



T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE SEMİNAL
PLAZMA GRP78 PROTEİN DÜZEYİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selin KAYA

**Samsun
Temmuz-2019**



T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE SEMİNAL
PLAZMA GRP78 PROTEİN DÜZEYİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selin KAYA

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Ü. M. Alper ARSLAN

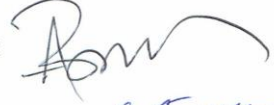
**Samsun
Temmuz- 2019**

T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Selin KAYA tarafından Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN Danışmanlığında hazırlanan "İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE SEMİNAL PLAZMA GRP78 PROTEİN DÜZEYİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 05 / 07 / 2019 tarihinde yapılan sınav ile Moleküler Tıp Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ramazan AŞCI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Gizem Dönmez YALÇIN, Adnan Menderes Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Ü. Mehmet Alper ARSLAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

... / ... /

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen ve bana her konuda yardımcı olan değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Alper ARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Hastalara tanı konulmasında ve aynı zamanda hasta gruplarının oluşturulmasında emeği geçen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ramazan AŞCI'ya yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca manevi desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Bahattin AVCI'ya ve Veteriner Fakültesi Veteriner Biyokimyası Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Gül Fatma YARIM'a desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Hasta ve kontrol grupları için örneklerimin toplanmasında ve örneklerin analiz edilmesinde büyük emeği olan Biyolog Gökhan ZENGİN'e teşekkür ederim.

İstatistiksel analiz kısmındaki yardımlarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İstatistik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Fatih SAĞLAM'a teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım dönemden bugüne kadar geçen süreçte yanımda olan tüm arkadaşlarıma ve yakınlarıma teşekkür ederim.

Son olarak bana her zaman destek çıkan, her durumda arkamda duran, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem, babam ve kız kardeşime sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.18.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

İDİYOPATİK ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE SEMİNAL PLAZMA GRP78 PROTEİN DÜZEYİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada idiyopatik oligoastenoteratozoospermi (OAT) tanısı alan infertil erkeklerde seminal plazma GRP78 protein miktarı değişiminin ve farklı semen parametreleri ile arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: Çalışmaya Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Üroloji Polikliniğine başvuran idiyopatik infertilite tanısı alan OAT sendromlu erkek hastalar katıldı. Güç analizi hesaplamasına göre (%95 güven ve %99,5 test gücü), çalışmaya yaşları 20-50 arasında değişen idiyopatik OAT tanımına uygun 20 hasta ve 20 sağlıklı (kontrol grubu) erkek dâhil edildi. Semen örneklerinde spektrofotometrik sandviç ELISA yöntemi kullanılarak iki grup için seminal plazma GRP78 protein konsantrasyonları saptandı. GRP78 düzeyi ile semen parametreleri arasındaki korelasyonlar analiz edildi. Sonuçlar istatistiksel olarak SPSS programında değerlendirildi.

Bulgular: Seminal plazmada ölçülen GRP78 konsantrasyonunun ortalaması, hasta grubunda $20,52 \pm 13,63$ ng/ml, kontrol grubunda ise $12,16 \pm 9,21$ ng/ml olarak ölçüldü. Grupların ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi (T testi, $p=0,029$). OAT grubu GRP78 protein miktarı ile semen parametreleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde, GRP78 düzeyi ile semen hacmi ($r=-0,541$) ve total sperm sayısı ($r=-0,508$) arasında anlamlı korelasyonlar olduğu saptandı ($p<0,05$).

Sonuç: Bu çalışma ile literatürde ilk kez, OAT tanısı konulan infertil erkeklerin seminal plazmasında bulunan ısı şoku proteini GRP78 konsantrasyonu ve bunun çeşitli semen parametreleriyle olan ilişkisi incelenmiştir. Seminal plazma GRP78 protein konsantrasyonunun OAT hastalarında fertil kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve bunun özellikle total sperm sayısı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bulgularımız ekstrasellüler GRP78'nin idiyopatik erkek infertilitesi patogenezinde rolü olabileceğini göstermektedir. Ancak GRP78'in bu bağlamda üstlendiği fonksiyon ve özellikle seminal plazmaya taşınma mekanizmaları hakkında daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi; OAT; GRP78; ısı şoku proteini; HSP70; ELISA

Selin KAYA, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz-2019

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN IDIOPATHIC MALE INFERTILITY AND SEMINAL PLASMA GRP78 PROTEIN LEVEL

Aim: This study is aimed to determine the seminal plasma GRP78 level in infertile men diagnosed with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia (OAT) and its relationship with different semen parameters.

Materials and Methods: Infertile male patients who were admitted to the Department of Urology at Ondokuz Mayıs University Hospital and diagnosed with idiopathic OAT syndrome were enrolled in this study. Based on the power analysis (at 95% confidence interval and 99.5% test power), the study included 20 patients and 20 healthy men (control group) of ages between 20 and 50. Seminal plasma GRP78 protein concentrations in semen samples were determined for both groups by using spectrophotometric sandwich ELISA method. The correlations between GRP78 level and different semen parameters were analyzed. The results were evaluated statistically by SPSS program.

Results: The mean concentration of GRP78 protein in the seminal plasma was found to be 20.52 ± 13.63 ng/ml in the patient group and 12.16 ± 9.21 ng/ml in the control group. A significant difference was found between the means of the groups (T test, $p=0.029$). When the relationship between the semen parameters of the OAT group and GRP78 protein level was analyzed, significant correlations were found between GRP78 level and semen volume ($r = -0,541$) and total sperm count ($r = -0,508$) ($p < 0,05$).

Conclusion: This study, for the first time in literature, investigates the concentration of the heat shock protein GRP78 in the seminal plasma of infertile men diagnosed with OAT syndrome and its relationship with various semen parameters. The concentration of seminal plasma GRP78 protein was significantly higher in OAT patients compared to fertile controls and this was in correlation particularly with total sperm count. Our findings suggest that extracellular GRP78 may have a role in the pathogenesis of idiopathic male infertility. However, more comprehensive studies are required to identify the function of GRP78 in this context and particularly the mechanisms of transport to seminal plasma.

Keywords: Male infertility; OAT; GRP78; heat shock protein; HSP70; ELISA

Selin KAYA, Master's Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, July-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ADP** : Adenozin Monofosfat
- AIF** : Apoptoz İndükleyici Faktör
- APAF-1** : Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör
- AR** : Androjen Reseptörü
- ATF6** : Aktive Transkripsiyon Faktörü
- ATP** : Adenozin Trifosfat
- AZF** : Azospermi Faktör Bölgesi
- BIP** : İmmüoglobulin-Bağlayıcı Protein
- CARD** : Kaspaz Aktivasyon Alım Alanı
- CFTR** : Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör Protein
- DED** : Ölüm Efektör Alanı
- DISC** : Ölüm İndükleyen Sinyalleşme Kompleksi
- EIF2 α** : Ökaryotik Başlangıç Faktörü 2 α
- ELISA** : Enzim Bağlı İmmünosorbent Tahlili
- ER** : Endoplazmik Retikulum
- ERAD** : ER'ye Bağlı Protein Yıkımı
- FADD** : FAS-İlişkili Ölüm Alanı İçeren Protein
- FASL** : FAS Ligand
- FSH** : Folikül Uyarıcı Hormon
- GNRH** : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
- GPX** : Glutasyon Peroksidaz
- GRD** : Glutasyon Redüktaz
- GRP** : Glukozla Düzenlenen Protein

- HSF** : Isı Şoku Faktörü
- HSP** : Isı Şoku Proteini
- IRE1** : Inositol Gerektiren Enzim 1
- KDEL** : Lys-Asp-Glu-Leu
- LH** : Lüteinleştirici Hormon
- MA** : Olgunlaşma Tutulumu (Maturation Arrest)
- MHC** : Majör Doku Uyumluluk Kompleksi
- NBD** : Nükleotit Bağlanma Domaini
- NEF** : Nükleotit Değişim Faktörleri
- NOA** : Obstrüktif Olmayan (Nonobstructive) Azoospermi
- OAT** : Oligoasthenoteratozoospermi
- PBD** : Peptid Bağlanma Alanı
- PDI** : Protein Disülfid İzomeraz
- PERK** : Protein Kinaz RNA Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz
- RBM** : RNA Bağlanma Motifi
- SCOS** : Sadece Sertoli Hücreleri Sendromu
- SOD** : Süperoksit Dismutaz
- TNF** : Tümör Nekroz Faktörü
- TRAIL** : TNF İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
- UPR** : Katlanmamış Protein Yanıtı
- WHO** : Dünya Sağlık Örgütü
- XBP1** : X kutusuna bağlanan protein 1

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Erkek İnfertilitesi	6
2.1.1.İnsidans	6
2.1.2.Etiyoloji.....	7
2.1.3. Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri.....	7
2.1.4. Semen Genel Özellikleri	11
2.1.5. Semen Analizi	12
2.1.6.Oligoasthenoteratozoospermi (OAT).....	13
2.2. Erkek Üreme Sistemi ve Apoptozla İlişkisi	14
2.2.1. Erkek Üreme Sistemi	14
2.2.2 Spermatogenez	17
2.2.3. Apoptoz.....	21
2.3. Isı Şoku Proteinleri (HSPs)	28
2.3.1. HSP70	28
2.3.2.HSPA2	34
2.4.Endoplazmik Retikulum Stresi	35
2.5.Glukozla Düzenlenen Protein 78 kDa (GRP78)	38
3. MATERYAL-METOT	44
3.1. Materyal	44
3.1.1. Hastaların Seçimi	44
3.1.2. Örneklerin Hazırlanması	44
3.1.3. ELISA Kitinin Özellikleri.....	44
3.1.4. Kullanılan Diğer Materyaller	46
3.2. Metot	46
3.2.1. Optimizasyon Çalışmaları.....	46
3.2.2. ELISA Yöntemi İle GRP78 Konsantrasyon Tayini	48

3.3.3. İstatistiksel Değerlendirme	50
4. BULGULAR	51
4.1. Semen Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	51
4.2. Optimizasyon Sonuçları	56
4.3. ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi	59
5.TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR	80
EKLER	102
ÖZGEÇMİŞ	109

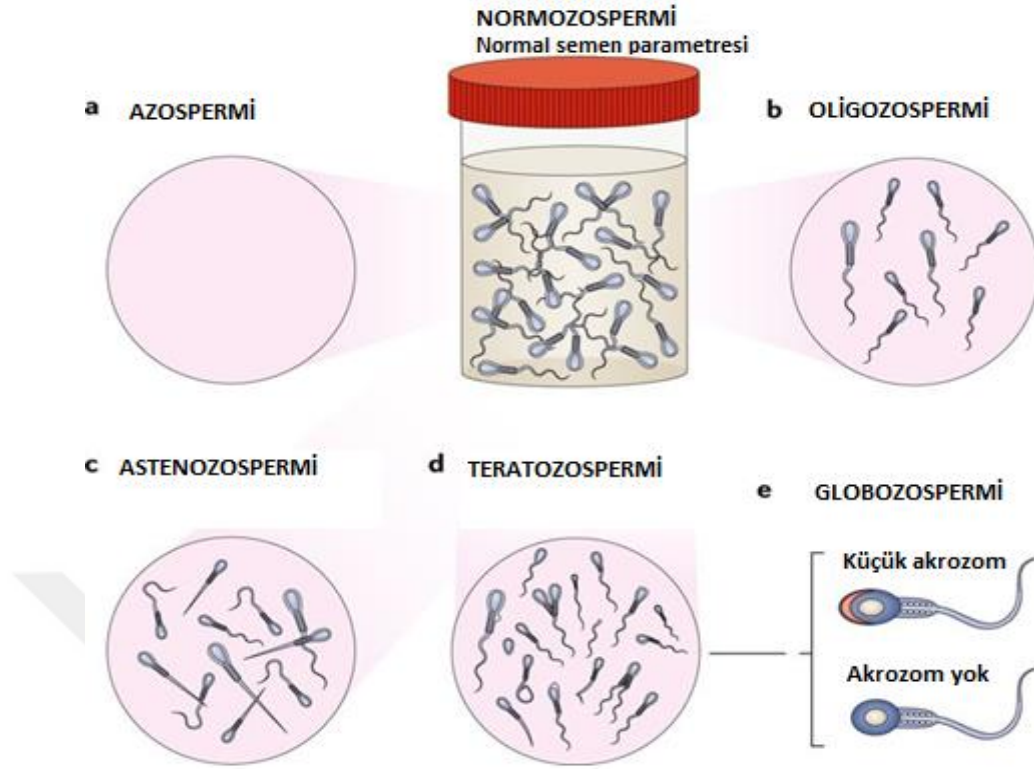


1.GİRİŞ

Birçok çift için doğurganlık, özel bir planlama ya da müdahale gerektirmeyen yaşamın doğal bir parçasıdır. Ancak çiftlerin %15-25'lik bir kısmı döllemenin gerçekleşmesi ve başarılı hamilelik şanslarını geliştirme konusunda tıbbi müdahaleye ihtiyaç duymaktadır. Çiftlerde herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması infertilite olarak tanımlanır. (Evers, 2002).

Günümüzde infertilite, çiftlerin yaklaşık %10-15'lik grubunu etkileyen önemli sağlık sorunlarından birini teşkil etmektedir. Erkek faktörleri bu sorunların %50'sinden sorumludur. Bu sorunların temeli konjenital olabileceği gibi ilerleyen dönemlerde sperm fonksiyonlarındaki değişime bağlı olarak da ortaya çıkabilmektedir (Krausz, 2011). Spermatogenik bozukluklar, toksinler, ilaçlar, testiküler sorunlar, kromozom anomalileri ve genetik defektler sperm fonksiyonunu etkileyen en temel sebeplerdendir (Gaur ve ark., 2010). Tüm bunlar üreme bozukluklarının nedenini belirtse de çoğu zaman esas mekanizma açıklanamadan kalır ve idiyopatik nedenli infertilite adını alır (Majzoub ve Agarwal, 2017).

Sperm fonksiyonlarının değerlendirilmesi için kullanılan yöntemlerden biri rutin semen analizidir. Semen analizi, spermatozoa ve seminal sıvı parametrelerinin betimsel ölçümlerini içerir ve semen kalitesini hesaplamaya yardımcı olur. Yapılan semen analiziyle, semenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra total sperm sayısı, sperm konsantrasyonu, morfoloji, canlılık, motilite gibi parametreler birlikte değerlendirilir. Oligozoospermi (düşük sperm konsantrasyonu), astenozoospermi (düşük sperm motilitesi) ve teratozoospermi (anormal sperm morfolojisi) gibi bozukluklar semen analizi ile belirlenir (Şekil 1). Semen analizi sonucunda sperm konsantrasyonu 15 milyon/mL'nin, progresif motil sperm yüzdesi %32'nin ve normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %4'ün altında olan hastalar oligoasthenoteratozoospermi (OAT) olarak adlandırılmaktadır (Cooper ve ark., 2010).



Şekil 1. Erkek infertilitesine bağlı seminal defektler a) azospermi: seminal plazmada hiç sperm bulunmaması b) oligozoospermi: sperm sayısının 15×10^6 mL'den az olması c) astenozoospermi: progresif sperm hareketliliğinin %32'nin altında olması d) teratozoospermi: sperm morfolojisinin %4'ten az olması e) globozoospermi: sperm baş kısmının yuvarlak olması (Esteves ve ark., 2018)

Hem kadın hem de erkek gonadları oogenez ve spermatogenez gibi son derece dinamik hücresel ve genetik değişiklikleri içermektedir. Bu durum çoğu zaman cinsiyet steroidleri, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. Ancak spermatogenez herhangi bir şekilde herhangi bir yolla bozulursa üreme hücreleri apoptoza gitme eğilimi gösterir (Guzel ve ark., 2017).

Memelilerde dişi ve erkek üreme hücrelerinin aşırı kaybının embriyonik ve fetal dönemde meydana geldiği tespit edilmiştir. Apoptoz en sık erken testis gelişiminde gözlenir ve spermatogenez sırasında sperm verimi türlere göre yaklaşık %25-75 arasında bir azalma göstermektedir (Sakkas ve ark., 2003).

Vücuttaki birçok dokuda olduğu gibi testisin seminifer tübüllerinde bulunan hücre sayısı, hücre proliferasyonu ile apoptotik hücre ölümü arasındaki dinamik dengeye göre belirlenir. Sertoli hücreleri testis içerisinde sınırlı sayıda üreme hücrelerini destekleme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle testislerde meydana gelen apoptoz sayesinde üreme hücrelerinin fazla miktarda üretilmesi önlenir. Ayrıca apoptoz; hasarlı spermlerin ve anomalili hücrelerin testiküler dokudan elimine edilmesini sağlamaktadır. Hücre ölümü ağırlıklı olarak pakiten spermatositlerde görülür ve FAS/FASL sisteminin bu sürecin en önemli medyatörü olduğu düşünülmektedir (Lee ve ark., 1997). İnfertil bireylerde testiste gerçekleşen hücre ölümünün araştırılması, gamet üretiminin kalitesi ve testiküler sorunların tedavisi açısından büyük önem taşımaktadır.

Stres dâhil çeşitli faktörlerin yol açtığı zararlı etkilere karşı, hücreler belirli savunma mekanizmaları geliştirir. Bu mekanizmalardan birinde görev alan ısı şoku proteinleri (HSP) hem patolojik hem de fizyolojik koşullar altında hücrelerin yaşamlarını sürdürmelerine yardımcı olan moleküler şaperonlardır (Helmbrecht ve ark., 2000). Bu ailenin en önemli üyesi olan HSP70, yeni sentezlenen veya yanlış katlanmış proteinlerin katlanmasında, protein agregasyonunun önlenmesinde, proteinlerin membran boyunca taşınmasında ve düzenleyici proteinlerin aktivitesinin kontrolünde büyük görev üstlenir (Daugaard ve ark., 2007). HSP70 ailesinin yapısal üyelerinden olan HSP70-2 ve HSC70-t'nin özellikle spermatogenik hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiş ve bozulan spermatogenez sonucu infertiliteyle ilgili olabilecekleri ileri sürülmüştür (Eddy, 1998).

Hücrede birçok önemli görevi bulunan endoplazmik retikulum (ER) aynı zamanda protein metabolizmasından sorumludur (Schroder ve Kaufman, 2005). Hücredeki reproduktif değişiklikler, ER'de kapsamlı protein sentezini, üretilen proteinlerin katlanmasını ve daha sonra uygun hücresel konuma getirilmesini gerektirmektedir (Guzel ve ark., 2017). ER'de proteinlerin katlanmasına yardımcı olan şaperonlar bulunur (Buck ve ark., 2007). ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimi sonucu ER'de bir stres (ER stresi) oluşur ve bu strese cevap olarak UPR (Katlanmamış Protein Cevabı) sinyal yolağı aktive edilir (Kaufman, 2002). Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6) ve inozitol gerektiren kinaz 1 (IRE1) UPR sinyal mekanizmasının başlıca üyeleridir (Zhang ve Kaufman, 2008). Yapılan birçok çalışma endometriyal döngü, oosit olgunlaşması, spermatogenez, döllenme ve embriyo

gelişimi gibi olaylarda UPR sinyal kaskadının rolü olduğunu göstermiştir (Guzel ve ark., 2017).

Hücrelerin ER stresine uyum sağlamaları için kullandıkları koruyucu mekanizma glikozla düzenlenen protein (GRP) ailesi üyelerinin aktivasyonu ile sağlanır (Lee, 2001). Glikozla düzenlenen protein 78 kDa, (GRP78, aynı zamanda BiP veya HSPA5), HSP70 süper ailesinin bir üyesidir ve mayadan insanlara kadar evrimsel olarak korunmuştur (Ni ve Lee, 2007). Bu protein, glikoz stresi olduğu durumlarda indüklenen kalsiyuma duyarlı bir şaperondur ve aynı zamanda anti-apoptotik protein olarak işlev görür. ER zarı üzerinde kaspaz-7 ve kaspaz-12 gibi prokaspazlarla kompleks oluşturarak stres koşulları altında hücre sağkalımında koruyucu rol oynar (Pfaffenbach ve Lee, 2011).

Erkek üreme sisteminde GRP78'in testis, epididim ve spermatozoada lokalize olduğu bilinmektedir (Lachanceve ark., 2010). Literatürde GRP78 ve erkek infertilitesi ile ilgili çok az sayıda çalışma mevcuttur ve bu çalışmalar genelde spermatozodaki GRP78 ekspresyonu üzerine yoğunlaşmıştır (Lobo ve ark., 2015).

Şaperonların işlevleri hakkındaki mevcut bilgilerin çoğu hücre içi fonksiyonları üzerinedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bu proteinlerin hücre dışında da bulunabildiğini ve burada spesifik görevler üstlendiğini göstermiştir. Hücre dışındaki şaperonların immünolojik reaksiyonlar, anjiyogenez ve belirli kanser türlerinin sağkalım için kullandığı yollarda görev aldığı düşünülmektedir. Ayrıca hücre dışında protein birikiminden kaynaklanan hastalıkların önlenmesi için ekstrasellüler şaperonlar yeni terapötik hedefler olarak önerilmektedir.

Seminal plazmada tanımlanmış, ısı şoku protein ailesinde yer alan proteinler içinde GRP78 seminal plazmada en çok bulunan şaperonlardan biri olarak tespit edilmiştir (Pilch ve Mann, 2006). Bu tez çalışmasının amacı, OAT teşhisi konulan infertil erkeklerde seminal plazmada bulunan GRP78 protein seviyesini ve bunun çeşitli sperm parametreleri ile arasındaki ilişkiyi belirlemektir. GRP78'in seminal plazmada hangi işlevi gördüğü, seminal plazmaya aktif olarak mı taşındığı veya spermatogenez esnasında doğal apoptotik süreç sonunda seminal plazmada pasif olarak mı biriktiği literatürde henüz araştırılmamış konular olarak yer almaktadır. Yine OAT sendromu kapsamında spermatojenik hücrelerde ER stres aktivasyonu olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada bu soruların kısmen cevaplanmasına yardım etmesi açısından literatürde ilk kez OAT sendromlu infertil

erkeklerde GRP78 seviyesinin seminal plazmada nasıl değiştiğinin araştırılması hedeflenmiştir.



