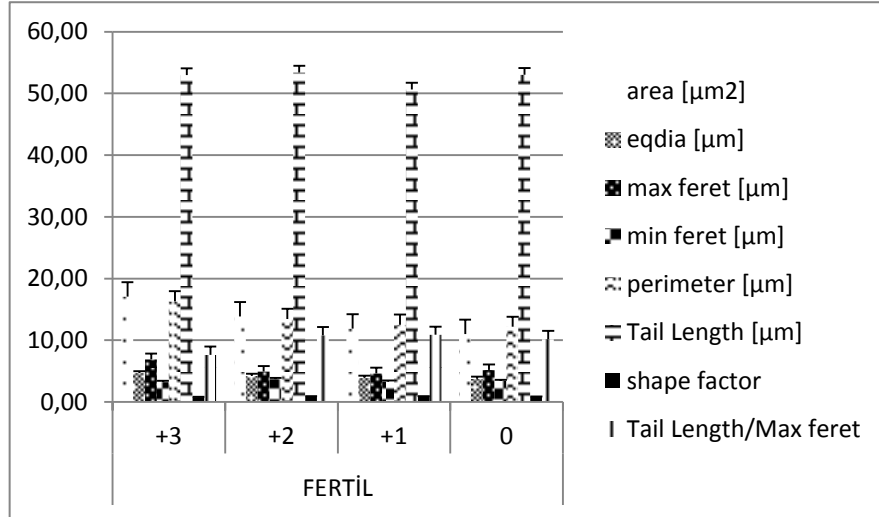
+2 şiddetinde boyanan sperm hücrenin ekvatorial bölgesinin ölçümü 4,72 μm , +1 şiddetinde boyananın 4,63 μm iken hiç boyanmayan sperm hücrenin ekvatorial bölgesinin değeri 3,94 μm olarak ölçüldü (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan infertil bireylere ait sperm hücrenin ekvatorial bölgesinin ölçüm değeriyle hiç boyanmayan infertil bireye ait sperm hücrenin ekvatorial bölgesinin ölçüm değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda fark görülmektedir ($p \leq 0,005$). Gene infertil bireyin sperm hücrenin max feret [μm] ve min feret [μm] ölçümleri +3 şiddetinde boyananda sırasıyla 6,36 μm 'ye 3,61 μm iken +2 şiddetinde boyananda 5,69 μm 'ye 3,99 μm , +1 şiddetinde boyananda ise 5,03'e 4,37 ölçüldü. Hiç boyanma olmayan infertil bireyin max feret [μm] ve min feret [μm] değerleri sırasıyla 5,51'e 2,85 olduğu görülmekte (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan infertil bireye ait sperm hücrelerinin hiç boyanmayan infertil bireye ait sperm hücrenin max feretleri ve min feretleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p \leq 0,001$). İnfertil bireyde sperm hücrenin çevresinin ölçümlerini değerlendirecek olursak +3 şiddetinde boyanan sperm hücrenin baş bölgesinin çevresi 15,85 μm , +2 şiddetinde boyananın 15,30 μm , +1 şiddetinde boyanın 14,69 μm iken hiç boyanmayan infertil bireyin sperm hücrenin baş bölgesinin çevresel uzunluğu 13,46 μm olarak ölçüldü (Tablo 3). Burada +3 şiddetinde boyanan sperm hücrenin baş bölgesinin çevresinin uzunluğu; hiç boyanmayan infertil bireyin sperm hücrenin baş bölgesinin çevresinin uzunluğu arasında ki fark istatistiksel olarak anlamlı oranda farklı bulundu ($p \leq 0,001$). Kuyruk uzunlukları bakımından da değerlendirecek olursak +3 şiddetinde boyanmış infertil bireylerin kuyruk uzunluğu 47,68 μm , +2 şiddetinde boyanın 50,42 μm , +1 şiddetinde boyanın ki 49,12 μm iken hiç boyanmayan infertil bireyin sperm hücrenin kuyruk bölgesinin uzunluğu 50,63 μm olarak ölçüldü (Tablo 3). +3 şiddetinde boyanan infertil bireyin sperm hücrenin kuyruk bölgesinin

uzunluğu, hiç boyanmayan infertil bireyin sperm hücresinin kuyruk uzunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p \leq 0,001$). Bununla beraber +3 şiddetinde boyanan infertil bireyin shape factor değeri 0,82 iken, +2 şiddetinde boyanan sperm hücresinin shape factor değeri 0,88, +1 şiddetinde boyanan da 0,95 ve hiç boyanmayan infertil bireyin shape factor değeri 0,81 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). Fakat bunların da +3 şiddetindeki shape factor değeriyle hiç boyanmayan infertil bireyin shape factor değeri arasında istatistiksel olarak anlamlılık görülmemektedir. Gene infertil bireylerin sperm hücrelerinin boyanma şiddetleri ile Tail Length/Max feret [μm] arasındaki ilişkiye bakıldı. +3 şiddetinde boyanan infertil bireylere ait sperm hücresinin Tail Length/Max feret [μm] oranı 7,50 iken +2 şiddetinde boyanan infertil bireye ait sperm hücresinin Tail Length/Max feret [μm] oranı 8,86, +1 şiddetinde boyanan infertil bireylere ait sperm hücresinin Tail Length/Max feret [μm] oranı 9,77; hiç boyanmayan infertil bireylerin sperm hücrelerinin Tail Length/Max feret [μm] oranı ise 9,19 olarak bulundu (Tablo 3). Burada da +3 şiddetinde boyanan infertil bireye ait sperm hücresinin Tail Length/Max feret [μm] oranı hiç boyanmayan infertil bireye ait sperm hücresinin Tail Length/Max feret [μm] oranı arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p \leq 0,001$).

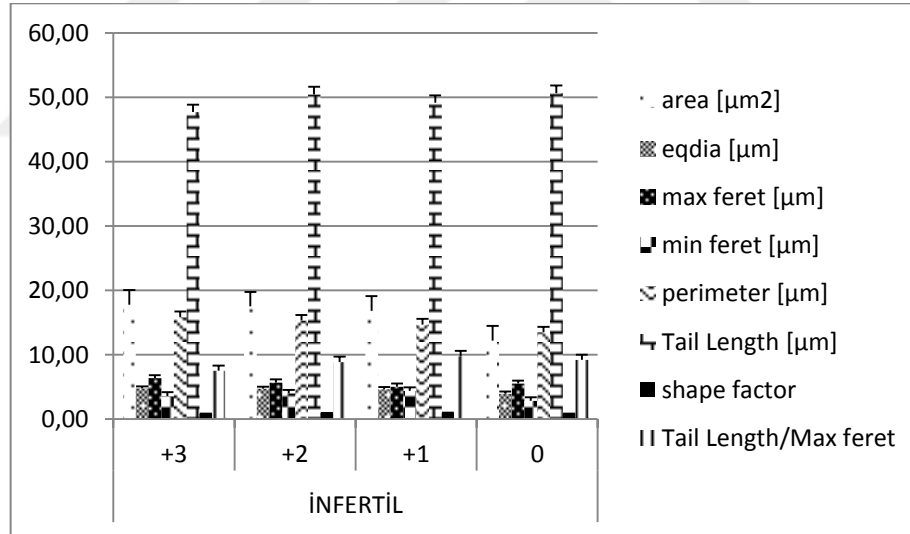
Fertil ve infertil bireylerin sperm hücrelerinin JAB1 antikoruna ile boyanma şiddetlerinin morfolojileri ile ilişkisini değerlendirildi. +3 şiddetinde boyanan fertil ile +3 şiddetinde boyanan infertil bireylerin baş bölgelerinin alanları istatistiksel olarak anlamlı değilken +2 ve +1 şiddetinde boyanan fertil bireylerle +2 ve +1 şiddetinde boyanan sperm hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p \leq 0,001$). Fakat hiç boyanmayan fertil bireylerin sperm hücrelerinin baş bölgelerinin alanı ile boyanmayan infertil bireylerin baş bölgelerinin alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p \geq 0,05$). Fertil ve infertil bireylerin ekvatorial bölgelerinin JAB1 ile +3, +2, +1 ile pozitif