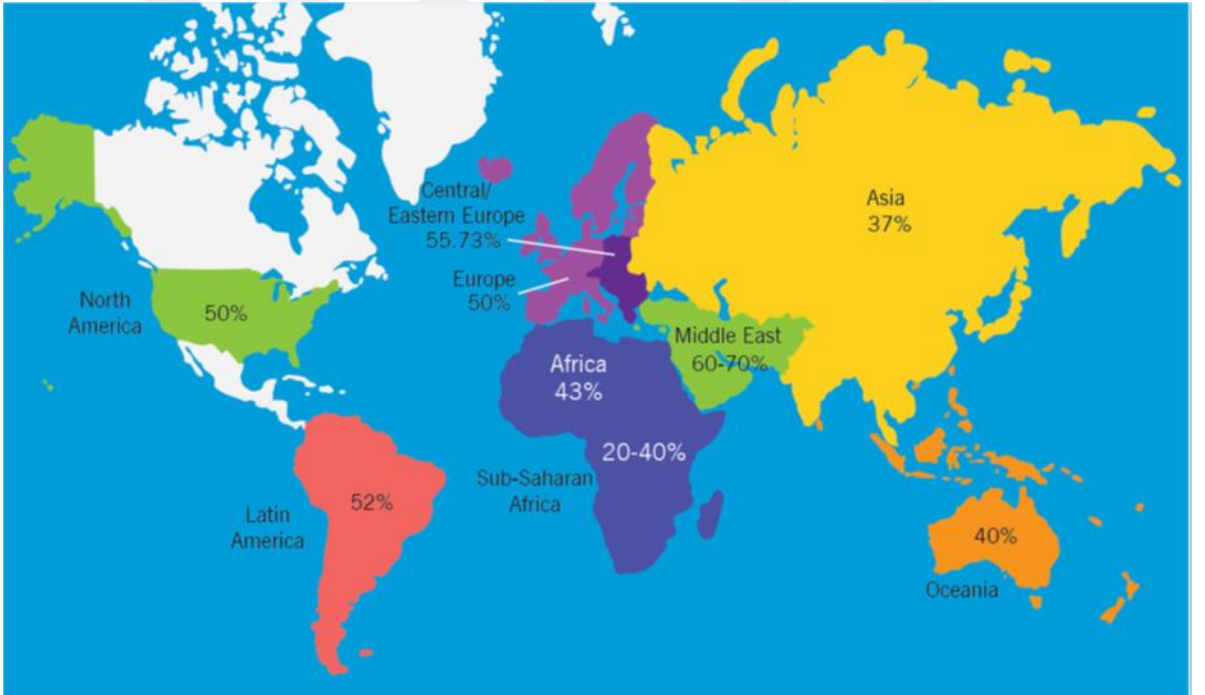
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek İnfertilitesi

2.1.1.İnsidans

Çiftlerde bir yıl ya da daha uzun süre içinde düzenli ve korunmasız ilişkiye rağmen spontan gebelik olmaması durumu infertilite olarak tanımlanır. Herhangi bir kontraseptif kullanmayan, cinsel yönden aktif çiftlerin %15-20'sinde gebelik görülmez (Sabanegh ve Agarwal, 2012) ve bunların yarısından çoğunda erkek faktörü sorumlu tutulmaktadır (Povey ve Stocks, 2010).

Günümüzde erkek infertilitesi, gelişmiş toplumlar başta olmak üzere, giderek artmakta olan kompleks bir üreme sağlığı sorunudur (Şekil 2) (Poongothai ve ark., 2009). 2010 yılında yapılan çalışmalarda küresel olarak tahmin edilen 48,5 milyon çiftin beş yıl denemesine rağmen çocuk sahibi olamadığı tespit edilmiştir (Mascarenhas ve ark. 2012; Borges, 2016). Şaşırtıcı ve endişe verici olan durum, demografik ve üreme sağlığı ile ilgili yapılan yaklaşık 300 araştırmanın sonucunda, gelişmekte olan ülkelerde her dört çiftten birinin infertil olduğu bildirilmiştir (Mascarenhas ve ark. 2012).



Şekil 2.Yapılan araştırmalar sonucu erkek faktörünün neden olduğu infertilite vakalarının ülkelere göre dağılımı (Agarwal ve ark., 2015)

2.1.2.Etiyoloji

İnfertilite oluşumunun etiyolojisi kromozomal anomaliler, mitokondrial DNA mutasyonları ve monojenik bozukluklar gibi genetik nedenlere bağlıdır (Aston ve Conrad, 2013). Bununla birlikte diyabet, obezite, hormonal hastalıklar (hipogonadotropik hipogonadizm), testiküler travma, varikosel, kriptorşidizm, genital sistem enfeksiyonları, ejakülatör bozukluklar, kullanılan ilaçlar, immünolojik nedenler ve cerrahi müdahaleler gibi faktörler de bu süreci önemli ölçüde etkilemektedir (Tablo 1) (Gaur ve ark., 2010).

Tablo 1. İnfertiliteye neden olan fizyolojik ve patolojik faktörlerin genel yüzdesi (Anwar S, 2016'dan uyarlanmıştır)

İnfertilite Nedeni	Yüzdesi (%)
İdiyopatik	30-45
İnmemiş testis	7-7,8
Ürogenital enfeksiyonlar	7-8
Cinsel ve/ veya ejakülatuar disfonksiyon	5-5,9
Sistemik hastalıklar	3-3,1
Varikosel	14-15,6
Hipogonadizm	8-8,9
İmmünolojik faktörler	3-4,5
Obstrüksiyonlar	1-1,7
Diğer	5-5,5

Ancak infertil erkeklerde bazı durumlarda bu faktörlerden hiçbirine rastlanmaz. Bu durum "idiyopatik nedenli erkek infertilitesi" olarak tanımlanır ve tüm vakaların yaklaşık %30-45'ini oluşturmaktadır (Majzoub ve Agarwal, 2017).

2.1.3. Erkek İnfertilitesinin Genetik Nedenleri

Erkek infertilitesinde kromozomal anomaliler ve Y kromozomu mikrolelesyonları spermatogenik yetmezliğin başlıca genetik nedenleri arasındadır (Gekas ve ark., 2001). Kromozomal anomaliler infertil erkeklerin %5'ini oluşturur ve azospermik olgularda bu oran %15'e yükselir (Tablo 2) (Ferlin ve ark., 2007). Anöploidiler infertil erkeklerde

kromozom anomalisinin en sık görülen çeşididir (Emery ve Carrell, 2006). Nonobstruktif azospermik (NOA) erkeklerde cinsiyet kromozomlarında anöploidi insidansı yüksektir (Palermo ve ark., 2002). Anöploidik vakalarda ise en sık görülen Klinefelter sendromudur (47, XXY) ve şiddetli oligospermik erkeklerde %5 oranında görülürken, azospermik erkeklerde bu oran %10'a kadar çıkmaktadır (Tablo 2) (Foresta ve ark., 2005). Bu sendrom genellikle spermatogenezin primer spermatosit aşamasında olgunlaşma duraklamasına (maturation arrest, MA) neden olmaktadır (Georgiou ve ark., 2006). Bununla birlikte infertiliteye sebep olan 47, XYY ve 46, XX kromozom sayısına sahip erkekler de infertil popülasyonda oldukça yaygındır (Gekas ve ark., 2001).

Kromozomal translokasyonlar ise genlerin kırılma noktalarında genetik materyal değişimine neden olan genetik defekti ifade eder (Dada, 2017). Otozomal translokasyonlar fertil erkeklere kıyasla infertil erkeklerde on kat fazla bulunmuştur (Esteves, 2013). İki akrosentrik kromozomun birleşmesiyle ortaya çıkan Robertsonian translokasyonları infertilitede en fazla görülen translokasyon tipidir ve %0,1-0,8 arasında infertiliteyi etkilemektedir (Ferlin ve ark., 2007). Oligospermik ve azospermik erkeklerde ise sırasıyla %0,6 (Johnson, 1998) ve %0.09 prevalansa sahiptir (Tablo 2) (Meschede ve ark., 1998).

Tablo 2. Erkek infertilitesine neden olan genetik anomalilerin normozospermi, azospermi ve oligospermi vakalarında görülme sıklıkları (O'Flynn O'Brien, 2010'dan uyarlanmıştır)

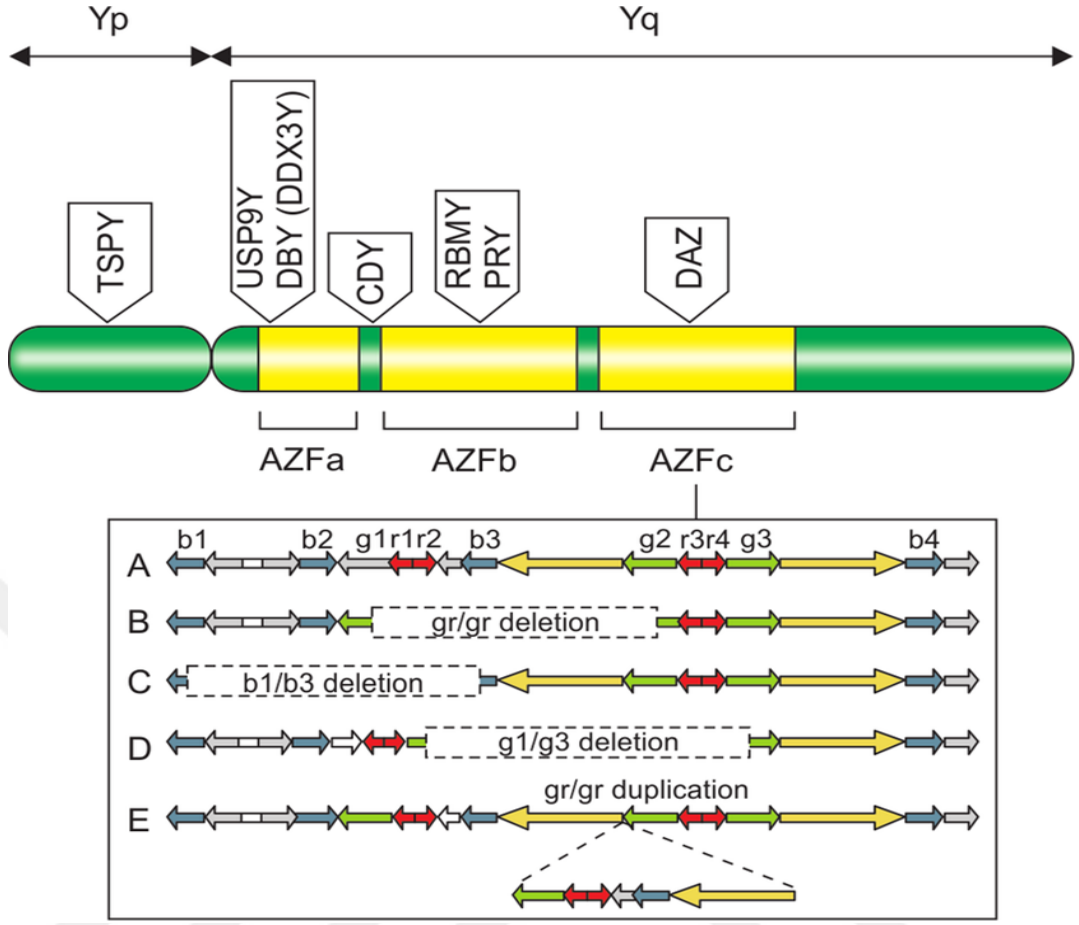
Genetik Neden	Normozospermi	Azospermi	Oligospermi
Kromozomal Anormallikler	%5	%15	-
Klinefelter Sendromu	-	%10	%5
Robertsonian Translokasyonu	%0,8	%0,09	%0,6
Y Kromozom Mikrodelesyonu	-	%10-15	%5-10
<i>AZFa</i> DELESYONU	-	%0,5-1	-
Sertoli-Cell Only Sendromu)			
<i>AZFb</i> DELESYONU	-	%0,5-1	-
(Spermatogenik Arrest)			
<i>AZFc</i> DELESYONU	-	%6-12	-
(Hipospermatogenez)			
KISMİ <i>AZFc</i> DELESYONU	-	%3-5	-

Y kromozomu mikrolelesyonları infertil erkeklerde sık görülen diğer bir genetik faktördür (Schlegel, 2004). Azospermik erkeklerde %10-15 oranında görülürken (Foresta ve ark., 2001) şiddetli oligospermik vakaların %5-10'luk kısmını oluşturur (Tablo 2) (Dohle ve ark., 2002). Mikrolelesyonlar en fazla Y kromozomunun uzun kolunda (Yq) görülür (Skaletsky ve ark., 2003) ve buradaki delesyonlar bozulan spermatogenezle yakından ilişkilidir (Krausz ve ark., 2003). Bu bölgede sperm gelişiminde rol alan genlerin yer aldığı azospermi faktör bölgesi (AZF) bulunur ve AZFa, AZFb ve AZFc olmak üzere üç alt bölge oluşturur (Vogt, 2005) (Şekil 3).

AZFa bölgesinde bulunan *DBY* ve *USP9Y* genleri spermatogenezle ilgili ana genlerdir (Şekil 3). *DBY* proteini testiste esas olarak premayotik üreme hücresi gelişiminde rol oynamaktadır. Bu genlerin her ikisinde meydana gelen delesyonlar Sadece Sertoli Hücresi Sendromuna (SCOS) neden olur. Bu durum testislerde seminifer epitelde sadece Sertoli hücrelerinin oluşmasına buna rağmen üreme hücrelerinin üretilmemesine neden olur (Ferlin ve ark., 2007).

AZFb bölgesinde meydana gelen delesyonlar spermatogenezin primer spermatosit aşamasında tutuklanmaya (MA) neden olur (Ferlin ve ark., 2007). Bu bölgedeki ana gen *RBM*'dir (Şekil 3) ve altı kopyası bulunur (Skaletsky ve ark., 2003). Bununla beraber *PRTY* genleri de AZFb bölgesinde bulunur ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Vogt, 2005). Bu bölgedeki genlerin delesyonu hipospermatogenezle ilişkilendirilir (Ferlin ve ark., 2003).

AZFc bölgesindeki delesyonlar ise birçok fenotip oluşturur (Vogt, 2005). Bu bölgedeki delesyonlar NOA erkeklerde yaklaşık %12 oranında görülürken şiddetli oligospermik erkeklerde ise %6 oranında görülmektedir (Kuroda-Kawaguchi ve ark., 2001). Bu bölgede bulunan ana gen *DAZ* genidir (Şekil 3) ve dört kopyası bulunmaktadır. Spermatogenezin birçok aşamasına hizmet eden bu genler bütün üreme hücrelerinde eksprese edilmektedir (Reynolds ve Cooke, 2005).



Şekil 3. AZF bölgesinin şematik gösterimi. Üst (yeşil-sarı renkli) kısım AZF bölgelerini ve AZF ile ilişkili genleri gösteren Y kromozomunun görüntüsüdür. Altta ise AZFc bölgesinin mikrodelesyonları görülmektedir. (A) Normal AZFc bölgesi (B) gr/gr delesyonu (C) b1/b3 delesyonu (D) g1/g3 delesyonu (E) gr/gr duplikasyonu (O'Flynn O'Brien ve ark., 2010)

Erkek faktörü infertilitesinde birçok otozomal gen de rol oynar (Tablo 3). 7. kromozom üzerinde bulunan *CFTR* geni (Moghbelinejad ve ark., 2018), vas deferens konjenital bilateral yokluğu (CBAVD) olan hastaların %60-%90'ında mutasyona uğrar (Ferlin ve ark., 2007). Bununla beraber birçok X'e bağlı gen testiste eksprese edilmektedir (Wang ve ark., 2001). Androjen reseptörü geni (*AR*), X kromozomunun uzun kolunda yer alır (Nutti ve Krausz, 2008) ve spermatositlerden spermatid oluşum aşamasında rol oynar (De Gendt ve ark., 2004). İnfertilite ile ilgili yapılan çalışmalarda *AR* geninde meydana gelen mutasyonların Androjen Duyarsızlığı Sendromuna yol açtığı (Ferlin ve ark., 2007) ve vakalarda %2 oranında oluştuğu gösterilmiştir (Ferlin ve ark., 2006).

Tablo 3. Erkek infertilitesinde en sık görülen tek gen kusurlarının oluşturduğu fenotipler ve prevalansları (Brugo-Olmedo S, 2001'den uyarlanmıştır)

Patoloji	Prevalans	Fenotip	Genotip
Kallman Sendromu	1/30000	Azospermi ve Oligospermi	X'e Bağlı Resesif
Kistik Fibroz	1/2500	Obstruktif Azospermi	Otozomal Resesif
Hareketsiz Silia Sendromu	1/30000	Hareketsiz Sperm	Otozomal Resesif
Miyotonik Distrofi	1/8000	Testiküler Atrofi	Otozomal Dominant
Androjenik Duyarsızlık	1/60000	Testis Anomalileri	X'e Bağlı Resesif
Renal Polikistik Hastalık	1/800	Çoklu Epididimis Kistleri	Otozomal Dominant
Usher Sendromu	1/30000	Spermatik Aksonemal Defektler	Otozomal Resesif

2.1.4. Semen Genel Özellikleri

Seminal sıvı; spermatozoa için güvenli bir ortam sağlamak ve dışı üreme yolunda spermatozoanın ilerleyebilmesi için gerekli bileşenleri içermektedir. Seminal sıvı; sperm hücreleri dışında prostat, epididimis, seminal vezikül, vas deferens, cowper ve üretral bezlerden gelen çeşitli oranlardaki salgılardan oluşur. Semen visköz yapıda, nötral veya hafif alkali olup; seminal plazmanın pH'sı 7,2- 7,8 arasındadır (WHO, 2010). Bu pH dengesi vajinanın asidik ortamından spermatozoayı koruyan tamponlama özelliklerine sahiptir. Semen hacmi normal bireylerde 1,5-5 ml arasında değişiklik gösterir. Toplam hacmin %1'den azı spermatozoaya aittir ve kalan kısım seminal plazmadan oluşur (Juyena ve Stelletta, 2012). İnsan seminal plazmasının ortalama protein konsantrasyonu 35 ila 55 g/l arasında değişir. Yapılan bir çalışmada tek bir kişiden elde edilen seminal plazmada yaklaşık 923 farklı protein tanımlanmıştır (Pilch ve Mann, 2006).

2.1.5. Semen Analizi

Son yirmi yıldır araştırmacılar ve klinisyenler temel semen analizi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine güvenmektedir (Tablo 4). Bununla beraber normal semen analizi ölçüm kriterleri hala tartışma konusudur. Rutin semen analizi aslında spermin birkaç özelliği hakkında fikir verse de erkek fertilité başarısı sadece bu sonuçlara göre belirlenememektedir. Laboratuvar prosedürlerine belirli bir standart sağlamak için WHO, 1980’de insan spermi ve semen-mukus etkileşimi için bir kılavuz yayınlamış ve bu kılavuz düzenli olarak güncellenerek en son 2010 yılında 14 ülkede, 4500 erkekle yapılan değerlendirme sonucu içeriği büyük ölçüde değiştirilmiştir (Cooper ve ark., 2010).

Tablo 4. WHO’nun 2010 yılında yayınladığı semen parametrelerinde kabul edilen alt referans değerler (WHO, 2010’dan uyarlanmıştır)

Referans Değerler	WHO (2010)
Semen hacmi (ml)	1.5 (1,4-1,7)
Total sperm sayısı (10^6 ejakülat)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 /ml)	15 (12-16)
Total motilité (%)	40 (38-42)
Progresif motilité (%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı spermatozoa, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar /%)	4
PH	7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (10^6 /ml)	< 1.0

İnfertilite değerlendirmesi; temel nedeni belirlemede, geri dönüşlü koşullarda tedavinin doğal seyrinin yönlendirilmesinde ve geri dönüşü olmayan koşullarda çiftlere gecikmeden yardımcı üreme seçeneklerini kullanma fırsatı sunmada oldukça önemlidir (Nallella ve ark., 2006). Semen analizi infertilite değerlendirmesinin ilk ve en önemli basamağı olmakla birlikte fiziksel muayene, hormonal değerlendirme, sperm fonksiyon testleri ve genetik analizler birlikte düşünöldüğünde sorunun asıl kaynağını bulmaya yardımcı olmaktadır (Mayorga-Torres ve ark., 2017).

İnfertilite teşhisi için tam değerlendirme sonrası en az iki semen analizinin yapılması gerekmektedir. Bir semen örneğinin makroskopik özellikleri hacim, görünüm,

renk, koagülasyon/sıvılaşma ve viskozitesi olmakla beraber mikroskopik özellikleriyse sperm konsantrasyonu, motilite, vitalite (canlılık) ve morfolojidir (De los Rios ve ark., 2004).

En temel değerlendirmeler makroskopik ve mikroskopik incelemeler olsa da tek başına semen analizi fertil ya da infertil erkekleri ayırt etmek için yeterli değildir (Bonde ve ark., 1998). Bu nedenle sperm fonksiyonu dışında özellikle kusurlu kromatin paketlenmesi, apoptoz, oksidatif stres, DNA fragmentasyonu ve anöploidi gibi sperm DNA değişikliklerinin de incelenmesi gerekmektedir (Brown ve ark., 2013; Omran ve ark., 2013).

Sperm sayısı; ejakülatta bulunan spermin miktarını ve konsantrasyonunu belirlemektedir ve bu değerler üreme kapasitesi ile yakından ilişkilidir. Sperm konsantrasyonunun 15 milyon/ml'den az olması durumu oligozospermi, seminal sıvıda hiç sperm bulunmaması azospermi, hiç ejakülat bulunmaması durumu ise aspermi olarak adlandırılır (Tablo 5). Üreme kliniklerine başvuran erkeklerin yaklaşık %30'unu etiyojisi bilinmeyen idiyopatik oligospermi ve azospermi vakalarının oluşturduğu tespit edilmiştir (Smith ve ark., 1977; Bostofte ve ark.,1990; Boivin ve ark., 2007).

Sperm motilitesi spermatazoanın oosite ulaşabilmesi için gereklidir çünkü spermin servikal mukustan hızlı bir şekilde ilerlemesi motilitesine bağlıdır. (Bjorndahl, 2010).

Spermin morfolojisi ise akrozom reaksiyonu ve oositin zona pellusidine bağlanma kabiliyeti de dâhil olmak üzere birçok fonksiyonunu ciddi olarak etkilemektedir (Menkveld ve ark., 2003).

2.1.6.Oligoasthenoteratozoospermi (OAT)

Oligoasthenoteratozoospermi terimi; oligozoospermi, astenozospermi ve teratozoospermi olmak üzere 3 faktörün hepsinin bulunduğu durumlarda kullanılmaktadır (Cavallini, 2006). Dolayısıyla semen analizi sonucunda sperm konsantrasyonu 15 milyon/mL'nin, progresif motil sperm yüzdesi %32'nin ve normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %4'ün altında olan hastalar OAT olarak tanımlanır (Tablo 5). İdiyopatik OAT, tüm olguların %30-40'ını etkilemekte ve oksidatif stres veya hormonal faktörler dâhil olmak üzere çeşitli nedenlerden dolayı oluşabilmektedir. Genel olarak; yaş, post-testiküler organlardaki fonksiyonel değişiklikler, enfektif ajanlar, gamet genomundaki değişiklikler,

mitokondrial değişiklikler ve çevre kirleticileri idiyopatik OAT'ın olası nedenleri olarak kabul edilmektedir. (Cavallini, 2006).