boyanan ve hiç boyanmayan sperm hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p \geq 0,05$). Fertil ve infertil bireylerin sperm hücrelerinin +3, +2, +1 ve 0 şiddetinde pozitif / negatif boyanma şiddetlerinin max feret [μm] leri ile min feret [μm] leri arasındaki ilişkiye bakacak olursak +3 şiddetinde boyanan fertil bireyin sperm hücrelerinin max fereti ile +3 şiddetinde boyanan infertil bireyin max fereti arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken +2, +1 ve 0 şiddetinde boyanan/boyanmayan fertil bireylerin max feretleri ile; +2, +1 ve 0 şiddetinde boyanan/boyanmayan infertil bireylerin max feretleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. Fertil bireyin +3 ve +2 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin min feretleri ile infertil bireyin +3 ve +2 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin min feretleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken, +1 şiddetinde pozitif boyanan ve boyanmayan fertil bireylerin sperm hücrelerinin min feretleri ile, +1 şiddetinde pozitif boyanan ve boyanmayan infertil bireylerin sperm hücrelerinin min feretleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. Fertil bireylerin +3 şiddetinde JAB1 ile pozitif boyanan sperm hücrelerinin çevre uzunlukları (perimeter) ile infertil bireylerin +3 şiddetinde JAB1 ile pozitif boyanan sperm hücrelerinin perimeterleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık görüldü ($p \leq 0,001$). Aynı şekilde +2 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanmış fertil bireyin sperm hücrelerinin perimeteri ile, +2, şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanmış infertil bireylerin sperm hücrelerinin perimeterleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu görüldü ($p \leq 0,001$). +1 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan fertil bireye ait sperm hücrelerinin perimeteri ile +1 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan infertil bireye ait sperm hücrelerinin perimeteri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p \leq 0,001$). Hiç boyanmayan fertil bireyin sperm hücrelerinin perimeteri ile boyanmayan infertil bireye ait sperm

hücrenin perimetri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p \leq 0,001$). +3, +2, ve +1 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan ve JAB1 antikoru ile boyanmayan fertil bireye ait sperm hücrenin kuyruk uzunluğu ile, +3, +2 ve +1 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan ve JAB1 antikoru ile boyanmayan infertil bireye ait sperm hücrenin kuyruk uzunlukları arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark görülmedi ($p \geq 0,05$). +3, +2 ve +1 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan ve JAB1 antikoru ile boyanmayan fertil bireye ait sperm hücrenin shape factor değeri ile +3, +2 ve +1 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan ve JAB1 antikoru ile boyanmayan infertil bireye ait sperm hücrenin shape factor değeri arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark görülmedi ($p \geq 0,05$). +3 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan fertil bireye ait sperm hücrenin Tail Length/Max feret [μm] oranı, +3 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif boyanan infertil bireye ait sperm hücrenin Tail Length/Max feret [μm] oranı arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark görülmedi ($p \geq 0,05$). Fakat +2, +1 ve 0 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif / negatif boyanan fertil bireye ait sperm hücrelerinin Tail Length/Max feret [μm] oranı ile, +2, +1 ve 0 şiddetinde JAB1 antikoru ile pozitif / negatif boyanan infertil bireye ait sperm hücrelerinin Tail Length/Max feret [μm] oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p \leq 0,001$).



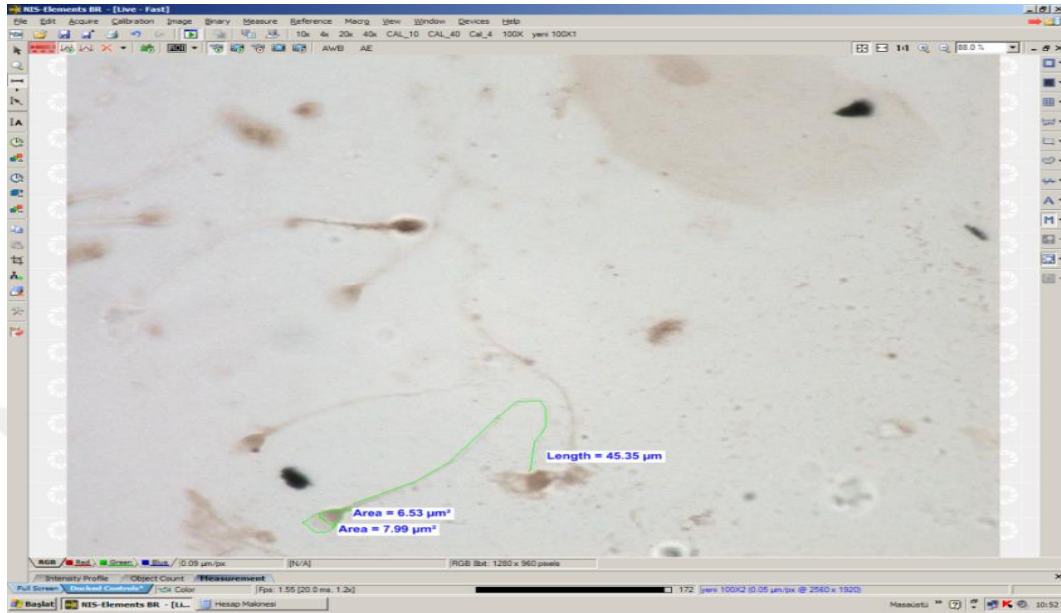
Grafik 4: Fertil bireylerin sperm hücrelerinin JAB1 antikoru ile pozitif/negatif boyanan bölgelerinin boyanma derecelerine göre ayrı ayrı ortalama morfolojik ölçümlerinin ve hesaplamalarının grafiksel görünümü.



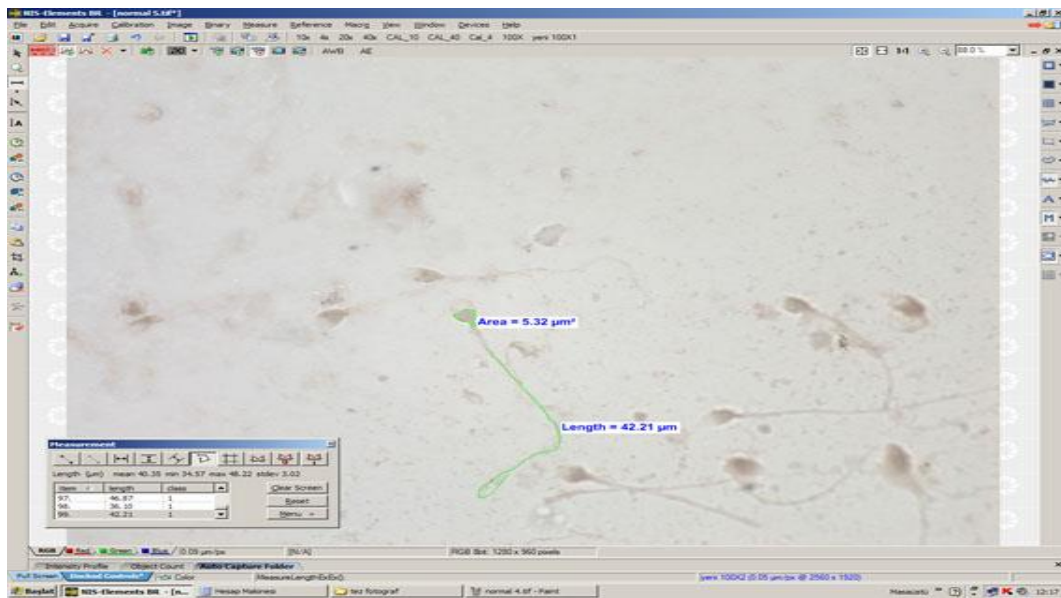
Grafik 5: İnfertil bireylerin sperm hücrelerinin JAB1 antikoru ile pozitif/negatif boyanan bölgelerinin boyanma derecelerine göre ayrı ayrı ortalama morfolojik ölçümlerinin ve hesaplamalarının grafiksel görünümü.

Area: Sperm baş bölgesinin alanı. Eqdia: Sperm başının ekvatorial uzunluğu. Max feret: Sperm başının boyuna uzunluğu. Min feret: Sperm başının enine uzunluğu. Perimeter: Sperm başının çevresi. Tail

length: Kuyruk uzunluğu. Shape factor: Baş bölgesinin şekil yönünden uygunluğunun hesaplanması ile belirlenen değer $\frac{\text{Tail length}}{\text{Max feret}}$: kuyruk uzunluğunun baş bölgesinin uzunluğuna oranı.



Şekil 20: Sperm hücrelerinin farklı bölgelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonunda ölçüm esnasındaki görüntüsü. Jab 1 antikoruna ile pozitif boyanma, X100 büyütme.