Tablo 5. WHO kriterlerine göre oluşan semen analizi sonuçlarının terminolojisi (WHO, 2010'dan uyarlanmıştır)

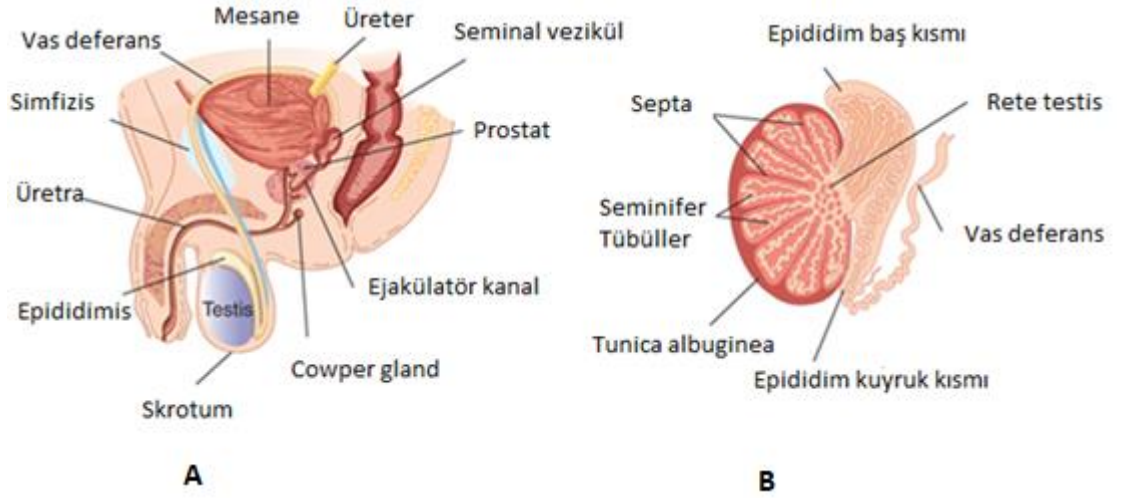
Normozoospermi:	Normal sperm
Oligozoospermi:	Sperm konsantrasyonunu 15 milyon/ml 'nin altında olması
Astenozoospermi:	İleri doğru hareketli sperm oranının %32'nin altında olması
Teratozoospermi:	Normal morfolojiye sahip sperm %4'ün altında olması
Azospermi:	Ejakülatta hiç sperm bulunmaması
Aspermi:	Ejakülat olmaması
Lökospermi:	Ejakülatta referans değerden fazla lökosit bulunması

2.2. Erkek Üreme Sistemi ve Apoptozla İlişkisi

2.2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi testisler, kanal sistemi (epididim, duktus deferens, boşalma kanalları ve üretra dahil), yardımcı aksesuar bezler (seminal veziküller, prostat ve burbourethral bezleri), skrotum ve penis gibi destekleyici yapılar dahil olmak üzere birçok organ içermektedir (Goldstein ve Schlegel, 2013). İnsan testisleri, güçlü bağ dokuyula örtülü skrotumlarda yer alan, 5 cm uzunluğunda ve 2.5 cm çapında olan bir çift organdır (Şekil 4) (Akhmerova, 2006). İnsan testiküler sıcaklığı fizyolojik olarak 32-35°C aralığında tutulur. Skrotumdaki testislerin yeri, vücudun geri kalanından nispeten daha serin bir ortamda bulunmaktadır (Mieusset ve Bujan, 1995). Fetal yaşamın erken döneminde testisler karın boşluğunda bulunurken doğumdan önce skrotuma iner (Akhmerova, 2006).

Üç ayrı katmandan oluşan bir kapsül yapısı, testisin parankimini çevreler ve bunlar tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vaskulosa olarak adlandırılır. Testis, tunica albuginea'nın çıkıntıları olan septa ile bölmelere ayrılır (Agger,1971).



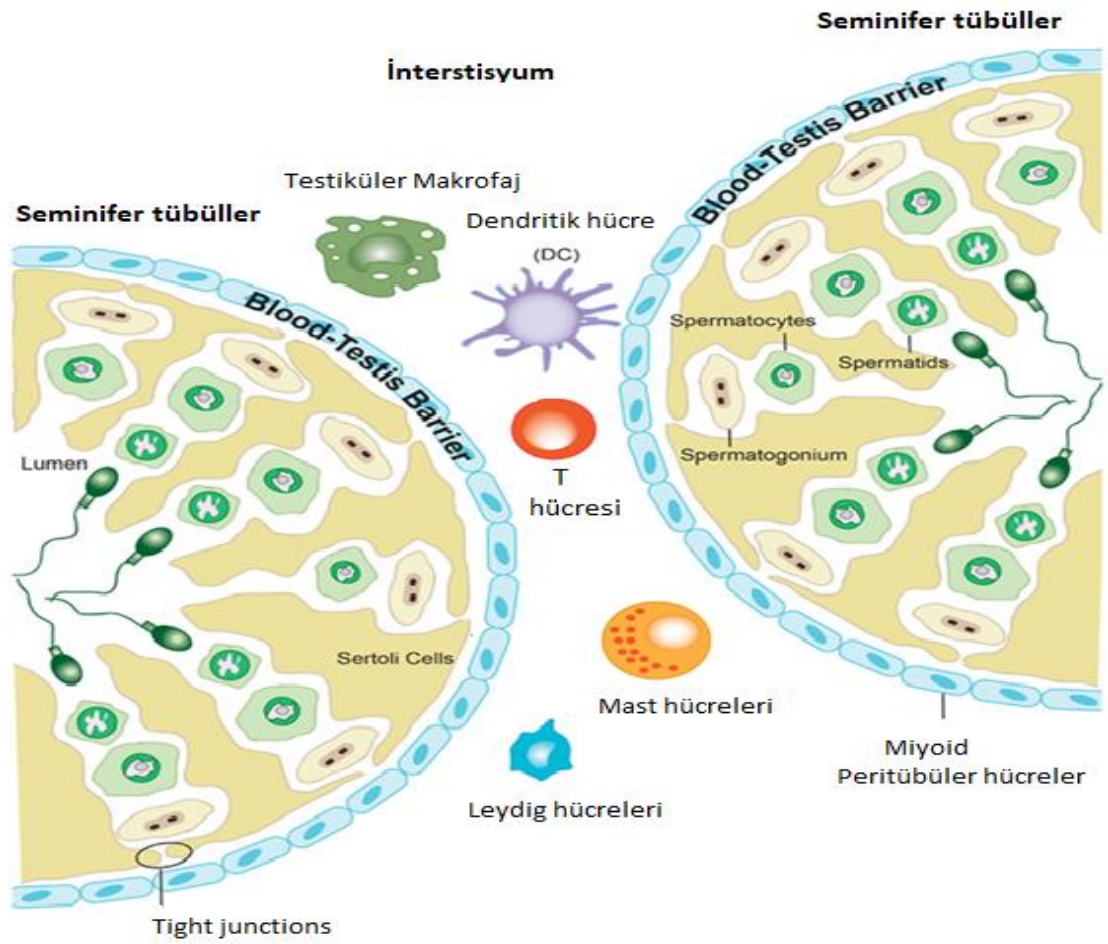
Şekil 4. Erkek üreme sistemi. (A) iç ve dış genital organların anatomik yapısı (B) testis içindeki kanal sisteminin bir kesiti (Drabovich ve ark., 2014)

Her septum, seminifer tübüllerin yanı sıra Leydig hücreleri, kan damarları, lenfatikler, mast hücreleri, sinirler ve makrofajlardan oluşan interstisyel dokuyu ayırır (Fawcett, 1973). Testisler; her biri yaklaşık 180 µm çapında 350-380 arasında seminifer lobu içermektedir. Testislerin %70-80'i seminifer tübüllerden kalan %20-30'luk kısmı interstisyel alandan oluşur. Testislerde bulunan seminifer tübüller, üreme hücrelerinin üretildiği alandır ve içinde Sertoli hücrelerini, üreme hücrelerini ve peritübüler miyoid hücreleri barındırmaktadır (De Kretser ve ark., 1998; Elzanaty ve ark., 2002).

Leydig hücreleri; testisin interstisyel bölümünde konumlanan, yuvarlak şekilli ve belirgin nükleusa sahip hücrelerdir (Şekil 5). Çok sayıdaki geçit bağlantıları (gap junctions) Leydig hücreleri arasındaki iletişime izin verir. Leydig hücreleri androjen steroid üretiminden doğrudan sorumludur. Aynı zamanda bu hücrelerin fonksiyonu, hipofiz hormonları ile seminifer tübülden salgılanan parakrin faktörler tarafından düzenlenmektedir (Kaler ve Neaves, 1978).

Sertoli hücreleri; bazal membran ile bağlantı kuran, seminifer tübül duvarını oluşturan epitelyal kökenli somatik hücrelerdir ve temel işlevi spermatogenezin çeşitli aşamalarında üreme hücrelerini desteklemektir. Düzensiz şekilli nükleusa sahip bu hücreler üreme hücreleriyle bağlantı kurmak için gerekli sıkı bağlantıları (tight junction) içerir (Şekil 5). Üreme hücrelerinin tübül lümenine doğru göç etmesinde fiziksel bir tabaka

görevi görür ve üreme hücrelerinin olgunlaşması için gereken mikroçevreyi yaratır (Murphy ve Richburg, 2014). Bununla beraber Sertoli hücreleri, içinde bulunan sıkı bağlantılar sayesinde kan-testis bariyerini oluşturarak sperm bağışıklık sistemi reaksiyonlarından korur. Bu bariyer bitişik Sertoli hücreleri arasında bazal ve adluminal olarak adlandırılan iki bölme oluşturur. Sıkı bağlantıların altında bulunan bazal lamina dolaşım sistemiyle temas halindedir. Bu bağlantılar belirli zamanlarda açılarak spermatositlerin mayoz sonrasında adluminal bölgeye ilerlemesine izin verir (Johnson ve ark., 1998).



Şekil 5. Seminifer tübüllerin ve interstisyel hücrelerin şematik gösterimi (Redgrove ve McLaughlin, 2014)

Seminifer tübüller testis içerisinde kanallar halinde bir ağ oluşturur ve bu kısma rete testis adı verilir. Spermiler rete testis yoluyla epididim başına iletilir. Ayrıca testis ile epididim başı arasında 6-8 adet efferent kanal bulunmaktadır (Bedford, 1994).

Epididim; her iki testisin arka kenarı boyunca uzanan yaklaşık 4 cm uzunluğunda bir organdır. Epididim kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç ana bölgeye ayrılır. Bu bölgelerde spermiler testisten vas deferansa geçmeden önce döllenme yeteneği kazanır (De Kretser ve ark., 1998). Epididimis sperm olgunlaşması, sperm taşınması ve sperm depolanmasında görev almaktadır (Bedford ve ark., 1973). İnsanlarda sperm ana depo bölgesi kauda epididimidir. Ayrıca spermilerin epididimde olgunlaşma süresi yaklaşık 2-12 gün arasında değişmektedir (Souza ve ark., 2017).

Epididim sıvısı; olgunlaşma için sperm tarafından kullanılır ve epididimis içindeki sıvı ortam plazmadan büyük ölçüde farklıdır (Elzanaty ve ark., 2002). Epididimis aynı zamanda katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktaz (GRD) gibi antioksidan enzimlerle spermatazoayı oksidatif saldırıdan korumaktadır (Potts ve ark., 1999). Epididimis duvarındaki düz kaslar spermi peristaltik hareketlerle vas deferense iter. Burada spermiler prostat, seminal vezikül ve bulbouretral gibi aksesuar bezlerden gelen salgılarla karışır (Elzanaty ve ark., 2002).

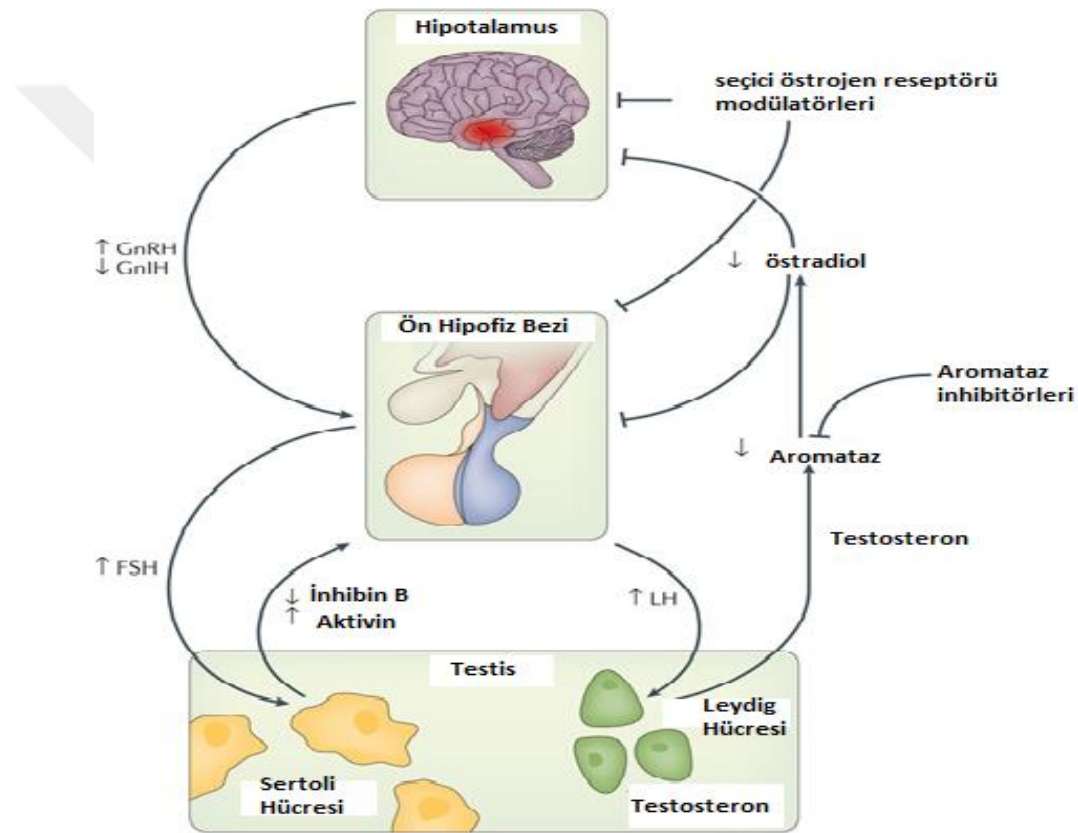
Seminal vezikül; sperm enerjisi için gerekli fruktozu ve peristaltik hareketler için gerekli prostoglandinleri içerir ve seminal vezikül salgıları semenin yaklaşık %60'lık kısmını oluşturmaktadır (Curry ve Atherton, 1990). Prostat sıvısı alkali çözelti olup %20'lik kısmı içerirken, bulbouretral bezler ise üreme yollarının asidik ortamını nötralize etmek için gerekli fosfat ve bikarbonat tamponları içermektedir (Lilja ve ark., 1987).

2.2.2 Spermatogenez

Memeli testislerinin normal fonksiyonu endokrin, parakrin ve otokrin yollara etki eden bir dizi hormonal haberciye bağlıdır. Bu haberciler sadece testis gelişimi için değil aynı zamanda erkek üreme hücrelerinin fonksiyonu için de gereklidir (Holdcraft ve Braun, 2004). Spermatogenez, hipotalamusta hormonal kontrollerle başlatılır. Hipotalamus, gonadotropin salgılatıcı hormonu (GnRH) salgılayarak lüteinleştirici hormonun (LH) ve folikül uyarıcı hormonun (FSH) hipofiz bezinin ön lobundan salınmasını tetikler (Şekil 6) (Wu ve ark., 2007).

LH, interstisyumun Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretilmesini uyarır (Wahlstrom ve ark., 1983). FSH ise, Sertoli hücrelerinde spermatozit olgunlaşmasını sağlar (Şekil 6) (Heckert ve Griswold, 2002).

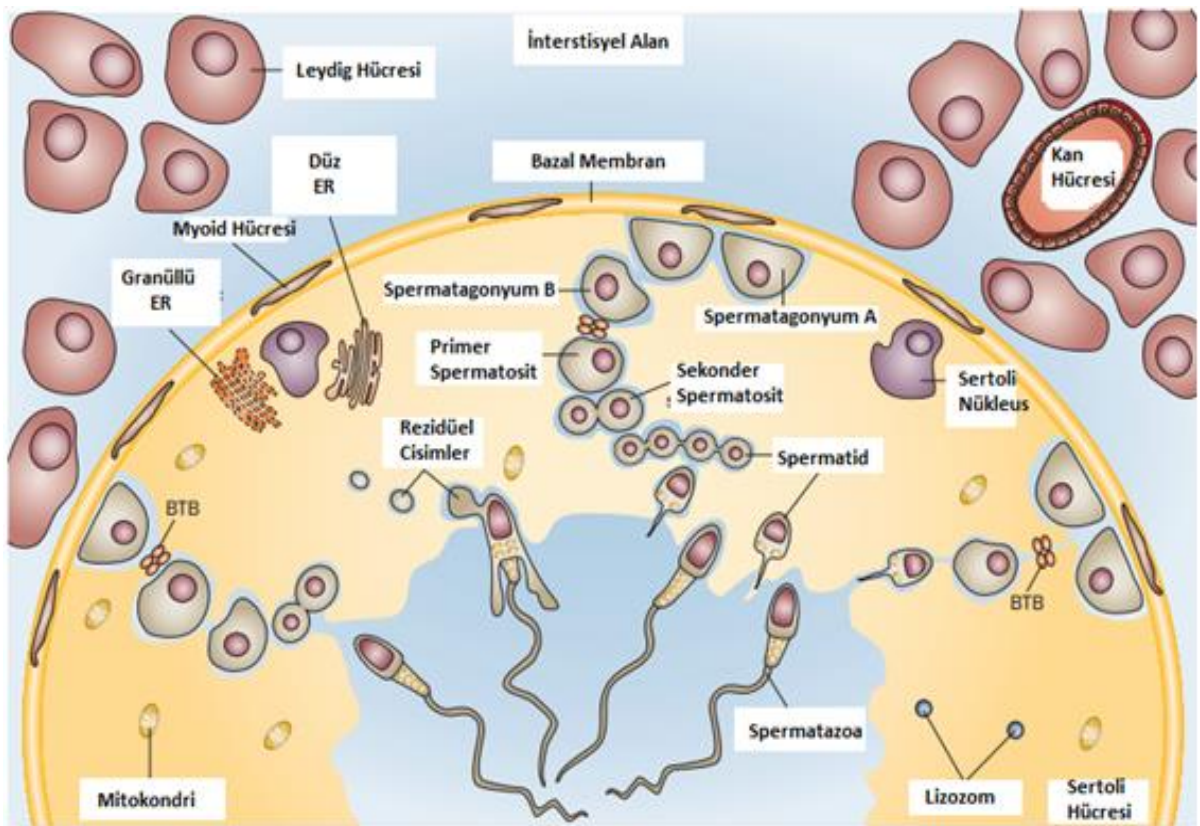
Bunlara ek olarak testosteron, dihidrotestosteron ve östrojen de testiste spermatogenezi düzenleyen öncül hormonlardır. Gelişimin erken evrelerinde östrojen, androjen baskılanmasından sorumludur. Ergenlik dönemine gelindiğinde Sertoli hücre farklılaşması sırasında, östrojen seviyeleri minimum seviyelere düşerek androjen üretime olanak tanır (Lubahn ve ark., 1993).



Şekil 6. Hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen. Ön hipofiz hormonlarının (LH ve FSH) dengesi gonadotropin uyarıcı hormonun (GnRH) salınımı ile uyarılır ve gonadotropin inhibe edici hormonun (GnIHH) salgılanması ile inhibe edilir. İnhibin B, FSH'ye cevap olarak testiküler epitel (öncelikle Sertoli hücreleri) tarafından salgılanır ve ardından negatif geri besleme döngüsünde ön hipofizde etki ederek FSH üretimini inhibe eder. Activin, FSH'nin hipofiz sekresyonunda agonistik bir etkiye sahiptir ve serbest bırakılması inhibe B ile inhibe edilir. Aromataz inhibitörleri, testosteron: östrojen oranını düzeltmek için kullanılır (Kathrins ve Niederberger, 2016)

Spermatogenez; çok karmaşık bir süreç olmakla birlikte esasen spermatogonyum adı verilen diploid hücrenin, spermatozoa adı verilen farklılaşmış bir haploid hücreye dönüşümünü içermektedir. Bu süreç mayoz ve mitoz bölünmelerle gerçekleşmekte ve günlük 200×10^6 spermatozoa oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Sakkas ve ark., 2003).

Seminifer tübülde üreme hücreleri bazal membrandan lümene doğru sıralı halde bulunur. Spermatogonyum ve genç spermatisitler seminifer tübüllerin bazal tabakasında sıralanırken, olgun spermatisitler ve spermatidler adluminal kompartmanda yer almaktadır (Şekil 7) (Griswold, 2016)

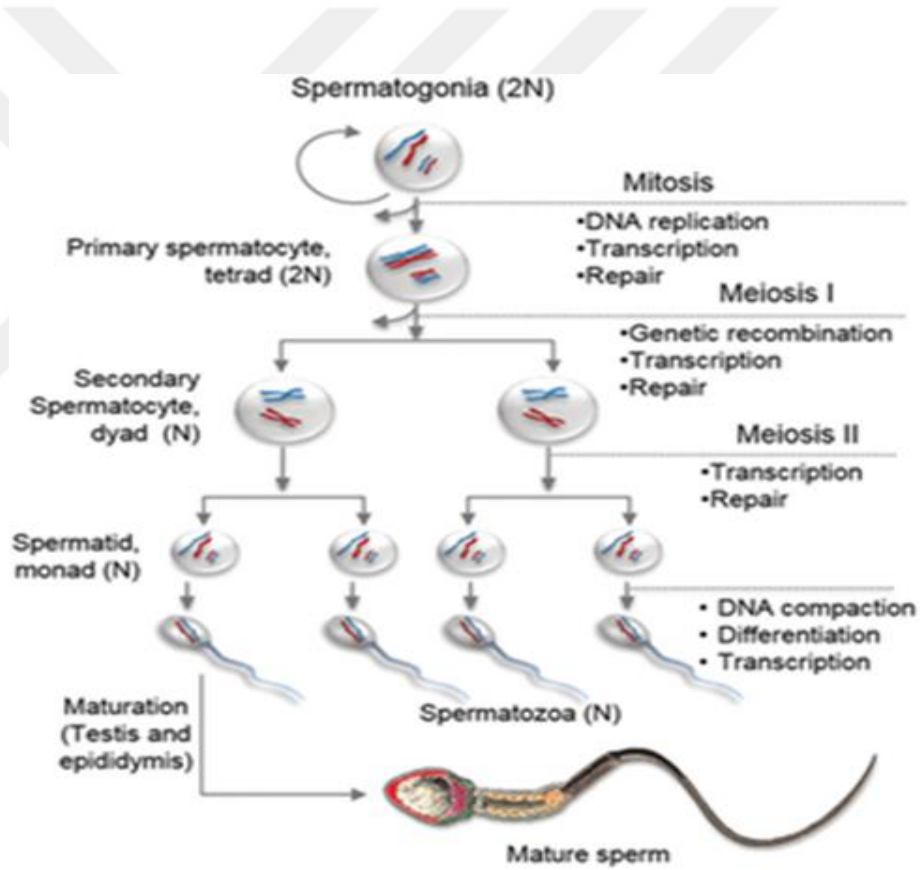


Şekil 7. Spermatogenez. Diploid spermatogonial kök hücrelerden haploid germ hücreleri üreten hücresel bölünme ve dönüşüm süreçlerini içerir. Destekleyici Sertoli hücreleri, spermatogonia'nın da yapılandırıldığı bazal membrana yapışır. Tip A spermatogonyumlar bölünüp gelişerek tip B spermatogonyumlara dönüşür. Spermatogonyalardan başlayan süreç sperm oluşuyla sonuçlanır ve sperm lümene salınır. BTB: kan-testis bariyeri (Rato ve ark., 2012)

Spermatogenezin başlangıç aşamasında diploit spermatogonyal hücreler mitoz bölünmeyle birincil spermatisitleri oluşturur. Sertoli hücrelerinin bazal bölmesinde

bulunan birincil spermatositler mayoz I geçirerek ‘‘spermatositogenez’’ adı verilen bir süreçle ikincil spermatositleri üretir ve bu aşamada hücreler benzersiz bir genetik kimlik kazanır. İkincil spermatositler ise mayoz II yoluyla spermatidleri oluşturur. Oluşan spermatidler ise kromatinin yeniden düzenlenmesi gibi nükleer dönüşümler geçirerek ‘‘spermiyogenez’’ ile spermatazoaları meydana getirir (Şekil 8) (Inoue ve ark., 2014).