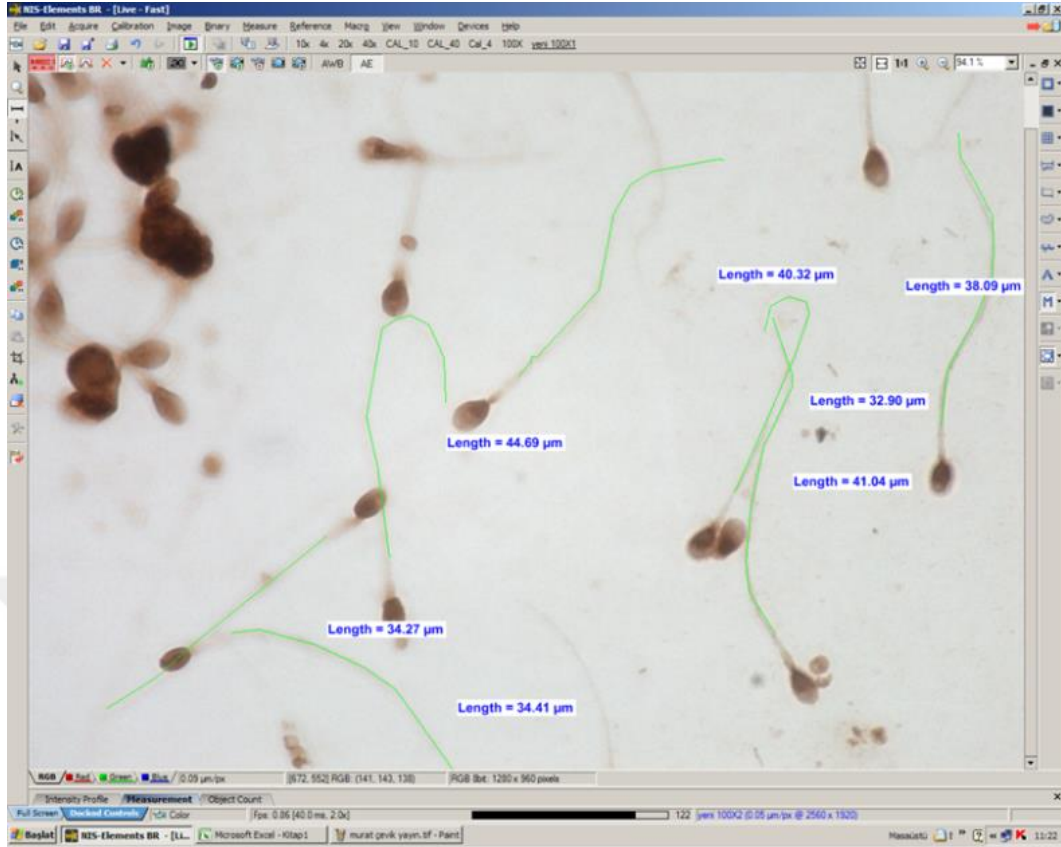
Şekil 21: Sperm hücrelerinin farklı bölgelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonunda ölçüm esnasındaki görüntüsü. Jab 1 antikoruna ile pozitif boyanma, X100 büyütme.



Şekil 22: Fertil bireye ait boyanmayan sperm hücrelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonunda ölçüm esnasındaki görüntüsü. Jab 1 antikoruna ile negatif boyanma, X100 büyütme.



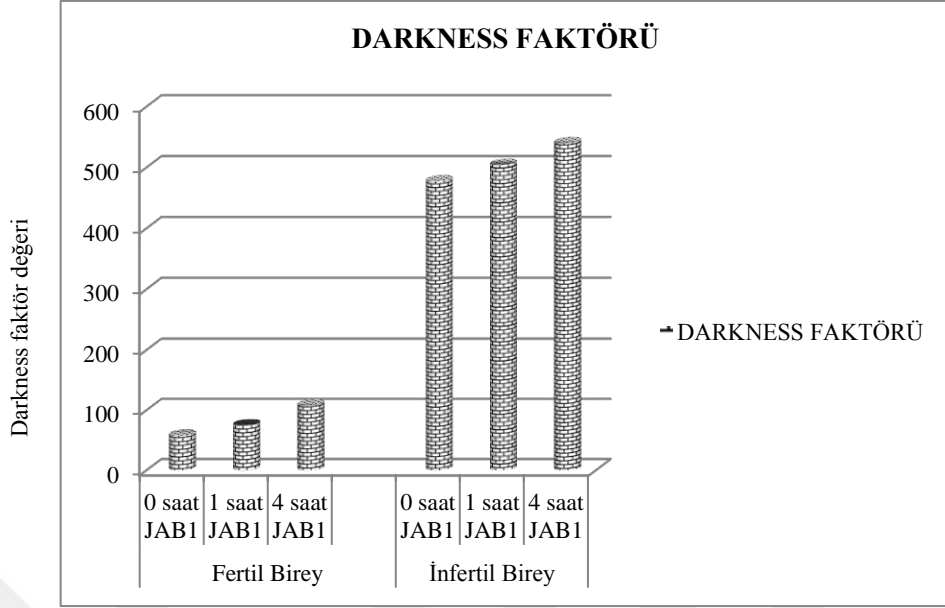
Şekil 23: Fertil bireye ait sperm hücrelerinin farklı bölgelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonunda ölçüm esnasındaki görüntüsü. Jab 1 antikoruna ile negatif boyanma, X100 büyütme.



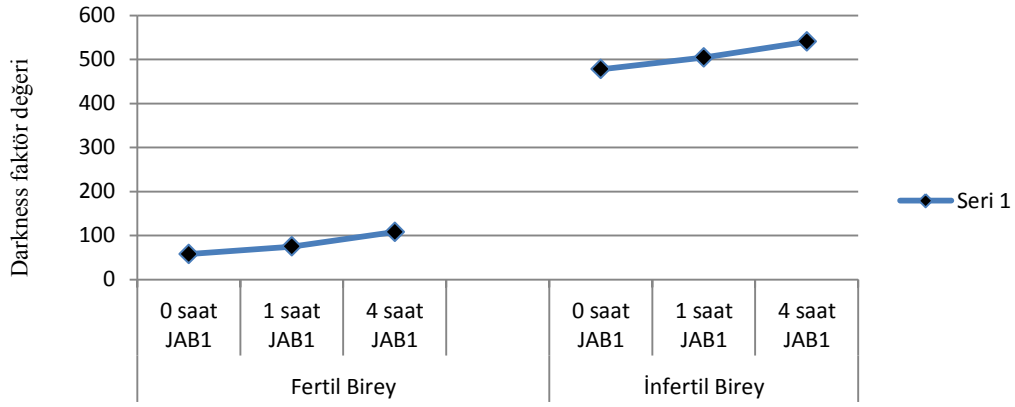
Şekil 24: İnfertil bireye ait sperm hücrelerinin, NIS Element yazılımlı iş istasyonu ile ölçümü ve sayımı. Jab 1 antikoru ile pozitif boyanma, X100 büyütme.

Tablo 4: Fertil ve İnfertil bireylerin 0, 1 ve 4 saatlik kapasitasyonu sonucundaki JAB1 antikoru ile pozitif boyanan sperm hücrelerinin, darkness faktörü ile hesaplanmasının sonucunda elde edilen değerlerin tablosu.

DARKNESS FAKTÖRÜ		
Fertil Birey	0 saat JAB1	57,75
	1 saat JAB1	74,9
	4 saat JAB1	108,05
İnfertil Birey	0 saat JAB1	477,7
	1 saat JAB1	504,4
	4 saat JAB1	540,3



Grafik 6: Fertil ve İnfertil bireylerin 0, 1 ve 4 saatlik kapasitasyonu sonucundaki JAB1 antikoruna pozitif boyanan sperm hücrelerinin, darkness faktörü ile hesaplanmasının sonucunda elde edilen değerlerin grafiksel gösterimi.



Grafik 7: Fertil ve İnfertil bireylerin 0, 1 ve 4 saatlik kapasitasyonu sonucundaki JAB1 antikoruna pozitif boyanan sperm hücrelerinin, darkness faktörü ile hesaplanmasının sonucunda elde edilen değerlerin çizgisel grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Byung-Chul Kim ve ark. 2004 yılında transforming growth faktör (TGF- β) sinyalinin bir inhibitörü olan SMAD7'nin ubiquinasyon ve degradasyonunun (bozulmasının) JAB1/CSN5 tarafından artırıldığını böylelikle dolaylı yoldan TGF- β sinyal yollarının JAB1/CSN5 tarafından amplifiye olduğunu (çoğaldığını) gösterdiler [84]. Önceki yıllarda yapılan çalışmalar, meme ve kolorektal karsinomlarda artmış tümör derecesi ve lenf nodu metastazı veya yaşamla bağdaşmayan vakalarda artmış p27 ekspresyonunun olduğunu göstermektedir [34, 35].