Oluşan spermatazoalar Sertoli hücrelerinin seminifer tübül lümeninden çıkarak olgunlaşması için epididimise gönderilirler. Burada spermatazoalar motilite ve akrozomal fonksiyon kazanır ve bu olay yaklaşık 64 gün sürer. İnsanlarda spermatogenez puberte (ergenlik) döneminde başlar ve bireyin yaşamı boyunca devam eder (Roosen-Runge ve Holstein, 1978).



Şekil 8. Memeli spermatogenezinde hücresel, genetik ve epigenetik değişiklikler (Rahman ve ark., 2017)

Tüm spermatogonyalar bu süreçte spermatazoaya dönüşmez ve çoğu apoptoz denilen bir süreçle yok edilir. İnsanlarda normal spermatogenez sırasında meydana gelen hücre ölümünün, potansiyel sperm sayısının %25-30'a kadar kaybıyla sonuçlandığı tahmin edilmektedir (Aitken ve ark., 2011). Testislerde üreme hücrelerinin klonal gelişimi çok yüksek seviyede gerçekleşmektedir, böylelikle apoptoz; üreme hücre popülasyonunu Sertoli hücrelerinin destekleyebileceği sayıya sınırlamaktadır (Sinha Hikim ve Swerdloff, 1999).

2.2.3. Apoptoz

Apoptoz veya programlı hücre ölümü, çok hücreli organizmaların normal gelişimi sırasında meydana gelmekte ve yetişkin hayatı boyunca kontrollü bir şekilde devam etmektedir (Lue ve ark., 1999). Apoptozun embriyonik ve patolojik süreçlerde gerçekleşmesi birçok hastalığın etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Elmore, 2007). İki temel yolak ile kontrol edilen apoptoz, hücreden gelen iç ve dış sinyaller vasıtasıyla gerekli olan yolağı aktifleştirerek organellerde ve hücre içi organizasyonda değişiklikler meydana getirmektedir (Igney ve Krammer, 2002). Ekstrinsik ve intrinsik yolaklarla kontrol edilen apoptozun en önemli medyatörleri kaspazlardır ve temelde başlatıcı ve öldürücü olmak üzere ikiye ayrılır. Kaspaz -2,-8,-9 ve -10 üyeleri başlatıcı kaspazlar, kaspaz -3,-6 ve -9 öldürücü kaspazlar olarak adlandırılmaktadır (Cohen, 1997).

Ekstrinsik yolakta hücre yüzeyinde bulunan ve ölüm reseptörü olarak bilinen reseptörler görev almaktadır. Bu reseptörler genellikle hücre yaşlanması, radyasyon, hipoksi gibi yollarla uyarılır. Ölüm reseptörlerinin en iyi bilinen iki üyesi TNF-alfa ve FAS reseptörleridir (Wong, 2011). Bu reseptörlerin bir ucu hücre membranına tutunmuş halde iken diğer ucu ise hücre dışında lokalize olur. Hücre içinde bulunan kısmında prokaspaz -8 ile aktifleşmesini sağlayan bir domain bulunmaktadır (Schneider ve Tschopp, 2000). Bunların yanı sıra TRAIL ve TRAIL reseptörleride benzer yolaklarla apoptozu uyarabilmektedir (Şekil 9) (Lavrik ve ark., 2005).

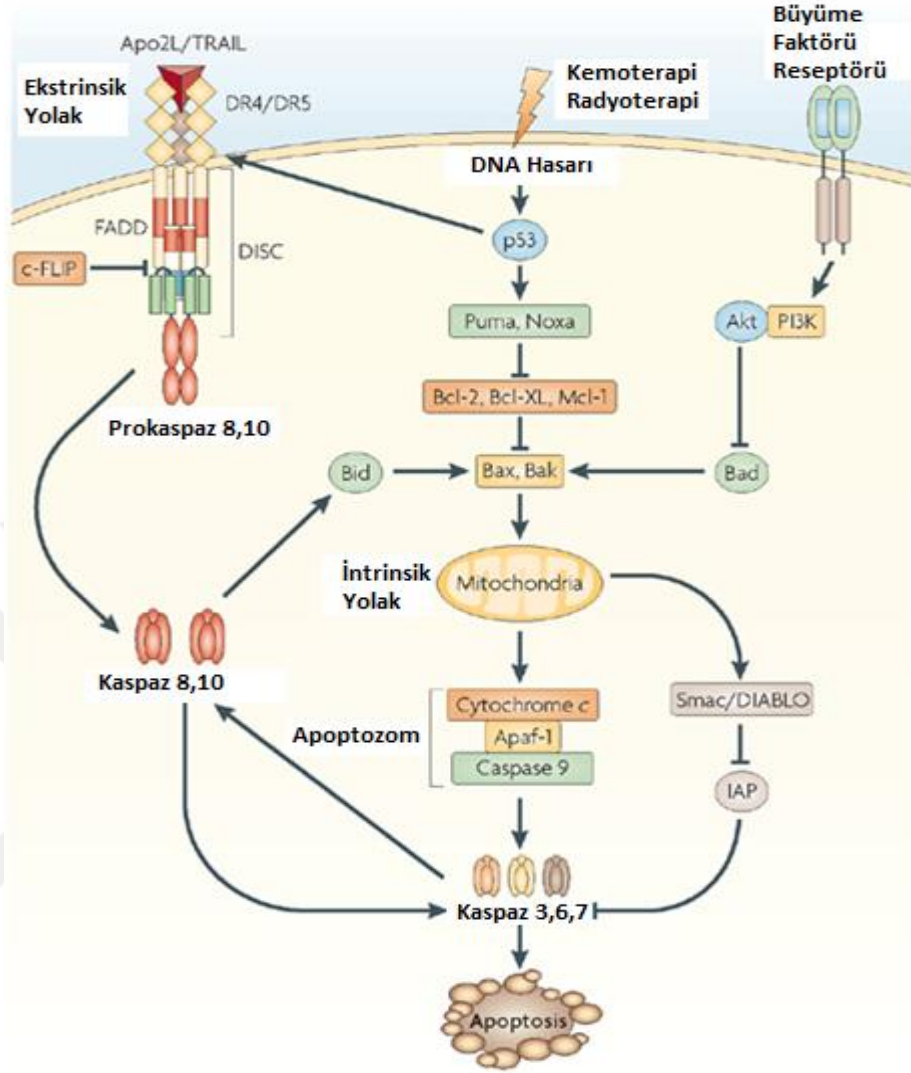
İntrinsik apoptoz yolağında ise mitokondri görev alır. Mitokondri dış zarının geçirgenliğinin artması sonucu sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve SMAC gibi proteinler sitoplazmaya geçer. Sitokrom c inaktif halde bulunan apoptotik proteaz aktive eden faktöre (Apaf-1) bağlanarak apoptozomu oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'un aktifleşmesini sağlayarak apoptozu başlatır (Şekil 9) (Fesik, 2000; Rowinsky, 2005).

Mitokondride dış zar geçirgenliğinin değişmesi Bcl-2 ailesi adı verilen proteinlerle düzenlenmektedir ve hücrede anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-x ve pro-apoptotik Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 arasında bir denge bulunmaktadır (Reed, 1997). Bunun dışında bir tümör baskılayıcı protein olan p53 sitoplazmada bulunmakta ve ağır DNA hasarında belirli genleri aktifleştirerek apoptozu tetiklemektedir (Şekil 9) (Oren ve Rotter, 1999).

Çok hücreli organizmalarda doku homeostazının sağlanması için her gün çok sayıda hücre ölümü gerçekleşir. Bunun için bağışıklık yanıtı oluşturmadan dolayısıyla komşu hücreyi etkilemeyecek bir ölüm süreci yaşanması gerekmektedir. Hücrede bu dengeyi sağlayan nekroz, apoptoz ve otofaji gibi birçok ölüm mekanizması bulunur (Shaha ve ark., 2010).

Apoptoz; hücrede normal gelişimin tamamlanması, homeostaz, yaşlanma süreci ve immün cevap gibi olayların yanı sıra testiküler dokuda da sık görülen, evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir. Üreme hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını sıkı şekilde kontrol eden Sertoli hücreleri aynı şekilde apoptozda da rol oynar (Rodriguez ve ark., 1997).

Memelilerde embriyonik ve fetal dönemde kadın ve erkek üreme hücrelerinin büyük kısmının kaybedildiği tespit edilmiştir (Oakberg, 1956). Normal spermatogenezi olan hastalarla karşılaştırıldığında azospermi ve oligospermisi olan erkeklerin testiküler dokusunda apoptotik üreme hücrelerine daha çok rastlanması ve testiküler yetmezliği olan infertil hastaların testiküler biyopsisinde daha yüksek apoptoz oranlarının görülmesi bu görüşü desteklemektedir (Diemer ve Desjardins, 1999).



Şekil 9. Apoptozun temel mekanizması. İntrinsik yolda; hücresel stres, p53 tümör baskılayıcı proteini aktive eder. P53, Bax ve Bak'i aktive eden Puma ve Noxa'yı düzenleyerek intrinsik yolu başlatır. Akt kinazı, Bad'i fosforile ederek intrinsik yolu inhibe eder. Bax ve Bak, dış mitokondriyal membranı permeabilize ederek sitokrom c'nin dışarı salınmasına neden olur. Sitokrom c ise Apaf-1 ve kaspaz-9'a bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturur. Aktif kaspaz-9, efektör kaspazlar olan Kaspaz-3,-6 ve-7'yi aktifleştirir. Mitokondriyal protein Smac/DIABLO ise apoptoz protein inhibitörlerine (IAP) bağlanarak apoptozu başlatır. Ekstrinsik yolak; sitotoksik bağışıklık hücreleri, Apo2L/TRAIL gibi pro-apoptotik ligandlar üretir. Homotrimerik ligand, hedef hücrenin yüzeyi üzerindeki pro-apoptotik reseptörler DR4 ve/veya DR5'e bağlanır. Ligand bağlanması reseptörlerin kümelenmesini uyarır, adaptör protein FADD ve başlatıcı kaspaz-8 ile-10'un aktifleşmesiyle ise ölüm indükleyen bir sinyalleşme kompleksi (DISC) oluşur. DISC oluşumu ise c-FLIP gibi inhibitörlerle modüle edilir (Ashkenazi, 2008)

Apoptozun normal spermatogenez sürecinde iki önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Gelişimin erken evrelerinde apoptoz; germ hücresi/Sertoli hücresi oranını düzenleyen bir mekanizma olarak kullanılırken, yetişkinlerde ise mayoz ve mitoz sırasında meydana gelen hatalar sonucu genetik açıdan kusurlu hücrelerin seminifer epitelden uzaklaştırılmasında görevlidir (Alam ve ark., 2010). Buna ek olarak yaşlanmış olgun spermiler erkek ve dişi üreme bölgelerinde apoptoza uğrayabilmektedir (Li ve ark., 2009). Testiste üreme hücresi apoptozu hayat boyunca normal ve sürekli olarak devam etmektedir. Testiküler üreme hücrelerinde apoptoza yol açan etiyolojik faktörler ve moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Sakkas ve ark., 2003).

Apoptozun biyokimyasal özellikleri arasında fosfatidilserinlerin hücre dışına yönelmesi, kaspazların aktivasyonu, DNA fragmentasyonu, mitokondriyal membran potansiyeli değişimi ve DNA merdivenlenmesi (DNA laddering) bulunmaktadır. Bu biyobelirteçlerin bulunması hücrede apoptoz varlığını kanıtlamaktadır (Fadok ve ark., 1992).

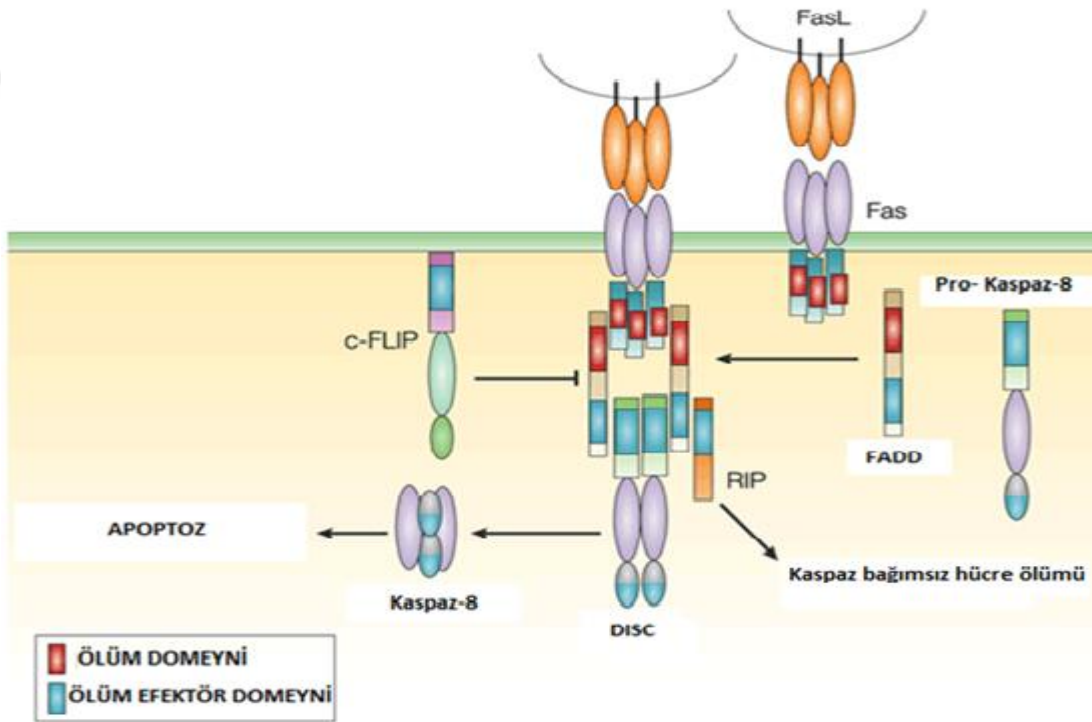
Birçok çalışma sonucunda memelilerin testiküler dokusunda apoptoz sürecinin Bcl-2 proteinleri, FAS ve kaspazları içeren farklı apoptotik sinyal mekanizmalarıyla bağlantılı olduğu saptanmıştır (Chen ve ark., 2006). Bu çalışmalara ek olarak, anormal sperm parametrelerine sahip erkeklerde ejakülattaki spermelerde apoptotik protein olan FAS'ın yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir (Rodriguez ve ark., 1997).

FAS (APO-1 veya CD95), 43 kDa molekül ağırlığa sahip, TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir ve insan *FAS* geni 10. kromozom üzerinde (10q23.31) bulunmaktadır. FAS; özellikle timus, karaciğer, kalp, böbrek ve aktive olgun lenfositlerde eksprese olan bir hücre yüzeyi proteinidir (Curtin ve Cotter, 2003).

Apoptotik yolun gereksiz şekilde harekete geçirilmesini önlemek için, FAS ekspresyonu ve lokalizasyonu çeşitli mekanizmalar yoluyla sıkı bir şekilde düzenlenir (Bennett ve ark., 1998). Her şeyden önce uyarılmamış hücrelerde plazma zarında sadece minimal bir FAS miktarı eksprese edilirken, reseptörün çoğu özellikle Golgi kompleksi ve trans-Golgi ağındaki sitoplazmada lokalize olmaktadır (Sodeman ve ark., 2000). Bir pro-apoptotik uyarın sonrasında FAS içeren veziküller, plazma membranında FAS ifadesini artırarak hücre yüzeyine translokasyon gerçekleştirir. Bu mekanizma ölüm reseptörünün

plazma membran yoğunluğunu düzenlemek ve spontan aktivasyonunu önlemek için etkili bir yol sağlamaktadır (Feng ve Kaplowitz, 2000).

FASL (CD95L) ise, esas olarak aktif T hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen homotrimerik yapıya sahip bir tip II transmembran proteinidir (Suda ve ark., 1993). FASL proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanarak reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktive olmuş reseptörler FADD adaptör molekülü ile etkileşir ve adaptörün karboksil ucuna (C) yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla pro-kaspazlar aktive olarak apoptozu başlatırlar (Şekil 10) (Gajate ve Mollinedo, 2011).



Şekil 10. FAS/FASL bağlı apoptoz mekanizması. FASL tarafından bir hücrenin yüzeyindeki FAS reseptörlerinin çapraz bağlanması, adaptör protein FADD'yi oluşturur. FADD'nin ölüm-efektör domeyni, aktif kaspaz-8'i oluşturmak üzere bölünen prokaspaz-8 ile etkileşir. Bu kompleks DISC (ölüm indükleyen sinyal kompleksi) olarak adlandırılır. Bir ölüm-efektör domaini ihtiva eden bir başka protein, FADD'ye bağlanabilen ve kaspazdan bağımsız hücre ölümü ile sonuçlanan bir diğer sinyal türünü üretebilen RIP'dir (Green ve Ferguson, 2001)

Tüm ayrıntıları bilinmese de apoptozun erkek üreme hücrelerindeki düzenleyici rolünün esas olarak FAS/FASL yolağı üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (Pentikainen ve ark., 1999; Riccioli ve ark., 2003). FAS sistemi hem testislerde üreme hücre sayısının kontrolü hem de testiküler dokunun bağışıklık reaksiyonlarının statüsünün korunması açısından önemli kabul edilmektedir. FASL, aktive edilmiş T hücrelerin oluşumunu engelleyerek, gametlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınan reaksiyonlardan korunmasını sağlamaktadır. FAS-FASL sistemi üreme hücrelerinin ölümünü düzenleyen en önemli faktörden biri olmasına rağmen infertil hastalarda bu sistem yeterince detaylı araştırılmamıştır (Fujisawa ve Ishikawa, 2003).

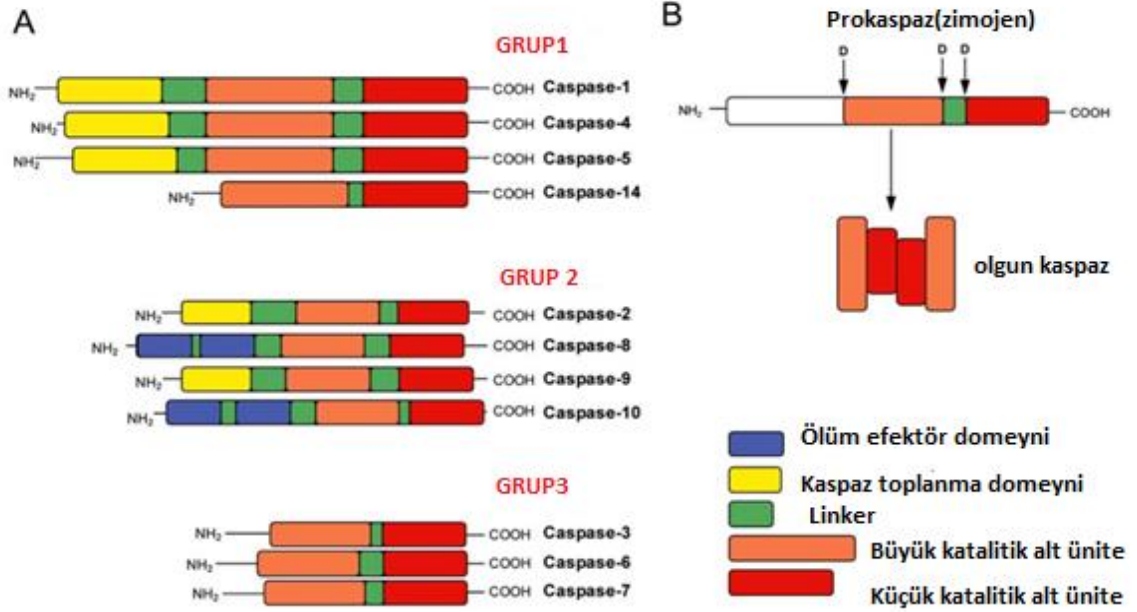
Yapılan bir çalışmada FAS-aracılı apoptotik süreç, hipospermatogenezli hastalarda incelenmiş ve apoptotik yolaktaki FAS-FASL ve kaspaz 3 aktivitesine bakılmıştır. Sonuç olarak üreme hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde apoptotik sürecin arttığı ve testislerde artan FASL ekspresyonu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2007).

Sakkas ve ark. FAS ifade eden spermatozoa sayısının normal sperm parametrelerine sahip erkekler arasında düşük olduğunu, ancak anormal sperm parametrelerine sahip erkeklerde daha yüksek olduğunu bildirmiştir (Sakkas ve ark., 2003). Yapılan bir başka çalışmada ise oligoteratozoospermili ve oligoastenozoospermili erkeklerde genel olarak daha yüksek FAS ekspresyonu olduğu gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2009)

Apoptozun sinyal yolları ve tipik belirteçleri somatik hücrelerde ve üreme hücrelerinde farklılık gösterebilmektedir. Testiste normal süreç görülürken spermatozoada aktif bir apoptoz varlığı tartışma konusu olmuştur. Apoptotik belirteçlere sahip spermlerin üretilmesi, anormal sperm parametrelerine sahip bazı erkeklerde "abortif bir apoptoz" meydana geldiğini göstermektedir. Bu durum başlangıçta apoptoz sinyal kaskadının oluştuğunu ancak bilinmeyen bir nedenle spermlerin apoptozdan kaçtığını düşündürmüştür (Sakkas ve ark., 1999).

Kaspazlar (sisteinil aspartata özgü proteinazlar) insan seminifer epitelyumunda apoptozun düzenlenmesine katılan diğer bir protein grubudur (Said ve ark., 2004). Aktif olmayan pro-enzimler olarak ifade edilirler ve pro-apoptotik sinyallere yanıt olarak tetiklenen bir yolla aktifleşirler (Şekil 11) (Thornberry ve Lazebnik, 1998). Bugüne kadar insan apoptotik yol kaskadında 14 kaspazın rol oynadığı tespit edilmiştir (Reed, 2000).