p27 ekspresyonu ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda diffüz büyük B hücreli lenfomaların bazı alt türlerinde artmış p27 salınımları görülmüştür [34, 35, 36]. p27'nin ekspresyonu artmış olabilir ama bu seferde p21, p53, p57'lerin ekspresyonları azalmış olabilir. Bunlarda hücre proliferasyonuna (kansereleşmesine) neden olmuş olabilir. Çünkü biz biliyoruz ki; bir hücrenin kansereleşmesi için hücre siklus kontrolünde fonksiyon gören siklin ve CDK'ların aktivitelerinin regülasyonundaki herhangi bir bozulma hücre proliferasyonuna sebep olmaktadır. Ubiquitin-proteozom sisteminde, deubikinasyonunda rol alan PGP 9,5'in over-ekspresyonu pek çok organ ve organ hastalıkları ile tümör gelişiminde rol almaktadır. Akciğer kanserlerinde PGP 9,5'in aşırı ekspresyonunun tümör evresi ile paralel artması akciğer kanser tümörogenesisinde PGP 9,5'in rol alabileceğini göstermektedir [22]. Caballero ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PGP 9,5'un, p27 degradasyonunda JAB1 proteini ile birlikte rol aldığı gösterilmiştir. PGP 9,5 en az üç protein ile interaksiyona girmektedir ki bunlardan birisi JAB1'dir. JAB1, p27'ye bağlanarak p27'nin nukleustan sitoplazmaya transportuna ve burada yıkımına yol açmaktadır. Hem in vivo hem in vitro PGP 9,5'un JAB1 ile

ilişkisi gösterilmiş olup ayrıca akciğer kanseri hücrelerinde nükleusta JAB1 ve PGP 9,5'un, p27 içeren heteromerik bir kompleksin parçaları olabileceği gösterilmiştir. JAB1 ve PGP 9,5'un nükleer lokalizasyonunun, p27'nin nükleusta azalmış seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur. Tersine kontakt inhibisyonla PGP 9,5 ve JAB1 perinükleer veya sitoplazmik yerleşim gösterirse, p27 yalnızca nükleusta lokalize olmaktadır. Bu nedenle PGP 9,5, JAB1 ile olan etkileşimi ve nükleer translokasyonu ile p27 degradasyonunda rol alabilmektedir [45].

Yapılan son çalışmalarda, JAB1'in spesifik olarak CDK inhibitörü p27 proteinine bağlanarak, p27'yi nükleustan sitoplazmaya taşıyarak ubiquitin-proteozom sistemi ile degradasyonunu artırdığı ve hücre içinde p27 düzeyini azalttığı gösterilmiştir [44, 45]. Yapılan başka bir çalışmada epitelyal over tümörlerinde artmış JAB1 ekspresyonu, azalmış p27 düzeyi ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur [48]. JAB1'in, pankreatik duktal karsinom, laringeal skuamöz hücreli karsinom, akciğer adenokarsinomu, baş boyun kanserleri, invaziv meme kanseri, pitüiter tümörler, anaplastik büyük hücreli lenfoma, tiroid medüller karsinomu gibi daha pek çok tümörde artmış ekspresyonu tanımlanmıştır [22]. JAB1/CSN5 ilk olarak Claret ve ark. tarafından hücre proliferasyonunda görev alan gen regülatörü olan AP-1 (jun fos protoonkogen) koaktivatörü olarak tanımlanmıştır [85]. Kwok ve ark. 1998'de, Ferlich ve ark. ise 1999'da JAB1/CSN5'in diğer CSN alt ünitelerine benzemeyen şekilde CSN kompleksten bağımsız olarak da çalışabildiği gösterilmiştir. Kwok ve ark. 1998'de, Ferlich ve ark. ise 1999'da Arabidopsis ve Drosophila'da CSN alt ünitelerinde meydana gelmiş mutasyonların bunların gelişimlerinin durmalarına ya da ölümlerine neden olduğu gösterilmiştir [86].

Karniol ve ark. 1998, Seeger ve ark. 1998, Kwok ve ark. 1999, Osterlund ve ark. 2000'de yaptığı çalışmalarda JAB1/CSN5'nin proteozom aracılı protein degradasyonunda rol aldığını ortaya koydular. Gerek CSN kompleksine bağımlı gerekse CSN kompleksinden bağımsız JAB1/CSN5'in çok çeşitli proteinlerle ortak çalışmak yolu ile pek çok biyolojik süreçte görev aldığı gösterilmiştir [87, 88, 89, 90].

JAB1/CSN5'nin ortak çalıştığı proteinlerden en önemlisi p27 dir. p27-JAB1 ortak etkileşimi ile spesifik bir CDK inhibitörü olan p27 proteinine bağlanarak p27'yi nukleustan sitoplazmaya taşıyıp p27'nin 26s proteozom aracılı degradasyonunu arttırdığı ve bu yolla p27 düzeyini azalttığı Tomoda ve arkadaşları tarafından 1999'da gösterilmiştir [91]. Birkaç yıl önce yapılan çalışmalarda ise JAB1'nin spesifik olarak CDK inhibitörü p27 proteinine bağlanarak, p27'yi nukleustan sitoplazmaya taşıyarak ubiquitin proteozom sistemi ile degradasyonunu arttırdığı ve hücre içinde p27 düzeyini azalttığı gösterilmiştir [42]. Yapılan bir diğer çalışmada ise epitelyal over tümörlerinde artmış JAB1 ekspresyonu, azalmış p27 düzeyi ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur [92].

JAB1/CSN5 ile p27 ilişkisi aynı zamanda Boutissimo ve arkadaşları tarafından 2000 yılında gösterilmiş ve bir nebze daha aydınlatılmıştır. JAB1 aracılığı ile p27 düzeyinde oluşan upregülasyonun (reseptör sayısının artmasının) T hücrelerine antijen sunumu ile oluşan interlokin 2 üretimini engellediği ve invivo ortamda immuntolerans, invitro ortamda ise anerjiye (duyarsızlaştırmaya) neden olduğu gösterilmiştir [93].

JAB1/CSN5 ile p27 etkileşiminin bir sonucu da, tirozin kinaz growth reseptör Human Epidermal Growth Factor Receptor 2'yi (Her2/Neu) içermesidir [51, 52, 53]. Yang ve ark. 2000 tarafından bu reseptörün overekspresyonuna bağlı kanser türlerinde

gösterilmiştir. Her2/Neu, p27'yi down regüle ederek tirozin kinaz yolu ile hücre çoğalmasını stimüle eder, Her2/Neu p27 degradasyonunu ise JAB1'nin sitoplazmaya geçişini aktive ederek yapar [53].

Diğer bir JAB1 sitokin ilişkisi de Kleemann ve arkadaşları tarafından 2000 yılında aydınlatılmıştır. Bu çalışma JAB1'nin p27 ile hücre siklus kontrolündeki rolünü anlamada aydınlatıcı olmuştur. MİF bir antiinflamatuar faktördür ve eksojen (dışardan) uygulandığında intrasellüler JAB1'nı bağlar. MİF-JAB1 kompleksi sitozolde görülür. MİF'in JAB1 üzerinde inhibe edici etkisi vardır. Böylece MİF'in, JAB1 bağımlı p27 degradasyonunu durdurduğu gösterilmiştir [94].

JAB1'nin çekirdekdeki fonksiyonlarının yanısıra plazma membranında da fonksiyonu vardır. Yapılan çalışmalarda Bianchi ve ark. (2000) geçici olarak LFA-1 (adezyon proteini) salgılayan bazı hücrelerde JAB1'nin aynı membran bölgesinde LFA-1'i zenginleştirdiğini görmüşler. CSN kompleksi hiçbir zaman membranda gösterilememiş olduğundan JAB1'nin bu formunun CSN'den bağımsız bir formu olduğunu düşünmüşler. Aynı zamanda bu hücrelere ne zaman suni ya da fizyolojik ligandlarla muamele edilse membran JAB1'lerinin kaybolduğu, aşama aşama sitoplazmadan çekirdeğe geçtikleri görülmüş. Buradan da JAB1 LFA-1 ilişkisinin çok spesifik olduğu sonucunu çıkarmışlardır [95].

JAB1'nin nükleer havuzdaki artışı AP-1 kontrollü Lusiferase Reporter Genin'in artışı ile sonuçlandığı Bianchi ve ark. (2000) tarafından gösterilmiştir. Bu sonuçlar da göstermektedir ki endojen JAB1 fizyolojik olarak AP-1 transkripsiyonel aktivitesini regüle eder. JAB1'nin AP-1 aktivitesine etkisi LFA-1(adezyon proteini) tarafından indüklenir [95].

Li ve ark. (2000) JAB1'nin Endoplazmik Retikulum (ER) ilişkili proteinler tarafından ayrıştırılmış JAB1'nin AP-1 aracılı transkripsiyonunu down regüle ettiği görülmüştür. JAB1'nin rat kaynaklı Luteinizing-hormone-releasing hormone (LH-RH) ilişkisini araştıran çalışmalar, LH-RH'nin overekspresyonunun JAB1'nin C-jun aracılı AP-1 luciferase reporter gen aktivasyonunu potansiyelize etme yeteneğini azalttığını ortaya çıkarmışlardır [96].

Chauchereau et.al., 2000 yılında JAB1 nükleer reseptörlerin transkripsiyonel transaktivasyon aktivitelerini modüle ettiğini bulmuşlar. Bu etki en açık bir şekilde progesteron reseptörlerinde (PR) gösterilmiştir. PR kendi kendilerine hormon bağımlı transaktivasyonlarını uygulayabilirler. Yani bu kabiliyet JAB1'nin katkısıyla geliyor. JAB1'nin etkisiyle PR, kendi kendine hormon bağımlı transaktivasyon uygulama kabiliyeti geliştirmiştir [97].