Temel olarak kaspaz aktivasyonu, proteoliz reaksiyonu veya diğer kaspazların birbiriyle etkileşimiyle başlamaktadır. Hücre zarındaki FAS ligandının FAS'a bağlanmasıyla kaspaz-8'in aktivasyonu tetiklenmekte ve aktive olan kaspaz-8 diğer efektör kaspazlara sinyal göndermektedir (Muzio ve ark., 1996).



Şekil 11. İnsan kaspaz ailesinin gruplandırılması. (A) Grup I, inflammatuar kaspazları, grup II başlatıcı kaspazları ve grup III' apoptozun efektör kaspazlarını içerir. Tüm kaspazlar, büyük ve küçük bir katalitik alt üniteye sahiptir. Pro-kaspaz-14 hariç olmak üzere grup I ve II'deki pro-bölgeler, bir kaspaz aktivasyon alım alanı (CARD) veya iki ölüm efektör alanı (DED) içerir; grup III kaspazları, bağlayıcı motifler olmaksızın kısa ön alanlara sahiptir. (B) Pro-kaspaz aktivasyonu şemasını gösterir. Olgun kaspazlar, spesifik aspartik asit (D) tortularında pro-kaspazların parçalanmasıyla oluşur (Hellwig ve ark., 2011)

Kaspazların infertilitede hangi rolü üstlendiği üzerine birtakım çalışmalar yapılmış ve kaspazların işleyişinde meydana gelen hatalar sonucunda bozulmuş spermatogenez, azalan sperm motilitesi, artmış sperm DNA fragmentasyonu gibi çoklu patolojiler meydana geldiği bildirilmiştir (El-Melegy ve Ali, 2011).

Yapılan bir çalışmada ELISA metoduyla seminal plazmada ve spermde kaspaz-3,-8 ve- 9 seviyelerine bakılmış ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında astenospermide kaspaz-8 ve -9'un daha yüksek oranda olduğu aynı zamanda OAT grubunda spermde kaspaz 8 seviyesinde anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Wei ve ark., 2015).

Yapılan diğer bir çalışmada ise apoptotik mekanizmanın spermatogenezdeki işleyişini belirlemek için testis biyopsisi alınarak SCOS ve MA hastalarında kaspaz düzeylerine bakılmış ve SCOS hastalarında kaspaz-3'ün miktarında artış gözlemlenmiştir (Kim ve ark., 2004).







2.3. Isı Şoku Proteinleri (HSPs)

2.3.1. HSP 70

Stres proteinleri olarak da adlandırılan ısı şoku proteinleri (HSP) ökaryotlardan prokaryotlara kadar yüksek derecede korunmuş proteinlerdir (De Maio, 1999). Çoğu HSP birbiriyle yapısal olarak benzerlik göstermekle birlikte (Kampinga ve ark., 2009), moleküler ağırlıklarına göre gruplandırılan HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve HSP100 (Şekil 12) hücrede farklı biyolojik süreçlerde spesifik görevler üstlenmektedir (Li ve Srivastava, 2004).

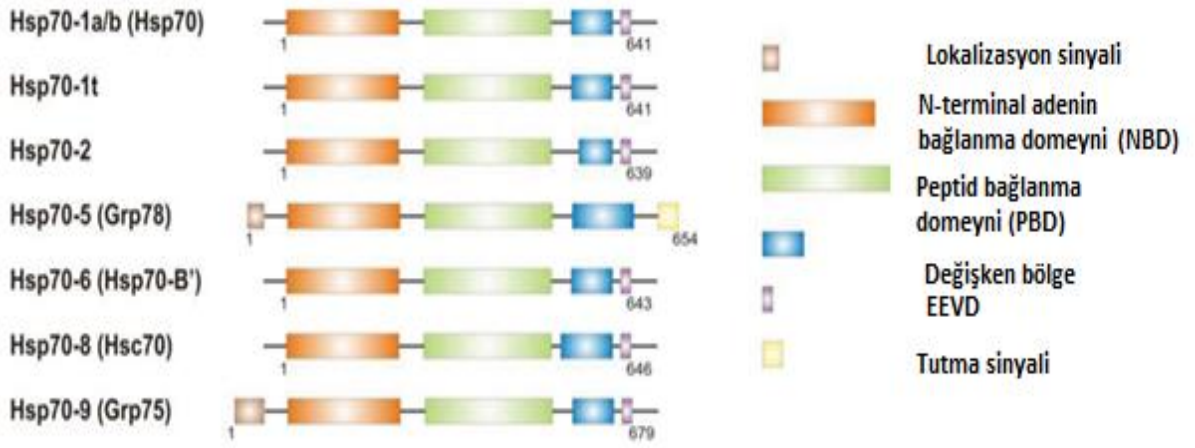
HSP'lerin ilk olarak hipertermi, oksidatif stres, inflamasyon, hücre hasar, hipoksi, iskemi ve toksik bileşikler gibi stresler tarafından indüklendiği bulunmuş (Purandhar ve ark., 2014), ancak daha sonra ortaya çıkan kanıtlar bazı HSP'lerin insanda çeşitli hücre ve dokularda stresin olmadığı koşullarda da aktive edildiğini göstermiştir (Stetler ve ark., 2010).

HSP'ler normal hücrelerde sinaptik iletim, ER stresine cevap, otofaji ve apoptozda görev alırken (Bukau ve ark., 2006) esas olarak proteinlerin doğru olarak katlanması, ilgili yerlere taşınması ve diğer moleküllerle kompleks oluşturmasında koruyucu olarak adlandırılan 'şaperon' görevi görmektedir. Bununla birlikte HSP'ler hücrelerde geçici bir termotolerans oluşturur ve genel olarak total protein sentezi bu aşamada baskılanır. Hücrede hafif bir ısı artışı HSP ekspresyonunu hemen artırarak hücre sağkalımının sürdürülmesini teşvik etmektedir (Beckham ve ark., 2008).

HSP AİLESİ	ORGANİZMA	ŞAPERON	LOKASYON	FORM
HSP100	E.coli S.cervisiae	ClpA, B, C Hsp104	Sitoplazma Sitoplazma	 6- to 7-mer
HSP90	E.coli S.cervisiae İnsan	HtpG Hsp83 Hsp90 GRP94 TRAP1	Sitoplazma Sitoplazma Sitoplazma Çekirdek ER Mitokondri	 Dimer
HSC/HSP70	E.coli S.cervisiae İnsan	DnaK Ssa1-4, Ssb1,2 Kar2, Ssc1 Hsc70, Hsp70 BIP, mHsp70 GRP78	Sitoplazma Sitoplazma ER Mitokondri Sitoplazma Çekirdek ER	 Monomer
HSP60	E.coli S.cervisiae Bitki İnsan	GroEL/ES Hsp60 Cpn60 Hsp60	Sitoplazma Mitokondri Kloroplast Mitokondri	 14-mer
HSP40	E.coli S.cervisiae İnsan	dnaJ Ydj1 Hdj1, Hdj2	Sitoplazma Sitoplazma Çekirdek	 Monomer
KÜÇÜK HSP	E.coli İnsan	IbpA, IpbB Hsp27 kristallin	Sitoplazma Sitoplazma Sitoplazma	 8- to 24-mer

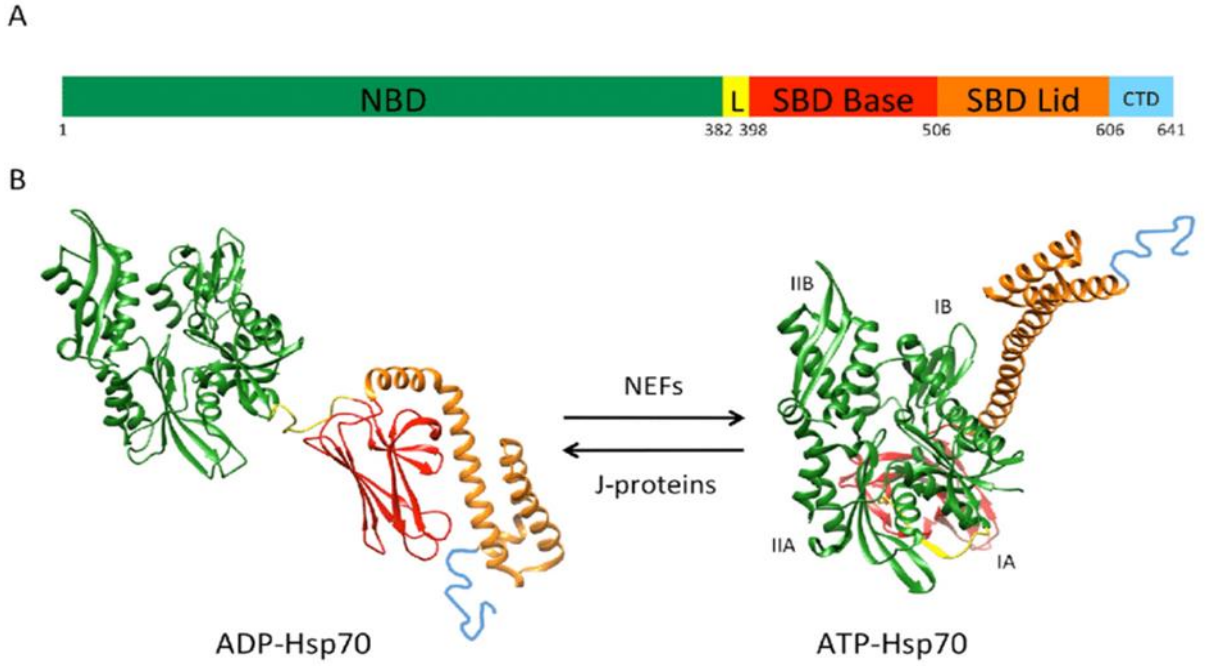
Şekil 12. Başlıca ısı şoku protein ailelerinin isimlendirilmesi, yer aldıkları hücrel kompartmanlar ve buldukları yapısal formlar (Zorzi ve Bonvini, 2011)

İnsan HSP70 ailesi; aminoasit sekansı, ekspresyon seviyesi ve hücrede bulunduğu yere göre gruplandırılan (Şekil 13) birbirinden farklı 13 üyeden oluşmaktadır (Kampinga ve ark., 2009; Stetler ve ark., 2010). Genellikle bu üyelerin çoğu sitozol ve nükleusta lokalize olurken GRP75 ve GRP78 gibi spesifik proteinler sırasıyla mitokondri ve ER'de bulunmaktadır (Lee, 2005).



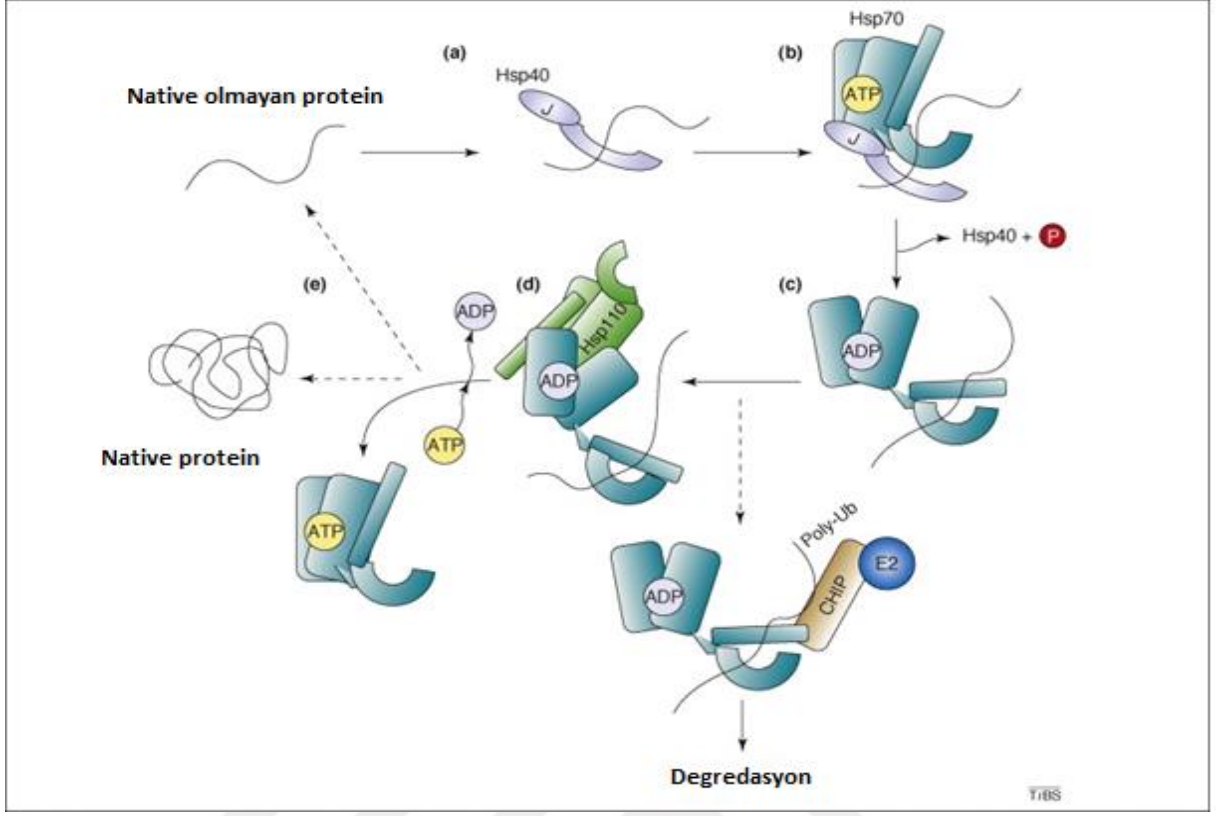
Şekil 13. İnsan HSP70 ailesi üyesi proteinlerin yapısı. İnsan HSP70'i 30 kD molekül ağırlıkta substrat bağlayan bir peptid bağlanma alanı (PBD) ve 45 kD moleküler ağırlıklı, ATP- bağlama yarığı içeren nükleotid bağlanma domeyni (NBD) içerir. Bununla birlikte çoğu aile üyeleri tarafından paylaşılan bir EEVD motifi ve değişken bölge içerir. Daha spesifik olan lokalizasyon ve tutma sinyalleri ise HSP70-5 ve HSP70-9 proteinlerinde bulunur, bu da sırasıyla şaperonun lokalizasyonunu endoplazmik retikulum (ER) veya mitokondriyal lümen içine yönlendirir (Zorzi ve Bonvini, 2011)

HSP70 proteinleri temelde iki farklı fonksiyonel birim içermektedir (Şekil 14). Bunlar N- terminal ucunda bulunan ATPaz domeyni ve C-terminal uçta bulundan substrat bağlanma domeynidir (Mayer ve Bukau, 2005). Katlanmamış proteinlerde açığa çıkan hidrofobik aminoasitlerden oluşan bölge HSP70'in C-terminal ucu tarafından tanınır (Bukau ve ark., 2006).



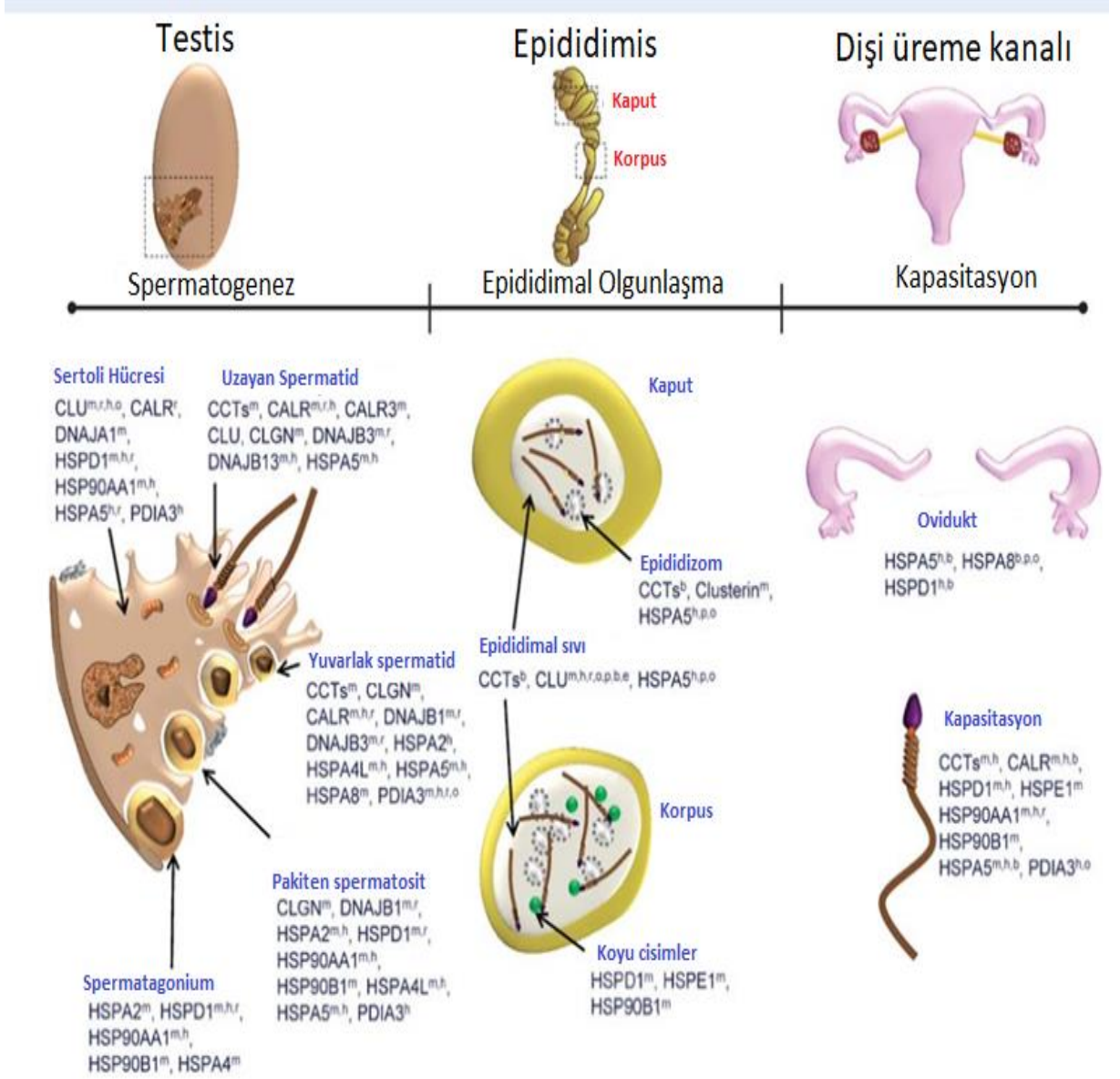
Şekil 14. HSP70 domeyn organizasyonu ve atomik gösterimi. (A) HSP70 domeyn organizasyonunu ve aminoasit sayılarını gösterir. NBD: nükleotid bağlanma domaini, L: linker, SBD Baz: substrat bağlayıcı alan SBD Lid: substrat bağlayıcı alan Lid, CTD: C-terminal alanı. (B) Kapalı (PDB 2KHO) ve açık (PDB 4JNE) konformasyonlarda HSP70 atomik yapılarıdır ve renk kodları (A) ile aynıdır (Fernandez-Fernandez ve Valpuesta, 2018)

Proteinlerin normal konformasyonunun değişmesini önleyen bu şaperonlar aynı zamanda onları agregasyona karşı korumaktadır. Ancak konformasyonu bozulan ve yeniden katlanamayan proteinler proteozoma yönlendirilir (Rosser ve ark., 2007). Bununla birlikte şaperonun yanlış katlanan proteine bağlanması ve katlanmadan sonra proteinden ayrılması için ATP enerjisine ihtiyaç vardır. Bu aktivitesi ise HSP40 gibi çeşitli ko-şaperonlar tarafından düzenlenmektedir (Şekil 15) (Langer ve ark., 1992; Liberek ve ark., 1992; Qiu ve ark., 2006).



Şekil 15. HSP70 aktivitesi. HSP70 polipeptit bağlanması ve serbest bırakılması, ATP-ADP değişim döngüleri ile düzenlenir. Başlangıçta, doğal olmayan polipeptit bir HSP40 ko-şaperon (açık mavi) tarafından bağlanır (b) HSP40 J-alanı daha sonra ATP bağlı haldeyken HSP70'i (mavi) bağlar. (c) Nükleotid bağlayıcı alanda (NBD) HSP40'dan salınan doğal olmayan polipeptit afinitiyi artırarak, HSP70 substrat-bağlama domeninde (SBD) bir konformasyona neden olur. Ubikitin-konjuge edici E2 (koyu mavi) ile E3 ubiquitin ligaz CHIP (kahverengi) gibi ilave kofaktörler, Ubikitin-proteazom sistemi (Poly-Ub) tarafından tanınan polipeptide ve HSP70'e bağlanabilir. (d) HSP110 (yeşil) gibi nükleotid değişim faktörleri (NEFler), ADP'yi ATP ile değiştirir ve polipeptidi HSP70'den serbest bırakır (e) Polipeptid native şekilde kalırsa bu döngü katlanana kadar tekrarlanabilir (Summers ve ark., 2009)

Isı şoku proteinlerinin ve ısı şoku faktörlerinin (HSF) hücrede fizyolojik düzenleme sürecine ve farklı sinyal iletim kaskadlarına katıldığı bilinmekte olup (Terada ve ark., 2005) bu ailenin birçok üyesi spermatogenezde üreme hücrelerinin gelişimi aşamasında da hayati rol oynamaktadır (Şekil 16) (Zakeri ve ark., 1988).

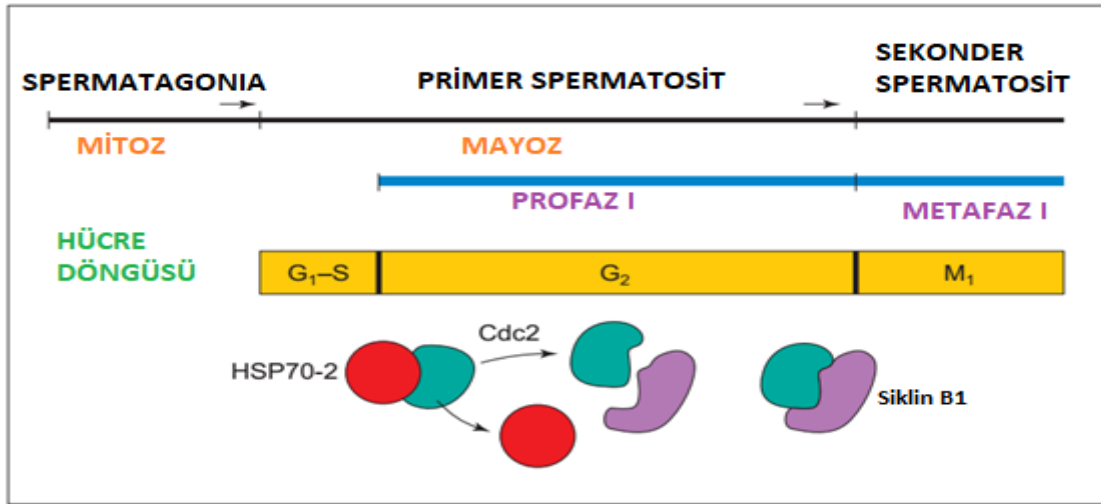


Şekil 16. Spermatogenez ve post-testiküler sperm olgunlaşması sırasında şaperon ekspresyonu. Bu moleküler şaperonların birçoğu, erkek gametin farklılaşmasında ve fonksiyonel olgunlaşmasında, hücre döngüsünün ilerlemesinde, sinaptonemal kompleks oluşumu dahil sinyal yollarının kontrolünde, post testiküler sperm olgunlaşması sonrası meydana gelen kompleks biyokimyasal ve biyofiziksel modifikasyonlarda ve kapasitasyonda rol alır. Kısaltmalar: m, fare; h, insan; r, sıçan; b, sığır; p, domuz; o, koyun; e, at (Dun ve ark., 2012)

2.3.2. HSPA2

HSP70 ailesin bir üyesi olan insan *HSPA2* geni (faredeki HSP70-2) başlangıçta testis spesifik olarak tanımlanmıştır (Allen ve ark., 1988; Maekawa ve ark., 1989). Ancak yapılan çalışmalarda testisin yanı sıra adrenal bez, bronş ve kolon gibi dokularda da HSPA2 proteini tespit edilmiştir (Bonnycastle ve ark., 1994).

Bu proteinin üretimi ısı şoku ile indüklenmediğinden erkek üremesinde önemli rolü olduğu düşünülmüş, zamanla HSPA2'nin çeşitli somatik dokularda ve bazı kanser hücrelerinde de ifade edildiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2013). *HSPA2* nakavt erkek farelerde spermatogenezin G2/M hücre döngüsü safhasında tutuklu kalarak M safhasına ilerleyemediği gözlemlenmiş ve Cdk1/Siklin B kompleksinin oluşması için HSPA2'nin mutlak gerekli olduğu doğrulanmıştır (Şekil 17) (Zhu ve ark., 1997).



Şekil 17. Pakiten spermatositlerde Cdc2 (yeşil)-siklin B1(mor) kompleks oluşumunda HSP70-2'nin (kırmızı) rolü. İn vitro çalışmaları, HSP70-2'nin Cdc2'ye yönelik bir şaperon olduğunu ve etkileşimlerinin Cdc2'nin siklin B1 ile bir kompleks oluşturmak için uygun bir konformasyon alması için gerekli olduğunu göstermektedir. Bu kompleks, spermatogenezde mayoz I fazın sonunda G2-M geçişi için gereklidir (Eddy, 1999)

Spermatogenez sırasında HSP70-2'nin mayotik fazlarda gerçekleşen kromozom yoğunlaşması, homolog kromozom eşleşmesi ve sinoptonemal kompleks (SC) oluşumunda işlevler üstlendiği bilinmektedir (Mori ve ark., 1997).

HSP70-2'nin rolünü belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada bu gen nakavt edilmiş ve farelerin postmayotik hücrelerden yoksun olduğu görülmüş ancak endokrin fonksiyonlar etkilenmediği için seminal vezikülde ve cinsiyet özelliklerinde bir değişim gözlenmemiştir (Dix ve ark., 1996).

HSPA2 aynı zamanda sperm DNA paketleme proteinleri (TP-1, TP-2) ile ilişkilendirilmiş ve mayoz sonrası genomun yeniden yapılanmasında görevli olduğu saptanmıştır (Govin ve ark., 2006). Yapılan analizler HSPA2 nakavt farelerdeki mayoz başarısızlığının sperm apoptozunda dramatik bir şekilde artışla sonuçlandığını göstermektedir (Allen ve ark., 1988; Mori ve ark., 1997).

Oligospermik ve normozospermik hastalarda HSPA2 gen ekspresyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada HSPA2'nin RT-PCR analizi, kontrollere kıyasla oligoteratozoospermik erkeklerin testiküler dokusunda daha düşük ekspresyon seviyeleri göstermiştir (Cedenho ve ark., 2006).

Testiküler doku dışında infertil erkeklerin farklı alt gruplarında da HSPA2 ekspresyonu incelenmiş, idiyopatik oligozoospermik erkeklerin (İÖ) ve varikoselli oligozoospermik (VO) erkeklerin ejakülat spermatozoasında kontrollere göre çok daha düşük düzeyde (İÖ: %50, VO: %33) HSPA2 gen ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (Lima ve ark., 2006).

Yapılan tüm bu çalışmalar, HSPA2 ekspresyonu ile erkek infertilitesi patogenezinin birbiriyle yakın ilişkili olduğunu göstermektedir.

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER); salgı işlevinden ve hücre yüzey proteinlerinin sentezinden sorumlu olan aynı zamanda sentezlenen bu proteinlerin katlanmasında, modifikasyonunda ve belirli yerlere taşınmasında görev alan spesifik bir organeldir. Buna ek olarak, ER önemli bir hücre içi kalsiyum deposudur ve steroidler ile kolesterolün biyosentezinden sorumludur (Guzel ve ark., 2017). ER'ye gelen yeni sentezlenen proteinler N-bağlı glikolizasyon, disülfid bağ oluşumu ve hidroksilasyon gibi post-translasyonel modifikasyona uğramaktadır (Braakman ve Balleid, 2011).

Fonksiyonel açıdan aktif proteinlerin üretimi için ER'ye özgü spesifik şaperonlar proteinlerin doğru yapıda katlanmasını kolaylaştırmaktadır. Hücrede doğru katlanmayı desteklemek için, ER'de GRP78, GRP94, kalretikulin, kalneksin ve protein disülfid

izomeraz (PDI) gibi moleküler şaperonlar bulunur (Lee, 2005; Luo ve Lee, 2013). Bu süreç boyunca katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin aşırı miktarda birikmesi homeostazın bozulmasına yol açarak hücrede bir stres oluşturmaktadır (Guzel ve ark., 2017). Bu stresin nedenleri arasında viral enfeksiyonlar, enerji veya besin yokluğu, hipoksi, oksidatif stres, ortam sıcaklığı, kalsiyum homeostazının bozulması, salgı proteinlerinin mutasyonları, anormal kolesterol seviyesi, redoks veya glikozilasyon durumundaki değişiklikler gösterilmektedir (Boyce ve Yuan, 2006). Bu stres ortamının ortadan kaldırılması ve homeostazın yeniden sağlanması için kusurlu olan proteinler yıkıma uğratarak bir yanıt oluşturulur ve bu duruma katlanmamış protein yanıtı (UPR) adı verilir (Cornejo ve ark., 2013).

UPR'nin aktivasyonu PERK, ATF6 ve IRE1 olarak adlandırılan üç farklı ER stres sensörü tarafından düzenlenmektedir. Aktivasyon sonucunda translasyonun durdurulması, protein sentez yükünün azaltılması, ER'de katlanmamış proteinlerin birikiminin önlenmesi ve ER şaperonlarını kodlayan genlerin translasyonunun artırılması gibi çeşitli hücre sel cevaplar oluşturulur. Doğru şekilde katlanamayan proteinler, proteazom-aracılı ER'ye bağlı protein yıkımı (ERAD) yoluyla ortadan kaldırılır (Doroudgar ve Glembotski, 2013).

Hücrelerin ER stresine uyum sağlamaları için kullandıkları koruyucu mekanizma glikozla düzenlenen protein (GRP) ailesi üyelerinin aktivasyonu ile sağlanır. GRP fonksiyonunun araştırılması ve ER stresiyle diğer hastalıkların ilişkisinin aydınlatılması yeni terapötik yaklaşımların oluşmasında kilit rol oynamaktadır. GRP genleri kalsiyum depolarını etkileyen veya glikolizasyonu inhibe eden faktörlerle indüklenebilmektedir (Lee, 2001).

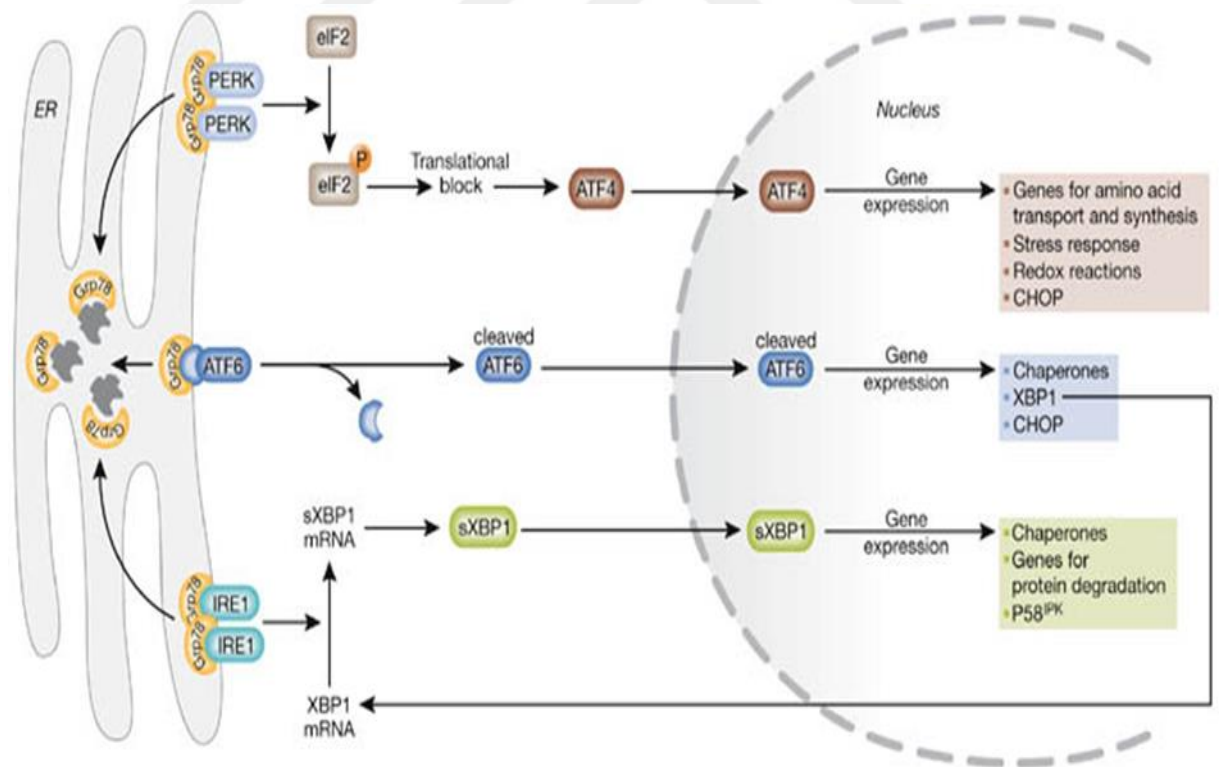
GRP78, sentezlenmekte olan polipeptitlerle kompleks oluşturarak ER içinde katlanmalarını ve modifikasyonu yönetmektedir. GRP78 seviyeleri hücre içinde nispeten düşük seviyelerde tutulur ve ER'de kalsiyum homeostazını etkileyen stresler altında önemli ölçüde artış göstermektedir. Stres koşulları altında, yanlış katlanan proteinler ER'de birikmeye başladığı anda GRP78 uyarılır ve proteinlerin bir araya toplanması önlenerek yanlış katlanan proteinlerin yıkımı kolaylaştırılmaktadır (Lee, 2005).

GRP78, ER stres sensörleri olan PERK, IRE1 ve ATF6'ın aktif olmayan formlarına bağlı şekilde bulunmakta ve ER stresi durumunda GRP78 serbest bırakılarak bu sensörlerin aktivasyonuna neden olmaktadır (Oakes ve Papa, 2015). Böylelikle gerekli

sinyal kaskadı hem hücre sağkalımını hem de apoptozu yönetmektedir (Szegezdi ve ark., 2006). Reseptörlerin aktivasyonu sırayla gerçekleşir. İlk olarak PERK daha sonra ATF6 aktive olur, IRE1 ise en son aktive olur.

Aktive olmuş PERK, ökaryotik başlangıç faktörü 2a'yı (eIF2a) fosforile ederek genel protein sentezini bloke eder. Bu fosforilasyon ATF4'ün translasyonunu sağlar. Bir transkripsiyon faktörü olan ATF4, nükleusa hareket eder ve ER homeostazını düzenlemek için gereken genlerin transkripsiyonunu indükler.

ATF6 ise, ER'den Golgi aparatına taşındıktan sonra proteoliz ile aktive edilir. Aktif ATF6 aynı zamanda bir transkripsiyon faktörüdür ve bir başka transkripsiyon faktörü olan X kutusuna bağlanan protein 1 (XBP1) ekspresyonunu düzenler. Aktif formunu elde etmek için, XBP1 mRNA'sı, IRE1 tarafından gerçekleştirilen mRNA splicing mekanizmasına tabi tutulur. Splice edilmiş XBP1 proteini (sXBP1), nükleusa giderek protein yıkımında yer alan genlerin yanı sıra, şaperonların ve PERK-inhibitörü P58^{IPK}'nin transkripsiyonunu kontrol eder (Şekil 18) (Lin ve ark., 2008).



Şekil 18. Katlanmamış protein yanıtı (UPR) (Szegezdi ve ark., 2006)

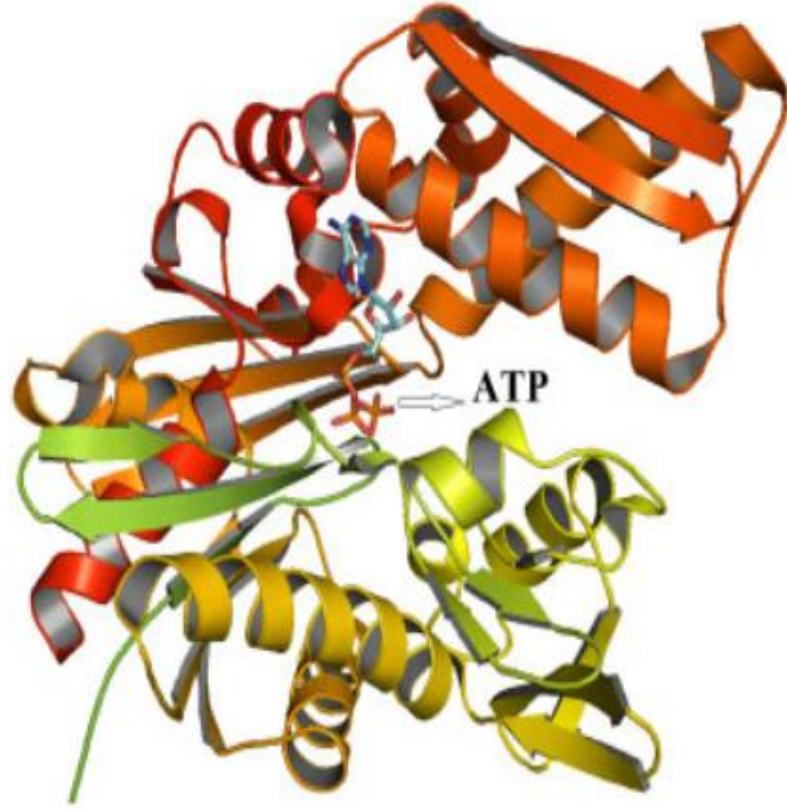
Geçtiğimiz son on yıl içinde, yanlış katlanmış proteinlerin birikiminin bir takım nörodejeneratif, immün ve endokrin patolojilere neden olduğu ve dolayısıyla artan yaşla birlikte diğer hastalıkların oluşumuna da katkıda bulunduğu ortaya çıkmıştır. Bu hastalıkların dışında günümüzde yapılan çalışmalar, yanlış katlanmış proteinlerin fertilitte bozukluklarına da sebep olabileceği ihtimaline odaklanmaya başlamıştır.

2.5.Glukozla Düzenlenen Protein 78 kDa (GRP78)

İlk olarak 1970'lerin ortalarında, Rous sarkom virüsü ile fibroblastların transformasyonunun bir dizi genin sentezlenmesine neden olduğu ve bu genlerin glukoz yoksunluğu üzerine eksprese edildiği bulunmuş (Pouyssegur ve ark., 1977), bu nedenle de bu gen ürünleri glukozla düzenlenen proteinler (GRP'ler) olarak adlandırılmıştır (Lee ve ark., 1983).

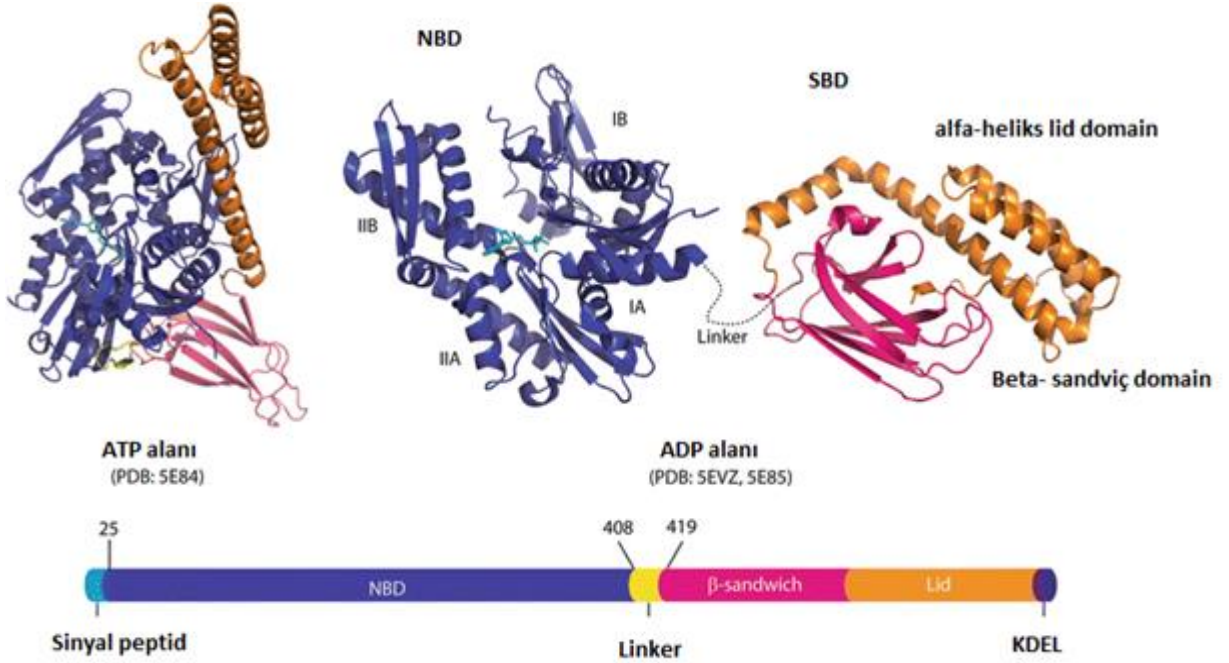
GRP78, (BiP veya HSPA5), yüksek oranda korunmuş (Ni ve Lee, 2007) kalsiyuma duyarlı bir HSP70 ailesi üyesidir (Şekil 19) (Quinones ve ark., 2008) ve tüm hücre tiplerinde belirli oranda bulunurken esasen tiroid ve pankreas adacıkları gibi salgı hücrelerinde üretimi daha yüksek seviyededir (Daugaard ve ark., 2007).

GRP78 geni; 9. Kromozomun (9q34) distal ucunda bulunmaktadır. Bu gen 4576 bp ve sekiz ekzon içerir (Ting ve Lee, 1988). Bununla birlikte TATA kutusu içeren oldukça aktif bir promotör ile (Yoshida ve ark., 1998) ER stres yanıt elemanının (ERSE) tekrarlayan birimleri olan çoklu CCAAT dizileri ve transkripsiyon faktörü Sp1 için iki potansiyel bağlanma bölgesi içerir (Lee, 2001). İnsan *GRP78* promotörü ayrıca GRP78'in, UPR ile ilişkili dizilerden bağımsız olarak etki gösteren korunmuş bir c-Myb bağlanma yerine sahiptir (Ramsay ve ark., 2005).



Şekil 19. GRP78'in kristalografik 3 boyutlu monomerik yapısı (Avila ve ark., 2013)

Protein, ATPaz aktivitesinden sorumlu olan 44 kDa ağırlığındaki N-terminal ucunda 20-25 aminoasitlik sinyal peptid dizisi, 20 kDa olan C-terminalinde ise KDEL sekansı (Lys-Asp-Glu-Leu) dâhil olmak üzere toplam 654 aminoasit içerir. Aynı zamanda, bilinmeyen bir fonksiyona sahip, oldukça sarmal ve değişken bir 10 kDa ağırlığında COOH-terminal kuyruğu içerir (Chevalier ve ark., 2000). N-terminal nükleotit bağlama alanı (NBD), C-terminal peptid substrat bağlama alanına esnek bir bağlayıcı ile birleştirilir (Şekil 20) (Wisniewska ve ark., 2010). GRP78, C-terminal tutma sinyali olan KDEL nedeniyle esas olarak perinükleer ER'de bulunur (Zhang ve Zhang, 2010).



Şekil 20. GRP78'in Yapısı. Diğer HSP70 izoformlarında olduğu gibi GRP78, nükleotid bağlama bölgesinden (NBD) ve substrat bağlama bölgesinden (SBD) oluşur. Ayrıca NBD'nin dört alt alanı (IA, IB, IIA, IIB) ve SBD'nin beta-sandviç ve alfa heliksel alt alanı da belirtilmiştir. Hem ATP'ye bağlı durumu (PDB: 5E84) hem de ADP'ye bağlı durumu (PDB: 5EVZ, 5E85) gösterilmektedir (Yang ve ark., 2017)

İnsan GRP78'i, proteinlerin katlanmasında, ER'de kalsiyum metabolizmasında, hücrel savunma mekanizmasında ve hücrelerin anti-apoptotik yanıtında görev alan çok fonksiyonlu bir şaperondur (Corsi ve Schekman, 1996; Quinones ve ark., 2008). Şaperon işlevi dışında hücre yüzeyinde bulunan GRP78; mitojenez ve hücrel proliferasyonun yanı sıra virüs reaksiyonlarında da reseptör görevi görmektedir. Ayrıca alfa-2-makroglobulin proteini için bir zar reseptörüdür (Delpino ve Castelli, 2002; Misra ve ark., 2002; Misra ve ark., 2004).