JAB1'nin bütün bu protein artıkları ile fiziksel interaksiyonlarının gösterilmesine ek olarak diğer nükleer reseptörler olan glukokortikoid, mineralokortikoid, androjenik ve östrojenik reseptörler ve transkripsiyon faktörü NF-KB olan hormon bağımlı transaktivasyon özelliklerini güçlendirebilme yeteneğinin olduğu ortaya konmuştur [97].

Steroid Reseptör Coactivator (SRC) nükleer reseptörlerin ortak koaktivatörüdür. JAB1 muhtemel glukokortikoid reseptörü üzerindeki aktivitesini SRC aracılı gösterir. JAB1 SRC çalışma ilişkisi invitro ortamda Chauchereau ve ark. (2000) tarafından gösterilmiştir [97].

JAB1'nin aynı zamanda diğer transkripsiyon faktörlerin transaktivasyon aktivitelerini de etkilediği, Chauchereau ve ark. tarafından gösterilmiştir. Mesela

nükleer faktör kapp B ve JAB1 ile transfekte edilmiş hücrelerde nükleer faktör kapp B aktivitesinde kuvvetli bir artış bildirilmiştir. Chauchereau ve ark. tarafından nükleer faktör kapp B SRC -1 ile beraber çalıştığından JAB1'nin bu etkisinin de streoit reseptör protein SRC1 aracılı olabileceği öne sürülmüştür [97].

B-cell lymphoma 3 (Bcl3) onkoproteini, IKB (Inhibitor of Kappa B) multigen ailesindedir. Nükleer faktör kapp geninin aktivitesini modüle eder. JAB1, Bcl3 ile beraber çalışır ve NFKB–Bcl3 heterodimer kompleksinin DNA bağlanma aktivitesini artırır [35, 36].

Nasıl oluyorda birçok JAB1 fonksiyonu CSN ile ilişkilendiriliyor? Bu soru birçok JAB1 çalışmasında görmezden gelinmiştir. CSN'nin biyokimyasal fonksiyonunu az bilinir kılmıştır. Kinaz sinyallerinde ve ubiquitin bağımlı protein degradasyonundaki yerine ilişkin kanıtların bulunmasına rağmen bu ilişki rapor edilmemiştir. Seeger ve ark. 1998'de CSN'nin, c-jun'ın da içinde bulunduğu pekçok proteini fosforillediğini iddia etseler de bu aktivitenin CSN bağlantılı kinazlar ile yapıldığı Nuarmon ve ark. tarafından 1999 yılında ortaya atılmıştır [98, 99].

Diğer birçok CSN alt ünitesinin varlığı da hücre siklusu ile ilişkili sinyal yollarında gösterilmiştir. Örnek olarak CSN1, c-Jun N-terminal kinases (JNK) aktivitesinin supresörü olarak tanımlanmıştır. S fazına ilerlemede kontrol noktasında görev alır. CSN6'nın HIV Proteaz (HIV in hücre siklus kontrolünü yapar) ile beraber çalıştığı gösterilmiştir. CSN2 tiroit reseptörü ile beraber çalışan protein-15 olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda Cohen ve ark. 2000 tarafından İnterferon (IFN) sinyal yollarında da düzenleyici olduğu gösterilmiştir [100].

Yapılan çalışmalarda JAB1'nin spesifik olarak CDK inhibitörü p27'nin nukleustan sitoplazmaya taşınarak ubiquitin aracılı proteosome sistemi ile degradasyonunu artırıp p27 düzeyini düşürmesinin bazı kanserlerde kötü prognozla ilişkisi saptanmıştır. JAB1'nin akciğer karsinomu, baş-boyun kanserleri, invaziv meme kanserleri, pituatuer tümörleri, anaplastik büyük hücreli lenfoma, tiroid medullar karsinom gibi pek çok tümörde artmış ekspresyonu tanımlanmıştır.

Cayli ve ark. kronik rinosinüzit ve nazal polipoziste JAB1 ilişkisini göstermek için yaptıkları çalışmada Nazal Polipozissiz (NP'siz) hastalarda TGF- β 1 ve JAB1 düzeylerinde kontrol grubuna göre belirgin bir artış, nazal polipozisli hastalarda ise kontrol grubuna göre anlamlı oranda bir azalma olduğunu görmüşler. Nazal polipozis azalmış JAB1 ve TGF- β ile karakterize olduğu kronik rinosinüzit (CRS) ile karşılaştırıldığında ise JAB1 ve TGF- β 1 düzeylerinde artma olduğu sonucuna varmışlar. NP ve CRS'lerde JAB1 ve TGF- β 1'in salınımı arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu göstermişler. Her iki proteinin de vasküler endotel, epitel ve bazı inflamatuvar hücrelerde lokalize olduğunu görmüşler [101].

Kwok ve ark. 1998 de, Ferlich ve ark. ise 1999'da JAB1/CSN5'in diğer CSN alt ünitelerine benzemeyen şekilde CSN kompleksten bağımsız olarak da çalışabildiğini göstermişler. Aynı araştırmacılar, Arabidopsis ve Drosophila'da CSN alt ünitelerinde meydana gelmiş mutasyonların bunların gelişimlerinin durmalarına ya da ölümlerine neden olduğunu bildirmişlerdir [86, 89].

SKP2 ile p27 arasında ters bir ilişkisi olduğu adeneoid kistik karsinomlu hastalarda yapılan araştırmalar sonucu bulunmuştur. p27 salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenirken SKP2 miktarında artış bulunsa da histolojik tümör

derecesi, lenf nodu metastazı ve SKP2 salınımının miktarı arasında bir korelasyon bulunmamıştır [102]. p27 ile SKP2 arasında karşılaştırma yapılan bir başka çalışmada ise 43 mukoepidermoid karsinomlu hastalarda mikroskopik düzeyde SKP2 tümör çapı arasında kötü prognozla ilişkili gözlemlenirken, p27 miktarıyla SKP2 salınım miktarı arasında ters bir ilişki bulunmamıştır[103].

Bu çalışmaların yanısıra Hacettepe Üniversitesi'nde 30 kişiden oluşan tiroid papiller karsinomlu hastalarda JAB1, SKP2 ve p27 arasındaki ilişkiyi gözlemek için immünohistokimyasal düzeyde yapılan araştırmada JAB1 ile p27 salınımları arasında anlamlı bir bulguya rastlanmazken, SKP2 ile p27 salınımları arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bunların yanısıra JAB1 ile tümör çapları arasında ve SKP2 salınım miktarının tümör multisentisitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bulgular bulunmuştur [22].

Heterozigot farelerdeki proliferasyonda, JAB1^{-/-} blastositler ve JAB1^{+/-} MEF'ler belirgin defekt ve apoptozda önemli artış göstermekte; JAB1^{-/-} blastositler ve JAB1^{+/-} MEF'ler ve JAB1 hasarlı hücrelerde görülen düşük Rad51 proteinin seviyeleri, JAB1'nin hücreSEL SAĞKALIMDA, spontan DNA hasarında ve HR'ların DNA onarımında önemli bir rol oynamaktadır [54]. Tian ve ark. 2010 yılında yaptıkları bu çalışmada, JAB1'nin fare embriyosunun erken dönem gelişimi için önemli olduğunu gösterdiler. Bu çalışmaya göre, üreme hattındaki genlerin bozulmasıyla JAB1 aktivitesinin durması, implantasyondan sonraki embriyonik gelişimin sonlanmasına neden olmaktadır. Tomoda ve ark. 2004 yılındaki yapmış olduğu çalışma da bu sonuçları desteklemektedir. Ayrıca CSN'yi yıkıcı ve çeşitli organizmalarda mutasyonel çalışmaların yapılması da destekler niteliktedir [104], 105, 106, 107, 108]. Arabidopsis

thaliana'da, CSN'nin çeşitli alt ünitelerindeki mutasyonlar, embriyoda şiddetli gelişim geriliğine ve bu aşamadan sonrada ölümlere sebep olmaktadır [86]. Oron ve ark. 2007 yılındaki yapmış oldukları çalışmada, *Drosophila melanogaster*'deki CSN'nin kaybı hematopoez, aksonal guidans ve steroid hormon sinyalindeki defektleride içeren karmaşık bir fenotiple sonuçlandığını gösterdiler [109]. Fizyon mayalarda, CSN kompleksin hücre siklus kontrolünde önemli olduğu gösterilmiştir [110]. Tüm bu çalışmalar bize göstermektedir ki JAB1'nin eksikliği diğer organizmalarda olduğu gibi farelerde de gelişme esnasında embriyonik ölümlere neden olur. Fakat bu embriyonik ölümün sebebinin JAB1'nin eksikliğinden kaynaklandığı henüz ispatlanamamıştır. Ama şunuda biliyoruz ki JAB1 eksikliği olan farelerde DSB'nin HR onarımında kullanılan Rad51'in azalması embriyonik ölümlerin temel mekanizmalarından biridir [54]. Rad51'in aşırı ekspresyonu spontan rekombinant frekansını genişletebilir ve DSB indüklü kanser terapilerine karşı korunmayı arttırabilir [111, 112].