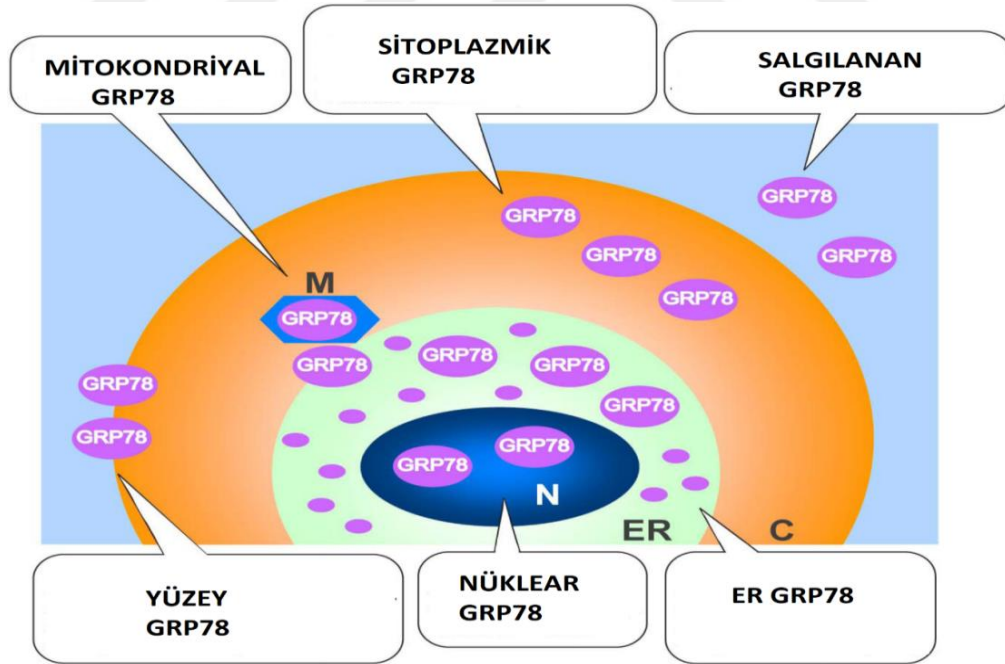
1990'ların başında elektron mikroskopisiyle yapılan çalışmalarda sıçan ekzokrin pankreatik hücrelerde ER proteini olan GRP78, GRP94 ve PDI'nın, ER'den diğer hücre içi bölgelere taşındığı gösterilmiştir. Bu proteinlerin trans golgi ağına, sekretuar granüllere, mitokondriye, nükleusa, plazma membranına hatta ekstraselüler boşluğa salındığı tespit edilmiştir (Şekil 21) (Takemoto ve ark., 1992).

Hücre yüzeyini hedefleyen GRP78, ilk olarak hipoksi veya glukoz açlığı gibi stres koşullarında kanser hücrelerinde gözlenmiştir (Ni ve ark., 2011).

İlerleyen zamanlarda çoğalan endotel hücrelerinin ve monositik hücrelerin hücre yüzeyinde eksprese edildiği bulunmuştur (Bhattacharjee ve ark., 2005). GRP78, bu hücrelerin yüzeyindeki ana histouyumluluk kompleksi (MHC) sınıf I ile ilişkilidir ve MHC sınıf I ifadesi için gereklidir (Triantafilou ve ark., 2001).

Ni ve ark. GRP78va olarak adlandırılan bir sitozolik GRP78 formu tanımlanmış ve lösemi hastalarında kontrollere göre daha yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir. GRP78va'nın, alternatif splicing modeliyle üretildiği, bu nedenle bu gen tarafından kodlanan proteinin, ER sinyal peptidinden yoksun olup ER'yi hedefleyemediği düşünülmüştür. GRP78va, GRP78'in ER formuna kıyasla hücrede düşük oranda bulunurken, sitoprotektif özellikler sergiler ve sitosolden UPR sinyalini düzenleme potansiyeline sahiptir (Ni ve ark., 2009).

Tüm bunların dışında proteinin mitokondri (Sun ve ark., 2006) ve çekirdekte bulunan formları da tespit edilmiştir (Takano ve ark., 2001). Çin Hamster Over (CHO) hücrelerinde aşırı eksprese edilmiş GRP78 hem ER hem de çekirdekte lokalize bulunmuştur (Morris ve ark., 1997).



Şekil 21. GRP78'in hücrede bulunduğu bölgeler. Stresli olmayan hücrelerde genellikle GRP78 ER lümeninde bulunur (N, çekirdek; C, sitoplazma; M, mitokondri) (Ni ve ark., 2011)

ER homeostazının bozulmasına karşı oluşan UPR mekanizması gerekli durumlarda apoptozun başlamasını içerir. Genel olarak GRP'ler apoptoz baskılayıcıdır ve GRP78, kaspaz-7 ile kompleks oluşturarak hücreleri uyarılan apoptozdan korumaktadır (Rao ve ark., 2002; Reddy ve ark., 2003). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ER'nin dış yüzeyinde bulunan GRP78 ile pro-apoptotik protein BIK ve anti-apoptotik protein BCL-2 arasında fonksiyonel bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (Fu ve ark., 2007; Zhou ve ark., 2011).

Bununla birlikte mitokondri ile ilişkili GRP78, RAF1'e bağlanabilmekte ve bu etkileşim mitokondriyal geçirgenliğin korunmasında görev alarak ER-stres kaynaklı apoptoza karşı koruyuculuk sağlamaktadır (Shu ve ark., 2008).

GRP78'in anti-apoptotik fonksiyonlarını desteklemek için yapılan çalışmalarda, GRP78'in nakavt edilmesinin çeşitli dokularda kaspaz aktivasyonuna ve doku atrofisine yol açtığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2010; Wey ve ark., 2012a).

Meme, prostat ve lösemik kanser modellerinde GRP78'in heterozigot veya homozigot nakavtları tümör apoptozunu arttırmış ve tümör ilerlemesini engellemiştir (Dong ve ark., 2008; Fu ve ark., 2008; Wey ve ark., 2012b).

Yapılan çalışmalarda GRP78 proteininin artmış ekspresyonu, prostat, mide, kolon (Li ve ark., 2016), akciğer, yumurtalık ve meme kanserinde tedaviye kötü yanıt ile ilişkilendirilmiştir (Ma ve ark., 2014). Multiple myeloma hastalardan elde edilen kemik iliği örneklerinin plazmasında sandviç ELISA metoduyla GRP78 seviyelerine bakılmış, özellikle GRP78'in hücre yüzeyine translokasyon yaparak hücre sağkalımı, proliferasyon, metastaz ve anjiyogenezini yönettiği gösterilmiştir (Steiner ve ark., 2017).

Apoptozun modüle edilmesinin yanı sıra GRP78, ER yapısal bütünlüğünün korunmasına katkı sağlayarak otofajide de rol oynar ve östrojene dirençli göğüs kanseri hücrelerinde mTOR sinyalinin modülasyonunu sağlar (Cook ve ark., 2012).

Erkek üreme sisteminde GRP78'in testis, epididim ve spermde bulunduğu bilinmektedir. GRP78 nakavt sıçanların embriyonik döneminde 3,5 gün sonra ölüm gözlenmiştir (Luo ve ark., 2006). Aynı zamanda insanlarda yapılan başka bir çalışmada ise GRP78 şaperonunun yumurtalık epitel hücre yüzeyinde eksprese edilip spermatazoa ile etkileşerek kapasitasyon reaksiyonu ve fertilizasyonda önemli bir rol üstlendiği bildirilmiştir (Marin-Briggiler ve ark., 2010).

Literatürde GRP78 ve erkek infertilitesi ile ilgili çok az sayıda çalışma mevcuttur ve bu çalışmalar genelde spermatozoadaki GRP78 ekspresyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Varikoselli oligozoospermik erkeklerin sperm protein profillerinin 2D-PAGE ve kütle spektrometresi yöntemleriyle incelendiği bir çalışmada, GRP78 protein miktarının hastalarda kontrollere göre yaklaşık %25 daha düşük olduğu saptanmıştır (Hosseinifar ve ark., 2013).

Aynı proteomik analiz yaklaşım kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, idiyopatik astenozoospermik hastaların sperm hücrelerindeki GRP78 proteininin kontrollere göre çok daha düşük seviyede olduğu gösterilmiştir (Shen ve ark., 2013). GRP78 miktarının dışında fosforilasyon statüsünün de astenozoospermik erkeklerde düşük olduğunun gösterilmesi, bu protein aktivitesi ve ER stres yanıtı ile sperm motilitesi ve erkek infertilitesi arasında yakın bir ilişki olabileceğine işaret etmektedir (Lobo ve ark., 2015). İnsandaki tüm seminal plazma proteinlerinin kütle spektrometre yöntemi kullanılarak araştırıldığı büyük ölçekli bir çalışmada, GRP78 tüm ısı şoku proteinleri ailesinde seminal plazmada en çok bulunan şaperonlardan biri olarak tespit edilmiştir (Pilch ve Mann, 2006). Ancak GRP78'in seminal plazmada hangi işlevi gördüğü, infertil erkeklerde seviyesinde bir değişim olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu tez çalışması ile literatürde ilk kez OAT sendromlu infertil erkeklerin seminal plazmasında ekstrasellüler GRP78 düzeyinin ve bunun çeşitli semen parametreleriyle olan ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL-METOT

3.1. Materyal

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni (B.30.2.ODM.0.20.08/1259-1308) ile gerçekleştirilmiştir (Ek 3).

3.1.1. Hastaların Seçimi

Yapılan tez çalışmasına Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Üroloji Polikliniğine başvuran idiopatik infertilite tanısı alan oligoastenoteratozoospermik (OAT) erkekler dâhil edildi. OAT tanısı, üroloji kliniğinde yer alan androloji laboratuvarında yapılan semen analiziyle konuldu. Literatür esas alınarak yapılan güç analizi hesaplamasına göre (%95 güven ve %99,5 test gücü), çalışmaya yaşları 20-50 arasında değişen 20 hasta ve 20 sağlıklı (kontrol grubu) erkek dâhil edildi. Kontrol grubuna son 2 yılda doğal yolla çocuk sahibi olmuş fertil bireyler katıldı. Çalışmaya katılan her gönüllüye çalışma hakkında bilgi verilerek etik kurul tarafından da onaylanan ‘‘Gönüllü Olur Formu’’ imzalatıldı (Ek 1 ve Ek 2). Muayene ve yapılan testler sonucunda genetik bozukluklar, hormonal bozukluklar, varikosel, kriptorşidizm, lökositospermi ve diğer ürogenital enfeksiyonlar, obstrüktif bozukluklar, testiküler kanser, kanser kemoterapisi öyküsü ve testiküler travma teşhisi konan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

3.1.2. Örneklerin Hazırlanması

Yapılan araştırma için hastalardan ve kontrollerden 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası steril semen toplama kaplarına ejakülatlar toplanarak semen analizi yapıldı. Analizden hemen sonra toplama kabındaki örnekler önceden etiketlenen 15 mL tüplere aktarıldı ve 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Seminal plazmayı içeren süpernatant kısmı alikotlanarak 1,5 mL tüplere aktarıldı. Pellet ve süpernatant tüpleri deney aşamasına kadar -80°C’de saklandı.

3.1.3. ELISA Kitinin Özellikleri

Bu çalışma için temin edilen ELISA kiti [Elabscience, A.B.D. (E-EL-H5586)], insanda çalışılan örneklerde GRP78 konsantrasyonunun serum, plazma ve diğer biyolojik sıvılardaki in vitro kantitatif tayininde kullanılmaktadır. Bu kit endojen ve bazı rekombinant GRP78 türlerini tanımakla birlikte, hassasiyeti 0.38 ng / mL, algılama aralığı ise 0,63-40 ng / mL’dir. Kite kullanılan yöntem sandviç-ELİSA metodudur.

Bu kitle sağlanan mikro ELISA plakası, insan GRP78'e özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar ve örnekler uygun mikro ELISA plakası kuyularına eklenir ve inkübe edilerek içlerindeki GRP78 proteininin antikora bağlanması sağlanır. Daha sonra GRP78'e spesifik biyotinlenmiş tespit (ikincil) antikor ve avidin-yabanturpu peroksidazı (HRP) konjugatı her bir mikropalakaya eklenerek inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, serbest bileşenler yıkanır. Bunu takiben substrat reaktifi olan TMB (3,3', 5,5' tetrametilbenzidin) her bir kuyuya eklenir. TMB normalde indirgenmiş formda bulunur ve reaksiyona girmeden önce renksizdir. Ancak TMB, HRP ve hidrojen peroksit (H₂O₂) varlığında oksitlenerek rengi maviye döner. Başlangıçta sadece insan GRP78, biyotinlenmiş tespit antikor ve avidin-HRP konjugatı içeren kuyular mavi renkte görünür. Reaksiyon sonucu oksitlenmiş TMB konsantrasyonu çözelti içinde çökmeye neden olacak kadar yüksek seviyelere gelir. Bu sebeple doğru ölçüm yapılması ve renk gelişiminin stabilize edilmesi için reaksiyona durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır (Şekil 22). Güçlü (mineral) asitler, peroksidaz enzimatik aktivitesini inhibe etmek için durdurma reaktifi olarak kullanılır. Son aşamada asidik durdurma solüsyonu olan sülfirik asit (0.1 M, H₂SO₄) eklenerek sarı renk oluşumu gözlenir (Şekil 22).

Optik yoğunluk (OD), 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülür. OD değeri, insan GRP78 konsantrasyonuyla orantılıdır ve örneklerdeki GRP78 konsantrasyonu, numunelerin OD'si standart eğri ile karşılaştırarak hesaplanır.



Şekil 22. GRP78 ELISA kiti reaksiyon aşamalarının şematik gösterimi (E-EL-H5586'den uyarlanmıştır)

3.1.4. Kullanılan Diğer Materyaller

- Mikropipet (Finnpipette, Thermo Fisher)
- Santrifüj tüpleri (1,5 mL ve 2 mL)
- Santrifüj tüpleri (15 mL ve 50 mL)
- Tek kullanımlık pipet uçları
- Deiyonize su
- Emici kâğıt
- 37°C inkübatör (Dedeoğlu)
- Santrifüj cihazı (Sanyo, MSE)
- Vorteks (Velp, ZX³)
- Otoklav (Nüve, OT-4060)
- Mikroplaka spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher, Multiskan Go)

3.2. Metot

3.2.1. Optimizasyon Çalışmaları

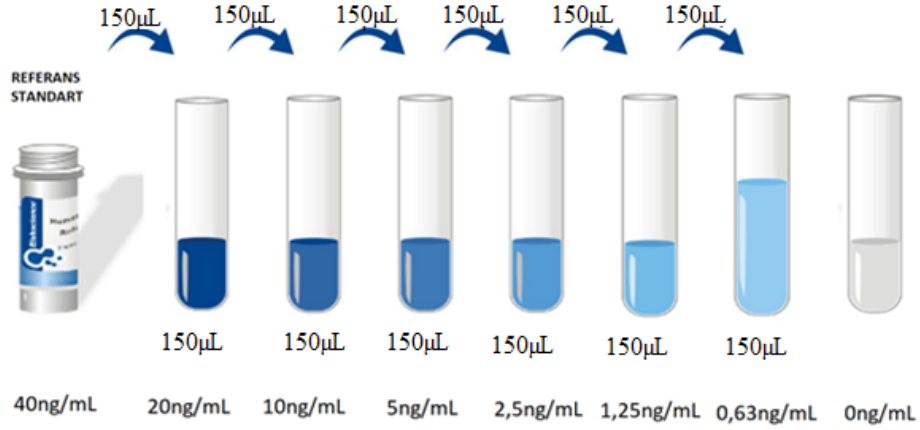
Proje ile temin edilen insan GRP78 ELISA kitinden bir tanesi her ELISA deneyi öncesi yapılması gereken optimizasyon çalışması için kullanıldı. Uygun dilüsyon katsayılarına ulaşmak ve seminal plazmadaki protein konsantrasyonunu doğru hesaplamak için iki kez optimizasyon denemesi yapıldı. Optimizasyon çalışması için analize başlamadan önce -80°C'ye kaldırılan örnekler oda ısısında 15 dk. bekletilerek çözdürüldü. Reaktifler deney öncesinde kitte belirtilen şekilde uygun konsantrasyonlara getirildi.

Yıkama Solüsyonu Hazırlanması: Yıkama işlemleri için konsantre 25X yıkama tamponu 1X olacak şekilde seyreltildi.

Biyotin Tespit Antikoru Çalışma Solüsyonu Hazırlanması: Stok konsantrasyonu 100X olan Biyotinlenmiş Tespit Antikoru son konsantrasyon 1X olacak şekilde seyreltildi.

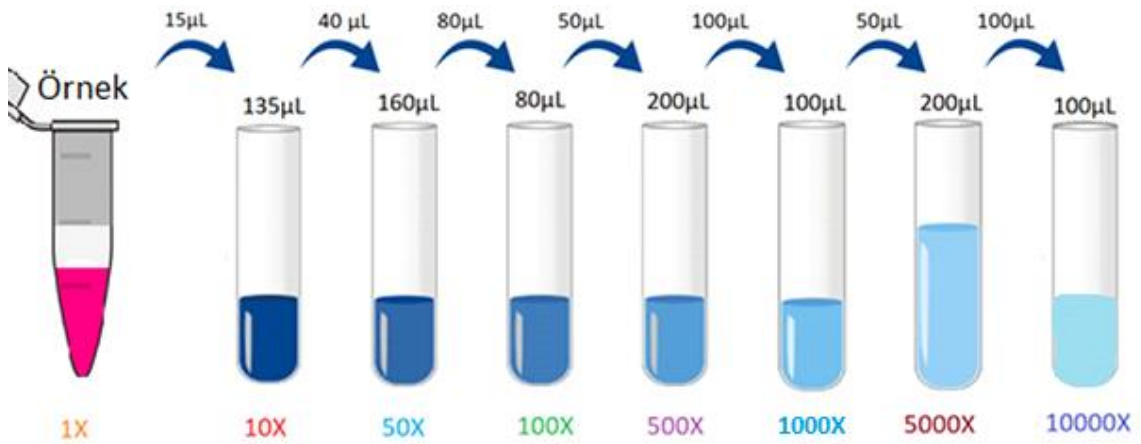
Avidin-HRP Konjugat Çalışma Solüsyonu Hazırlanması: Stok konsantrasyonu 100X olan Avidin-HRP konjugat son konsantrasyon 1X olacak şekilde seyreltildi.

Referans Standardın Hazırlanması: Standart eğri oluşturmak için kitte bulunan referans standart (40 ng/mL) hesaplanan miktarda dilüent kullanılarak sırasıyla 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 ng/mL ve kör (blank) olacak şekilde seyreltildi.

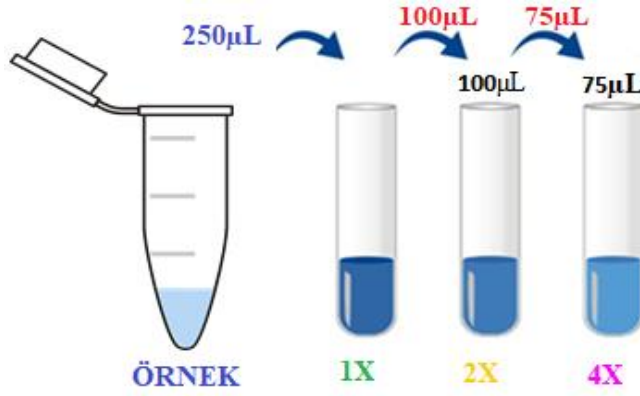


Şekil 23. Referans standardın ticari kitede belirtilen şekilde yapılan dilüsyon basamakları

Örneklerin Hazırlanması: Hem kontrol hem de hastalardan sperm konsantrasyonu yüksek ve düşük iki örnek (OK7, OK17 ve OAT7, OAT8) seçilip optimizasyon çalışması için seri dilüsyonlarla seyreltme yapıldı. İlk optimizasyonda standart çalışma solüsyonu hazırlamak için seri dilüsyonda 1X, 10X, 50X, 100X, 500X, 1000X, 5000X, 10000X katlar kullanılırken (Şekil 23), ikinci optimizasyon deneyinde birinci optimizasyondan elde edilen bilgiler ışığında ise 1X, 2X ve 4X katlar kullanıldı (Şekil 24).



Şekil 24. Birinci optimizasyon için örneklerin 1X'den 10000X'e kadar olan dilüsyon basamakları (eklenen örnek ve dilüent miktarları belirtilmiştir)



Şekil 25. İkinci optimizasyon için örneklerin 1X,2X ve 4X dilüsyon basamakları (eklenen örnek ve dilüent miktarları belirtilmiştir)

3.2.2. ELISA Yöntemi İle GRP78 Konsantrasyon Tayini

Optimizasyon çalışmalarına istinaden uygun dilüsyon katsayısı belirlenerek 20 kontrol grubu ve sperm konsantrasyonu $5 \times 10^6/\text{mL}$ ' nin üzerinde olan 20 OAT grubu olmak üzere toplam 40 örnek için iki kez ölçüm yapıldı. Farklı örnekler için 1X, 2X ve 4X katlar kullanılarak seyreltme yapıldı. Sonuçta duplike çalışılan örneklerin ortalaması alınarak hesaplamalar yapıldı.

Yıkama Solüsyonu Hazırlanması: Toplam 48 kuyucuk için her yıkamada 300 µL kullanılacağından ve yıkama işlemi toplam 4 kez yapılacağından 57,6 mL distile suya, 2,4 mL konsantre (25X) yıkama tamponu eklenerek 1X olacak şekilde seyreltme yapıldı.

Biyotin Tespit Antikoru ve Avidin-HRP Konjugat Çalışma Solüsyonu Hazırlanması: Her iki reaktif için ayrı ayrı 4950 µL dilüent içine stok konsantrasyonları 100X olan reaktiflerden 50µL konularak son konsantrasyon 1X olacak şekilde seyreltme yapıldı.

Referans Standardın Hazırlanması: Kullanılacak dilüent yapılan hesaplamalar sonucunda 3mL (1 mL standart için, 2 mL kullanılacak örnekler için) olarak belirlendi. Optimizasyon çalışmasında olduğu gibi standart eğri oluşturmak için kitte bulunan referans standart (40ng/mL) 1 mL dilüent kullanılarak sırasıyla 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 ng/mL ve kör (blank) olacak şekilde seyreltildi.

Örneklerin Hazırlanması: Hem kontrol hem de hasta grubu için gerekli miktarda örnek içerisine dilüent eklenerek örnekler optimizasyonlar sonucu elde edilen bilgilere göre 1X,2X ve 4X seyreltilerek hazırlandı.

Deney Protokolü

1. Hazırlanan tüm tüplerden 100'er μL alınarak 96-kuyulu ELISA mikro plakanın kuyularına konuldu. İlk sütuna farklı konsantrasyonlarda standart çalışma solüsyonu, kalan sütunlara örnekler eklendi. Plaka kapatıcı ile örnekler kapatılarak 37°C 'de 1,5 saat inkübe edildi.
2. Kuyulardaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra biyotinlenmiş anti-GRP78 antikoru içeren solüsyondan 100'er μL kuyulara eklendi ve plaka 1 saat daha 37°C 'de inkübe edildi.
3. Bu aşamadan sonra sıvılar aspire edilerek 300 μL yıkama tamponuyla iki kez yıkandı.
4. Yıkamaların ardından Avidin-HRP konjugatı 100 μL olacak şekilde kuyulara konuldu ve 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası sıvılar tekrar aspire edildi ve yıkama işlemi her seferinde kuyulara 300 μL konularak iki kez tekrarlandı.
6. Yıkama işleminin ardından her kuyuya 90 μL substrat reaktifi eklendi ve mikro plaka karanlık olması için folyo ile kapatılarak 20 dakika boyunca 37°C 'de inkübe edildi.
7. Ardından her kuyuya 50 μL durdurma solüsyonu eklenerek tüm kuyularda sarı renk değişimi gözlemlendi.
8. Son olarak mikropilaka, spektrofotometre cihazında okunarak 450 nm'de OD (optical density) değerleri elde edildi.