Tüm bu bulgular JAB1'nin, hücre proliferasyonu, DNA onarımı ve hücre sel sağkalım regülasyonundaki tüm mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. JAB1 eksikliği olan hücreler ve hayvan modelleri, JAB1'nin p53 ve Rad51 gibi kanser hedef moleküllerinin regülasyonundaki rolü ve onların disregülasyonuna eşlik eden anomaliler, JAB1'nin insanlardaki kanser terapilerinin potansiyel hedefi olduğunu düşündürmüştür [54].

Çalışmamızın bulgular kısmındaki Tablo 3 incelendiğinde, görüldüğü üzere fertil bireylerin +2, ve +1 şiddetinde boyanan veya 0 şiddetinde yani boyanmayan sperm hücrelerinin shape factor [μm] leri arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmazken JAB1 antikoru ile boyanma dereceleri arasında fark göze çarpmakta ya da

fertil birey ile infertil bireylerin hiç boyanmayan sperm hücrelerinin JAB1 pozitif / negatifli ile fark bulunmazken shape factor [μm] arasında çok ufakta olsa bir farklılık göze çarpmaktadır. Fakat bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ama +3 şiddetinde JAB1 ile pozitif boyanan fertil birey ile +2 şiddetinde JAB1 ile pozitif boyanan sperm hücresi arasında anlamlı fark bulunmakta. Yani bir bireyin normal spermiyogram değerlerine sahip olsa ve WHO / Kruger Strick Kriterleri'ne uygun morfolojiye sahip olsalar bile o sperm hücresi için kesin fertil ya da kesin infertil kapasitede olduğunu söylemenin doğru olmayacağı kanaatindeyiz. Bu ölçüm değerlerin yanı sıra sperm veya yumurta hücresinde ki yolakların daha iyi aydınlatılması ve daha hassas kriterler, ölçümler ve belirteçlerle rutin yapılan testler desteklenmeli. Bu şekilde hastalar hem daha az yıpranırlar ve zaman kaybetmiş olmazlar, hemde daha az maliyetli olacağı kanaatindeyiz.

+3 şiddetinde boyanan sperm hücrelerinin shape factorü ile hiç boyanmayan fertil bireyin shape factorü arasında istatistiksel olarak anlamlılık görülmemektedir. Fakat bununla birlikte bir sperm hücresi gerek morfolojisi yönünden gerekse shape factor ölçüm ve hesaplamaları yönünden normal değerlere sahip olsa bile bu sperm JAB1 antikoru ile pozitif boyanma derecesi ile infertilite derecesi arasında doğru bir orantı olduğu göze çarpmaktadır. Yani birey WHO veya Kruger Strick Kriterleri'ne uygun sperm hücresine sahip olsa bile JAB1 antikorusunun bulunma derecesine göre infertil olarak kabul edilebilir. Belki bu durumun terside söz konusu da olabilir. Bunun daha iyi aydınlatılması için ilerki yıllarda daha ayrıntılı ve farklı antikor ve proteinlerle birbirini destekleyici çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Bütün bu ve buna benzer JAB1/CSN5 çalışmalarının yanı sıra insan veya diğer canlıların sperm hücrelerinde bu proteinin varlığı, var ise konuşlandığı yerin ve fertilitayla ilişkisini belirten bir araştırma görülmemiştir. Çalışmamızı özgün kılan bu yönünün sonucunda fertil bireylerin sperm hücrelerinde JAB1 proteini bulunmazken veya bazı sperm hücrelerinde sınırlı sayıda konuşlandığı bulunurken, infertil bireylerin sperm hücrelerinin büyük bir kısmında JAB1 proteinin varlığı istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. Aynı bireylerin semenlerini kapasitasyona tabi tuttuğumuzda fertil ve infertil sperm hücrelerinde JAB1 proteinin miktarı sıfırncı saat ile birinci saat arasında çok fazla anlamlı fark olmamakla beraber sıfırncı saat ile dördüncü saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir. Bunun yanı sıra morfolojisi bozuk sperm hücrelerinde JAB1 proteininin daha yoğun bir şekilde bulunduğu gözlemlendi. Çalışmamızda da bir bireyin normal spermiyogram değerlerine ve WHO/kruger strick kriterlerine uygun morfolojiye sahip olsalar bile o sperm hücresi için kesin fertil ya da inferil yeteneğinde olduğunu söylemenin doğru olmayacağı kanaatindeyiz. Bu ölçüm değerlerin yanı sıra sperm veya yumurta hücresinde ki yolakların daha iyi aydınlatılması ve daha hassas kriterler, ölçümler ve belirteçlerle rutin yapılan testler desteklenmelidir. Bu şekilde hastalar hem daha az yıpranır ve zaman kaybetmiş olmazlar, hemde daha az maliyetli ve ileriki yıllarda ICSI ve IVF gibi işlemlerde veya bu sahalardaki çalışmalarda bizlere önemli ışık tutacağı kanaatindeyiz.

Sonuç olarak bireyler WHO veya Kruger strick kriterlerine uygun sperm hücresine sahip olsa bile JAB1 ve benzeri antikorların bulunma derecesine göre infertil olarak kabul edilebilir. Belki bu durumun terside söz konusu da olabilir. Bunun daha iyi aydınlatılması için ileriki yıllarda daha ayrıntılı ve farklı antikor ve proteinlerle birbirini destekleyici çalışmalar yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKÇA

- 1 Fikret Erdemir, the effect of clomiphene citrate on semen parameters and pregnancy rates in cases with idiopathic male infertility (idiopatik erkek infertilitesinde klomifen sitratın semen parametreleri ve gebelik oranları üzerine etkisi) Yeni Üroloji Dergisi 2011; 6 (1): 38-42 The New Journal of Urology.
- 2 Fikret Erdemir, Seçici serotonin geri alım inhibitörleri ve infertilite arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi, Erkek Cinsel Sağlığı derleme, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji AD.
- 3 World Health Organization World Health organization: Laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition (5th ed).Geneva: WHO Press, 2010.
- 4 Fertil ve infertil semen örneklerinde enerji üretiminde görev alan bazı sitozolik ve mitokondriyal enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. Hülya Leventerler. T.C. Çukurova Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalı. Doktora tezi. Adana 2005.
- 5 Günalp S. Kadın Doğum Hekiminin Erkek Faktörünün Araştırılması ve Değerlendirilmesindeki Rolü Ne Olmalıdır? Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi,2004;7(29:129-140.).
- 6 Delilbaşı L. Tüp Bebek-Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri. Bayındır Sağlık, Eğitim ve Araştırma Vakfı, Ankara, 1997.

-
- 7 Ahmet Gökçe, interpretation of semen analysis, Standard Semen Analysis Criteria of World Health Organization, Türk üroloji seminerleri 2011;2:1-7.
- 8 Lens JW. The Spermatozoon. Bras M, Lens JW, Piederiet MH, ivf lab-Laboratory aspects of invitro fertilization, Organon pres.1996.
- 9 Schiff JD, et al. Success of testicular sperm injection and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 6263.
- 10 Hopps CV, et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. Hum Reprod 2003; 18: 1660.
- 11 Stouffs K, et al. Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. Eur J Hum Genet 2005; 13:336.
- 12 Erkek İnfertilitesini Değerlendirmede Semen Analizinin Özellikleri ve Rolü M.Ali Kayıkçı H.Kamil Çam, Yavuz Akman, Ali Erol Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Düzce Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 4 (3): 35-38.
- 13 Duru NK. Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri. GATA Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları Ankara, 1998.
- 14 Makler Counting Chamber Semen Evaluation Erişim: <http://www.zdline.com/maklercc.htm> Erişim tarihi: 20.07.2011.

-
- 15 Sergio C.Oehninger, MD PhD Thinus F.Kruger MD Frcog Male infertility diagnosis and treatment 2007 second edition, Professor, Departments of obstetrics and gynecology, and Urology and Division director, the jones institute for reproductive medicine eastern virgina medical school, school, Norfolk, virgina USA; Professor and Chairperson Department of obstetrics ana gynaecology, and reproductive biology unit tygerberg academic hospital and stellenboch university, tygerberg South africa.Informa Healthcare ISBN 0-415-39742-1.
- 16 Enginsu E, Günalp S, Orhon E. Sperm Morfoloji Atlası. Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları No:4, Yılmaz Ofset, 1995.
- 17 Işık AZ, Vicdan K. İnvitro Fertilizasyon Uygulamalarında Laboratuar. Çağdaş Medikal Ankara,1999.
- 18 Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization, Fertil Steril 49: 112-114, 1988.
- 19 Molecular Biology Of The Cell, 5th Ed. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter ISBN:978-0-8153-4105-5 (hardcover) ISBN: 978-0-8153-4106-2 (paperback) QH581.2.M64 2008 571.6-dc22 2007005475 CIP.
- 20 Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP: Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. Hum Reprod 2001;16: 1165-71

-
- 21 Ekholm, S.V., Reed, S.I. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:676-684.
- 22 Dinçer, N. Tükruk bezinin mukoeypidermoid karsinom ve adenoid kistik karsinomlarında p27, JAB1, SKP2 ve PGP 9,5 ekspresyonu, T.C. Hacettepe üniversitesi tıp fakültesi patoloji anabilim dalı, uzmanlık tezi, 2008.
- 23 Sherr, C.J., McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002;2:103-112.
- 24 Lowe, S.W., Sherr, C.J. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13:77-83.
- 25 Joanna Bloom, Michele Pagano, Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation, Volume 13, Issue 1, February 2003, Pages 41–47.
- 26 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J Cloning of p27 Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. 1994; *Cell* 78 (1): 59–66. doi:10.1016/0092-8674(94)90572-X. PMID:8033212.
- 27 Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., Massague, J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994;78:59-66.
- 28 Toyoshima, H., Hunter, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994;78:67-74.

-
- 29 Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M., Kemp, C.J. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 1998;396:177-180.
- 30 Catzavelos, C., Bhattacharya, N., Ung, Y.C., Wilson, J.A., Roncari, L., Sandhu, C., Shaw, P., Yeger, H., Morava-Protzner, I., Kapusta, L., Franssen, E., Pritchard, K.I., Slingerland, J.M. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med.* 1997;3:227-230.
- 31 Barbareschi, M., van Tinteren, H., Mauri, F.A., Veronese, S., Peterse, H., Maisonneuve, P., Caffo, O., Scaioli, M., Doglioni, C., Galligioni, E., Dalla Palma, P., Michalides, R. p27 (Kip1) expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study on 512 patients with long-term follow-up. *Int J Cancer.* 2000;89:236-241.
- 32 Slingerland, J.M., Pagano, M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.* 2000;183:10-17.
- 33 Kouvaraki, M., Gorgoulis, V.G., Rassidakis, G.Z., Liodis, P., Markopoulus, C., Gogas, J., Kittas, C. High expression levels of p27 correlate with lymph node status in a subset of advanced invasive breast carcinoma. *Cancer* 2002;94:2454-2465.
- 34 Cheng, J.D., Werness, B.A., Babb, J.S., Meropol, N.J. Paradoxical correlation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf1/cip1 and p27kip1 in metastatic colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1057-1062.

-
- 35 Sáez, A.L., Sánchez, E., Sánchez-Beato, M., Cruz, M.A., Chacón, I., Muñoz, E., Camacho, F.I., Martínez-Montero, J.C., Mollejo, M., García, J.F., Piris, M.A. p27KIP1 is abnormally expressed in diffuse large B-cell lymphomas and is associated with an adverse clinical outcome. *British Journal of Cancer* 1999;80:1427-1434.
- 36 Sánchez-Beato, M., Camacho, F.I., Martínez-Montero, J.C., Sáez, A.L., Villuendas, R., Sánchez-Verde, L., García, J.F., Piris, M.A. Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-Cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood* 1999;94:765-772.
- 37 Tomoda, K., Kubota, Y., Kato, J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by JAB1. *Nature* 1999;398:160-165.
- 38 The Hallmarks of Cancer, Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000.
- 39 Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A., Pagano, M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol.* 1999;1:193-199.
- 40 Tsvetkov, L.M., Yeh, K.H., Lee, S.J., Sun, H., Zhang, H. p27(Kip1) ubiquitin and degradation is regulated by the SCF (SKP2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol.* 1999;9:661-664.

-
- 41 Bettina K.J. Hetfeld, Dawadschagal Bech-Otschir, Wolfgang Dubiel, Purification Method of the COP9 Signalosome from Human Erythrocytes, *Methods in Enzymology* Volume 398, 2005, Pages 481–491 Ubiquitin and Protein Degradation, Part A.
- 42 Chamovitz, D.A., Segal, D. JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO Rep.* 2001;2:96-101.
- 43 Schwechheimer, C., Deng, X.W. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol.* 2001;11:420-426.
- 44 Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y. et al. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem.* 2002;277:2302-2310.
- 45 Caballero, O.L., Resto, V., Patturajan, M., Meerzaman, D., Guo, M.Z., Engles, J., Yochem, R., Ratovitski, E., Sidransky, D., Jen, J. Interaction and colocalization of PGP 9,5 with JAB1 and p27(Kip1). *Oncogene* 2002;21:3003-3010.
- 46 Zhang, H., Kobayashi, R., Galaktionov, K., Beach, D. p19 Skp1 and p45 Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 1995;82:915-925.
- 47 Brian T. Zafonte, James Hult, Derek F. Amanatullah, Chris Albanese, Chenguang Wang, Eliot Rosen, Anne Reutens, Joseph A. Sparano, Michael P. Lisanti, And Richard G. Pestell. *Cell-Cycle Dysregulation In Breast Cancer: Breast Cancer*

Therapies Targeting The Cell Cycle, *Frontiers in Bioscience* 5, D938-961, December 1, 2000.

48 Shackelford TJ, Claret FX. JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. *Cell Div.* 2010 Oct 18;5:26. doi: 10.1186/1747-1028-5-26.

49 Sui, L., Dong, Y., Ohno, M., Watanabe, Y., Sugimoto, K., Tai, Y., Tokuda, M. JAB1 expression is associated with inverse expression of p27(Kip1) and poor prognosis in epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4130-4135.

50 Yunbao Pan, Francois X. Claret, Targeting Jab1/CSN5 in nasopharyngeal carcinoma, *Cancer Letters* Volume 326, Issue 2, 30 December 2012, Pages 155–160.

51 Roy V, Perez EA Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. *Oncologist* November 2009;14 (11): 1061–9. doi:10.1634/theoncologist.2009-0142. PMID:19887469.

52 Olayioye MA Update on HER-2 as a target for cancer therapy: Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001;3 (6): 385–389. doi:10.1186/bcr327. PMC:138705. PMID:11737890.

53 Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg pH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu

oncogene. *Science* 1985;230 (4730): 1132–9. doi:10.1126/science.2999974.
PMID:2999974.

54 L Tian, G Peng, JM Parant, V Leventaki, I Drakos, Q Zhang, J Parker-Thornburg, TJ Shackleford, H Dai, S-Y Lin, G Lozano, GZ Rassidakis, and FX Claret, Essential Roles of Jab1 in Cell Survival, Spontaneous DNA Damage, and DNA Repair *Oncogene*. 2010 November 18; 29(46): 6125–6137. doi:10.1038/onc.2010.345.

55 Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362:709–15. [PubMed: 8469282]

56 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461:1071–8. [PubMed: 19847258]

57 Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001; 27:247–54. [PubMed: 11242102])

58 Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*. 2001; 2:196–206. [PubMed: 11256071]

59 Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell*. 1992; 69:457–70. [PubMed: 1581961]

-
- 60 Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:2298–302. [PubMed: 7892263]
- 61 Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, et al. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:6236–40. [PubMed: 8692798]
- 62 Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, et al. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *Embo J.* 1998; 17:598–608. [PubMed: 9430650]
- 63 Gupta RC, Bazemore LR, Golub EI, Radding CM. Activities of human recombination protein Rad51. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:463–8. [PubMed: 9012806]
- 64 Maacke H, Jost K, Opitz S, Miska S, Yuan Y, Hasselbach L, et al. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene.* 2000; 19:2791–5. [PubMed: 10851081]
- 65 Xia SJ, Shammass MA, Shmookler Reis RJ. Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase. *Mol Cell Biol.* 1997; 17:7151–8. [PubMed: 9372947]

-
- 66 Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T. Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res.* 2002; 62:219–25. [PubMed: 11782381]
- 67 <http://www.mfitech.com/technology-overview/size-and-morphology/maximum-feret-diameter/>
- 68 Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality Henk G. Merkus ISBN: 978-1-4020-9015-8 e-ISBN:978-1-4020-9016-5 library of congress control number:2008941080 2009 springer science business media B.V.
- 69 Gundersen HJ, Jensen EB, The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Stereologic and Electron Microscopic Diabetes Research Laboratory, University of Aarhus, Denmark. J Microsc.* 1987 Sep;147(Pt 3):229-63.
- 70 Yanagimachi R: Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* 1994 Nov;2(4):371-2. Review.
- 71 Zarintash RJ, Cross NL. Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod* 1996 Jul;55(1):19-24.
- 72 Smith TT: The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod.* 1998 May;58(5):1102-4. Review

-
- 73 Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci* 1996 Aug 15;1:d189-205
- 74 Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H. Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* 1999 Nov;61(5):1226-34
- 75 Florman HM. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1994 Sep;165(1):152-64
- 76 Santi CM, Santos T, Hernandez-Cruz A, Darszon A. Properties of a novel pH-dependent Ca^{2+} permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *J Gen Physiol* 1998 Jul;112(1):33-53
- 77 Holappa K, Mustonen M, Parvinen M, Vihko P, Rajaniemi H, Kellokumpu S. Primary structure of a sperm cell anion exchanger and its messenger ribonucleic acid expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* 1999 Oct;61(4):981-6
- 78 Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Interaction between Ca^{2+} , cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl* 1998 Jul-Aug;19(4):434-43

-
- 79 Doku örneklerini histolojik analize hazırlama, Tıbbi laboratuvar 725TTT139 T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Ankara, 2011.
- 80 T. Huang, et al., "Anisotropic Grain Growth and Microstructural Evolution of Dense Mullite above 1550°C," J. American Ceramic Soc., Vol 83, Issue 1, P 204-10, Jan 2000.
- 81 P.F. Becher, et al., "Microstructural Design of Silicon Nitride with Improved Fracture Toughness: I, Effects of Grain Shape and Size," J. American Ceramic Soc., Vol 81, Issue 11, P 2821-2830, Nov 1998.
- 82 H.E. Exner & H.P. Hougardy, Quantitative Image Analysis of Microstructures, DGM Informationsgesellschaft mbH, 1988, p 33-39, ISBN 3-88355-132-5.
- 83 L. Wojnar & K.J. Kurzydłowski, et al., Practical Guide to Image Analysis, ASM International, 2000, p 157-160, ISBN 0-87170-688-1.
- 84 Kim BC, Lee HJ, Park SH, Lee SR, Karpova TS, McNally JG, Felici A, Lee DK, Kim SJ. Jab1/CSN5, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor beta signaling by binding to Smad7 and promoting its degradation. Mol Cell Biol. 2004 Mar;24(6):2251-62. Laboratory of Cell Regulation and Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-5055, USA.
- 85 Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. Nature.

1996 Oct 3;383(6599): 453-7. Department of Pharmacology, Program in Biomedical Sciences, School of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla 92093-0636, USA.

- 86 Kwok SF, Solano R, Tsuge T, Chamovitz DA, Ecker JR, Matsui M, et al. Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. *Plant Cell*. 1998;10:1779–1790. [PubMed: 9811788]
- 87 Karniol, B., Yahalom, A., Kwok, S.F., Tsuge, T., Matsui, M., Deng, X.-W. and Chamovitz, D.A. (1998) The Arabidopsis homolog of an eIF3 complex subunit associates with the COP9 complex. *FEBS Lett.*, 439, 173–179. | Article | PubMed | ISI | CAS |
- 88 Seeger, M., Kraft, R., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Dumdey, R., Schade, R., Gordon, C., Naumann, M. and Dubiel, W. (1998) A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J.*, 12, 469–478. | PubMed | ISI | CAS |
- 89 Kwok, S.F., Staub, J.S. and Deng, X.-W. Characterization of two subunits of the Arabidopsis 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *J. Mol. Biol.*, 1999; 285: 85–95. | Article | PubMed | ISI | CAS |

-
- 90 Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N. and Deng, X.W. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, 2000;405:462–466. | Article | PubMed | ISI | CAS |
- 91 Tomoda, K., Kubota, Y. and Kato, J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by JAB1. *Nature*, 1999;398: 160–165. | Article | PubMed | ISI | CAS |
- 92 Sui, L., Dong, Y., Ohno, M., Watanabe, Y., Sugimoto, K., Tai, Y., Tokuda, M. Jab1 expression is associated with inverse expression of p27(Kip1) and poor prognosis in epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4130-4135.
- 93 Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Taylor, P.A., Berezovskaya, A., Grass, I., Blazar, B.R. and Nadler, L.M. p27Kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nature Med.*, 2000;6: 290–297.
- 94 Kleemann, R. et al. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through JAB1. *Nature*, 2000;408: 211–216. | Article | PubMed | ISI | CAS |
- 95 Bianchi, E., Denti, S., Granata, A., Bossi, G., Geginat, J., Villa, A., Rogge, L. and Pardi, R. Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature*, 2000;404: 617–621. | Article | PubMed | ISI | CAS |

-
- 96 Li, S., Liu, X. and Ascoli, M. p38JAB1 binds to the intracellular precursor of the lutropin/choriogonadotropin receptor and promotes its degradation. *J. Biol. Chem.*, 2000;275: 13386–13393. | Article | PubMed | ISI | CAS |
- 97 Chauchereau, A., Georgiakaki, M., Perrin-Wolff, M., Milgrom, E. and Loosfelt, H. JAB1 interacts with both the progesterone receptor and SRC-1. *J. Biol. Chem.*, 2000;275: 8540–8548. | Article | PubMed | ISI | CAS |
- 98 Naumann M, Bech-Otschir D, Huang X, Ferrell K, Dubiel W. COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem.* 1999 Dec 10;274(50):35297-300 PMID:10585392.
- 99 Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, Gordon C, Naumann M, Dubiel W. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J.* 1998 Apr;12(6):469-7.
- 100 Cohen, H., Azriel, A., Cohen, T., Meraro, D., Hashmueli, S., Bech-Otschir, D., Kraft, R., Dubiel, W. and Levi, B.Z. Interaction between ICSBP and CSN2 (TRIP15) – a possible link between IRF signaling and the COP9/signalosome. *J. Biol. Chem.*, 2000;275: 39081–39089. | Article | PubMed | ISI | CAS |
- 101 Sevil Cayli, Ahmet Eyibilen, Levent Gurbuzler, Sema Koc, Gulsen Arslan Ataya, Adnan Ekici, Ibrahim Aladağ. Jab1 expression is associated with TGF-β1 signaling in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis *Acta Histochem.* 2012 Jan;114(1):12-7. doi: 10.1016/j.acthis.2011.01.005. Epub 2011 Apr 3.

-
- 102 Keikhaee, M.R., Kudo, Y., Siriwardena, S., Wu, L., Ogawa, I., Takata, T. SKP2 expression is associated with down-regulation of p27 protein and cell proliferation in salivary adenoid cystic carcinoma. *Virchows Arch.* 2007;450:567-574.
- 103 Handra-Luca, A., Ruhin, B., Lesty, C., Fouret, P. p27, SKP2, and extra-cellular signal-related kinase signalling in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncology* 2006;42:1005-1010.
- 104 Doronkin S, Djagaeva I, Beckendorf SK. CSN5/Jab1 mutations affect axis formation in the *Drosophila* oocyte by activating a meiotic checkpoint. *Development.* 2002; 129:5053–5064.[PubMed:12397113]
- 105 Suh GS, Poeck B, Chouard T, Oron E, Segal D, Chamovitz DA, et al. *Drosophila* JAB1/CSN5 acts in photoreceptor cells to induce glial cells. *Neuron.* 2002; 33:35–46. [PubMed: 11779478]
- 106 Lykke-Andersen K, Schaefer L, Menon S, Deng XW, Miller JB, Wei N. Disruption of the COP9 signalosome Csn2 subunit in mice causes deficient cell proliferation, accumulation of p53 and cyclin E, and early embryonic death. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:6790–7. [PubMed: 12972599]
- 107 Tomoda K, Yoneda-Kato N, Fukumoto A, Yamanaka S, Kato JY. Multiple functions of Jab1 are required for early embryonic development and growth potential in mice. *J Biol Chem.* 2004;279:43013–8. [PubMed: 15299027]

-
- 108 Harari-Steinberg O, Cantera R, Denti S, Bianchi E, Oron E, Segal D, et al. COP9 signalosome subunit 5 (CSN5/JAB1) regulates the development of the *Drosophila* immune system: effects on Cactus, Dorsal and hematopoiesis. *Genes Cells*. 2007; 12:183–95. [PubMed: 17295838]
- 109 Oron E, Tuller T, Li L, Rozovsky N, Yekutieli D, Rencus-Lazar S, et al. Genomic analysis of COP9 signalosome function in *Drosophila melanogaster* reveals a role in temporal regulation of gene expression. *Mol Syst Biol*. 2007; 3:108. [PubMed: 17486136]
- 110 Mundt KE, Porte J, Murray JM, Brikos C, Christensen PU, Caspari T, et al. The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase. *Curr Biol*. 1999; 9:1427–1430. [PubMed: 10607571]
- 111 Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26:2859–64. [PubMed: 9611228]
- 112 Hannay JA, Liu J, Zhu QS, Bolshakov SV, Li L, Pisters PW, et al. Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6:1650–60. [PubMed: 17513613]