ELISA metoduyla referans standardın absorbans değerleri esas alınarak standart eğri grafikleri oluşturuldu. Bu grafikler yardımıyla hasta ve kontrollerin seminal plazmasındaki GRP78 protein konsantrasyonları belirlendi. Çıkan sonuçlar istatistiksel anlamlılıkları açısından değerlendirildi.

3.3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçlar SPSS programında (Version.22) analiz edildi. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Grupların varyanslarının homojen olup olmadığı ise Levene testi ile incelendi. Homojen olduğu kabul edilen gruplar için bağımsız iki örneklem t testi uygulandı. Farklı grupların parametrelerini karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi ve Spearman's Korelasyon analizi kullanıldı. 0,05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Semen Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Hastaların yaş ortalaması, semen hacmi, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, sperm motilitesi ve sperm morfolojisi değerleri idiyopatik infertil bireyler ile kontroller arasında karşılaştırıldı. Spermiyogram testi protokolüne uygun olarak gerçekleştirilen analizler sonucunda fertil ve infertil bireylerden elde edilen demografik özellikler ve laboratuvar sonuçları Tablo 6 ve Tablo 7’de gösterilmektedir.

Tablo 6. Kontrol gruplarının demografik ve laboratuvar bulguları (OK: Kontrol grubu, Kons: Konsantrasyon, TSS: Total Sperm Sayısı, PM: Progresif Motilite)

Kod	Yaş	Hacim (mL)	Kons. (x10 ⁶ /mL)	TSS (x10 ⁶)	Motilite %	PM %	Morfoloji %
OK1	26	2,5	32	80	55	50	4
OK2	26	2	40	80	55	50	6
OK3	25	2	21	42	45	40	8
OK4	28	4	45	180	58	53	6
OK5	31	2,5	30	75	55	50	6
OK6	39	3	52	156	55	50	5
OK7	28	2	90	180	56	51	6
OK8	25	2	40	80	65	60	8
OK9	26	4	16	64	45	40	6
OK10	39	2	32	64	55	50	8
OK11	25	3	52	156	61	56	10
OK12	28	2,5	32	80	57	52	6
OK13	40	2	32	64	45	40	5
OK14	37	3	30	90	55	50	6
OK15	26	3	27	81	65	60	7
OK16	24	3	42	126	55	50	6
OK17	25	2	21	42	41	36	6
OK18	27	2	23	46	41	36	8
OK19	33	4	18	72	61	56	8
OK20	35	2	25	50	50	45	8

Tablo 7. İdiyopatik infertil erkeklerin demografik ve laboratuvar bulguları (O: OAT bireyler, Kons: Konsantrasyon, TSS: Total Sperm Sayısı, PM: Progresif Motilite)

Kod	Yaş	Hacim (mL)	Kons (x10⁶/mL)	TSS (x10⁶)	Motilite %	PM %	Morfoloji %
O5	37	2	6	80	30	25	1
O6	32	2	10	20	15	10	1
O8	32	4	8	32	25	20	1
O9	29	4	5	20	25	20	3
O11	30	2	12	24	4	2	3
O13	22	4	7	28	20	15	3
O15	31	3	8	24	30	25	2
O16	35	2	10	20	30	20	1
O18	42	3	11	33	10	5	2
O20	31	4	5	20	15	10	2
O21	18	2	6	12	30	25	3
O22	33	2	9	18	15	10	2
O23	27	2	5	10	20	15	3
O24	48	3	12	36	17	12	2
O25	24	3	12	36	15	10	1
O26	27	3	8	24	10	5	1
O27	37	3	8	24	10	5	3
O28	26	4	6	24	13	8	1
O29	32	2	8	16	10	5	2
O30	38	2	10	20	10	5	2

Çalışmaya katılan hastalardan alınan semen hacmi 2-4 ml arasındaydı. Ayrıca sperm konsantrasyonu 5 milyon/mL'nin altında olan hastalar şiddetli OAT olarak tanımlandığından çalışmaya dâhil edilmedi.

Kontrol ve hastalara ait semen analizi değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları, minimum ve maksimum değerleri ve istatistiksel anlamlılık (p değerleri) Tablo 8'de verilmiştir.

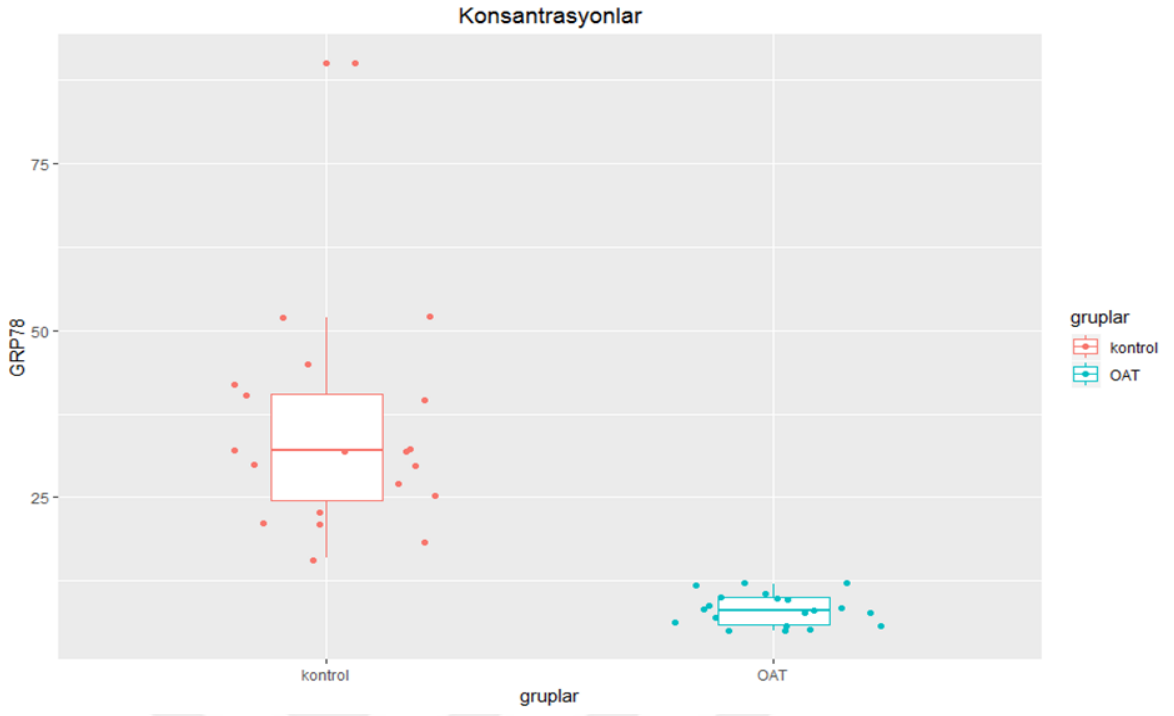
Tablo 8. Çalışmaya dâhil edilen kontrol (K) ve hastalara (OAT) ait semen analizi değerlerinin istatistiksel analizi (*p<0,05)

Parametreler	Kontrol (OK) (n=20) (Ort±SD)	OAT (n=20) (Ort±SD)	p
Yaş	29,65±5,45 (24-40)	31,55±6,92 (18-48)	0,265
Hacim (mL)	2,63±0,72 (2-4)	2,80±0,83 (2-4)	0,602
Konsantrasyon (1mL'deki Sperm Sayısı)	35±16,60 (16-90)	8,30±2,39 (5-12)	0,000*
Total Sperm Sayısı (Volüm x Konsantrasyon)	90,40±44,37 (42-180)	22,65±7,53 (10-36)	0,000*
Motilite (A+B)	53,75±7,15 (41-65)	17,70±8,14 (4-30)	0,000*
Morfoloji (%)	6,65±1,42 (4-10)	1,95±0,83 (1-3)	0,000*

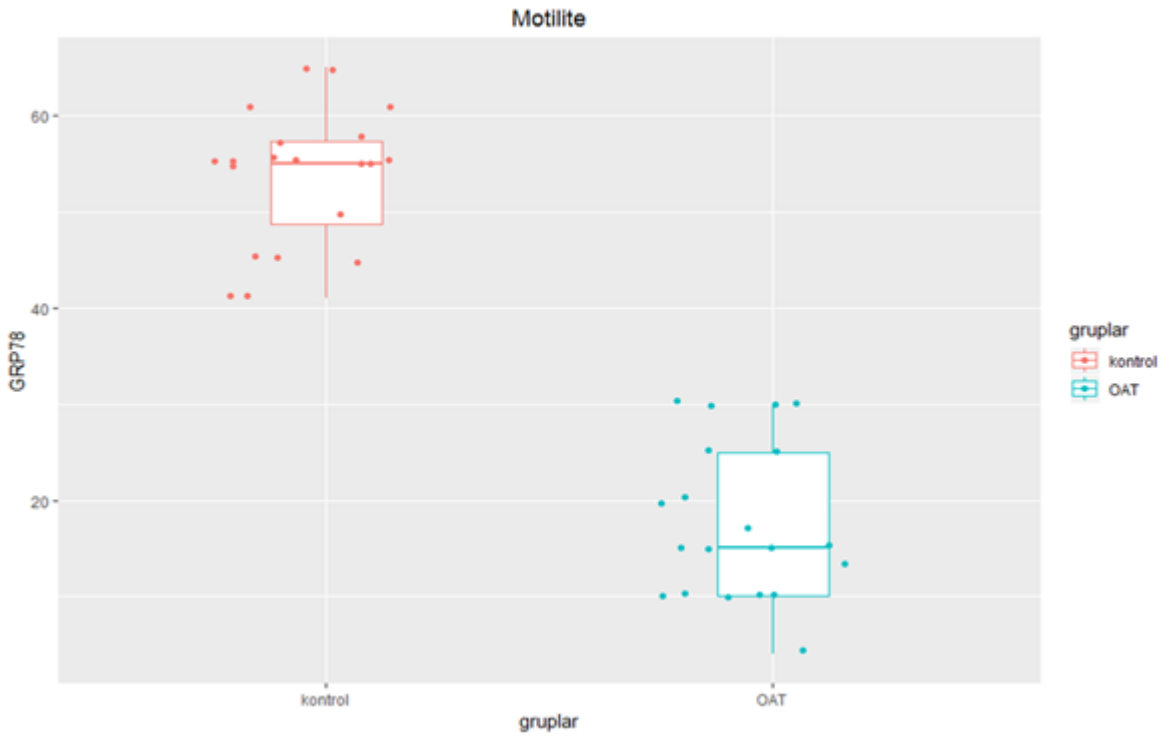
Ort: ortalama, SD: standart sapma

Grupların yaş ortalaması ve ortalama semen hacmi istatistiksel olarak birbirinden farklı değildi (p=0,265 ve p=0,602). Buna karşılık konsantrasyon, total sperm sayısı, motilite ve morfoloji seviyeleri için kontrol grubu ve OAT grubu arasında beklendiği üzere anlamlı farklar bulundu (p<0,05) (Tablo 8).

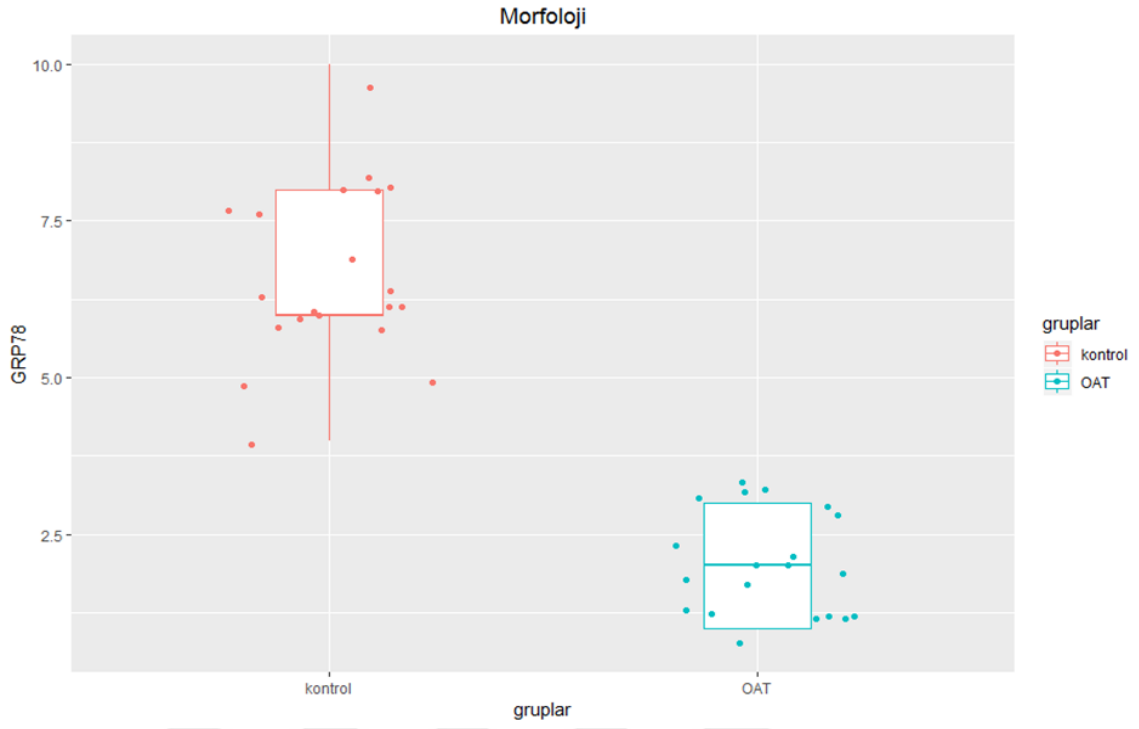
Kontrol ve OAT grubu analiz tablosuna ait verilerde anlamlı farklılık olan parametreler için çizilen grafikler aşağıda verilmiştir. Tüm grafiklerde analiz edilen değerlerin ortalaması kutu içi çizgi ile belirtilmiştir.



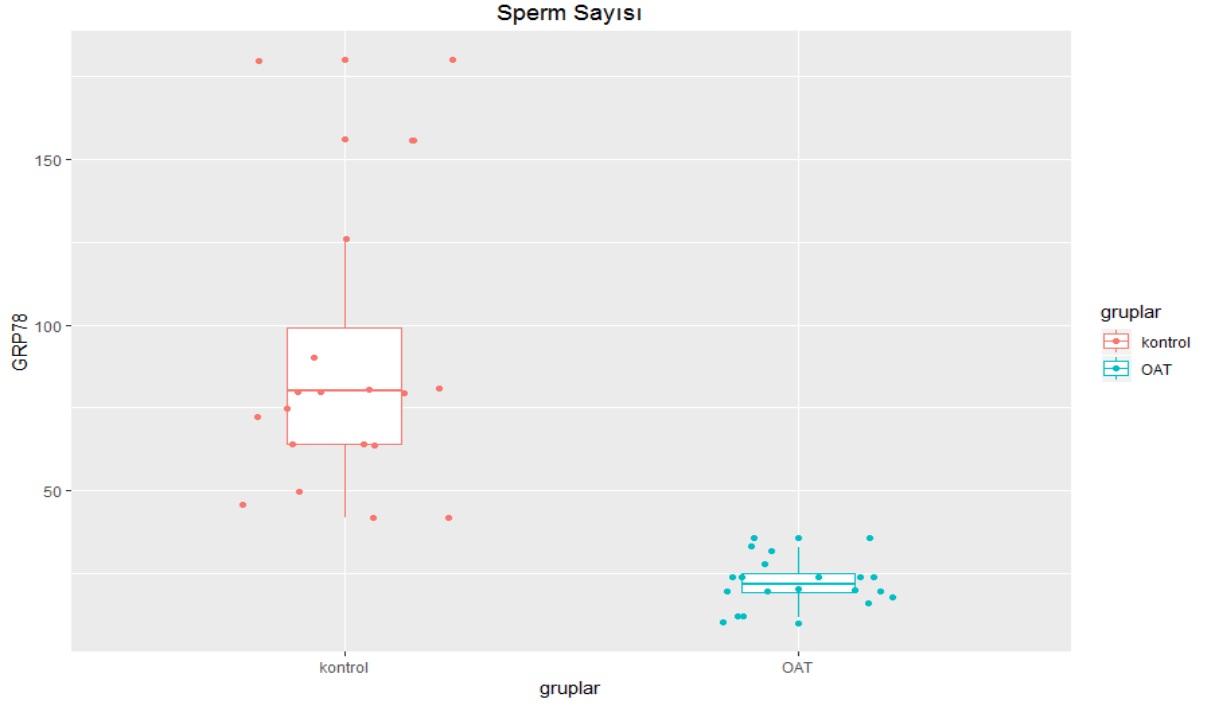
Şekil 26. Kontrol grubunun sperm konsantrasyonları ortalaması $35 \pm 16,60$ ve OAT grubunun ortalaması $(8,30 \pm 2,39)$



Şekil 27. Kontrol grubunun progresif motilite yüzdesi ortalaması $53,75 \pm 7,15$ ve OAT grubunun ortalaması $(17,70 \pm 8,14)$

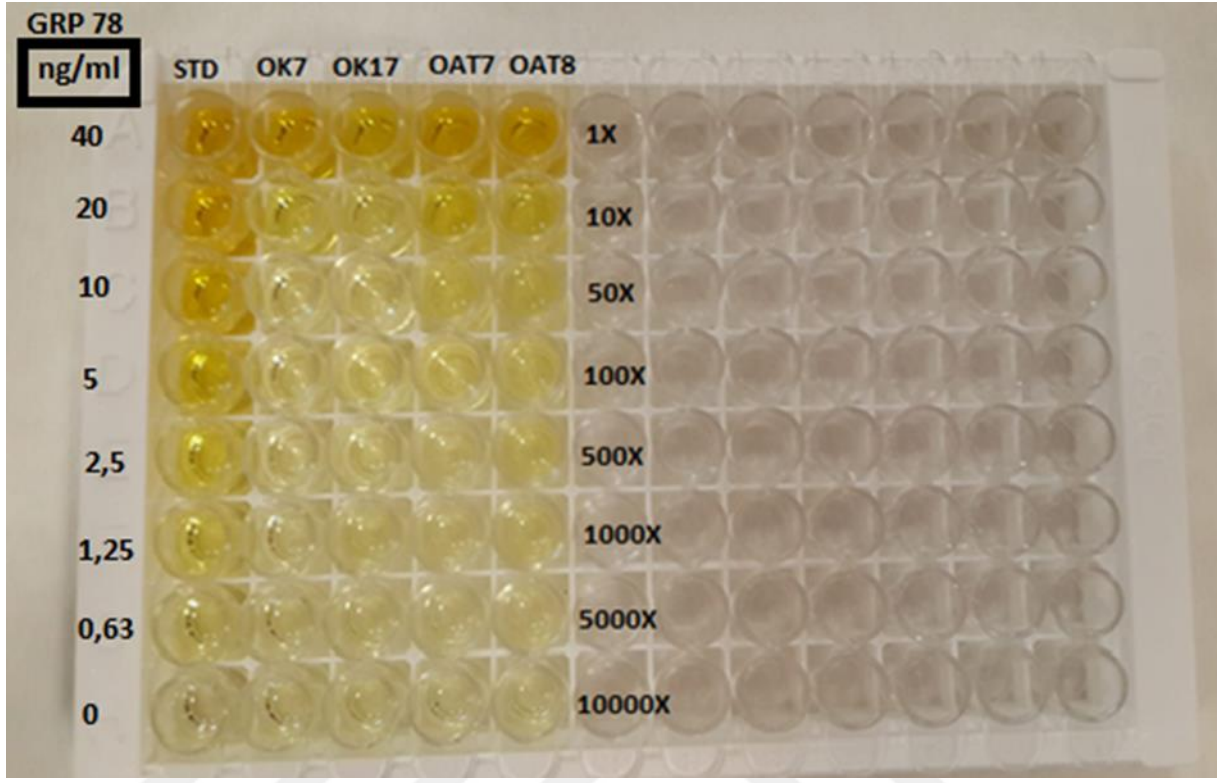


Şekil 28. Kontrol grubunun morfoloji yüzdesi ortalaması ($6,65 \pm 1,42$) ve OAT grubunun ortalaması ($1,95 \pm 0,83$)



Şekil 29. Kontrol grubunun total sperm sayısı ortalaması ($90,40 \pm 44,37$) ve OAT grubunun ortalaması ($22,65 \pm 7,53$)

4.2. Optimizasyon Sonuçları

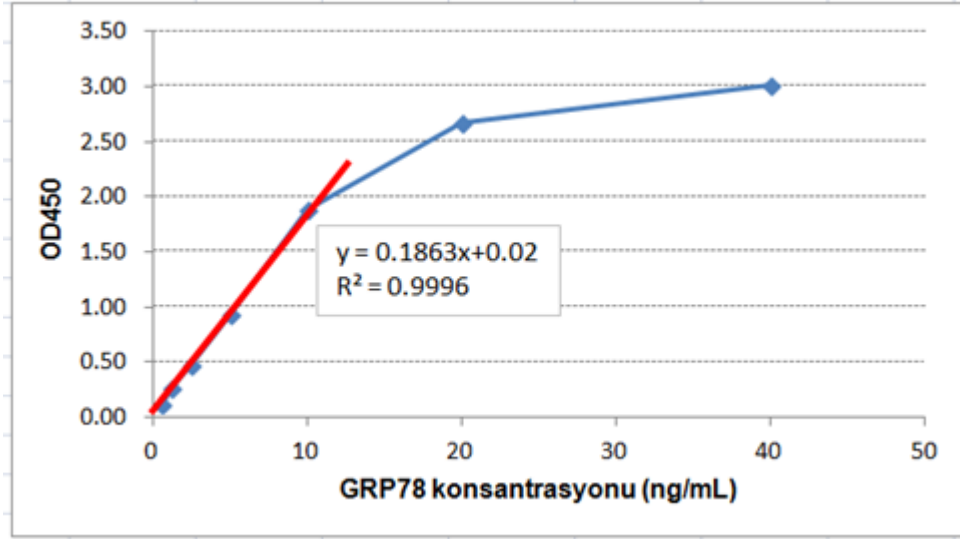


Şekil 30. Optimizasyon deneyinde 96 kuyulu insan GRP78 ELISA mikropalakasının kuyulara stop solüsyonu konulduktan sonraki görüntüsü (STD sütunu: Standart eğri için 40-0,63 ng/mL arası rekombinant GRP78 dilüsyonları, diğer sütunlar: kontrol ve hasta örneklerinin 1-10000X arası seri dilüsyonları)

Tablo 9. Blank çıkarılarak 450 nm’de standard eğri, hasta ve kontrol seri dilüsyonları için elde edilen OD değerler

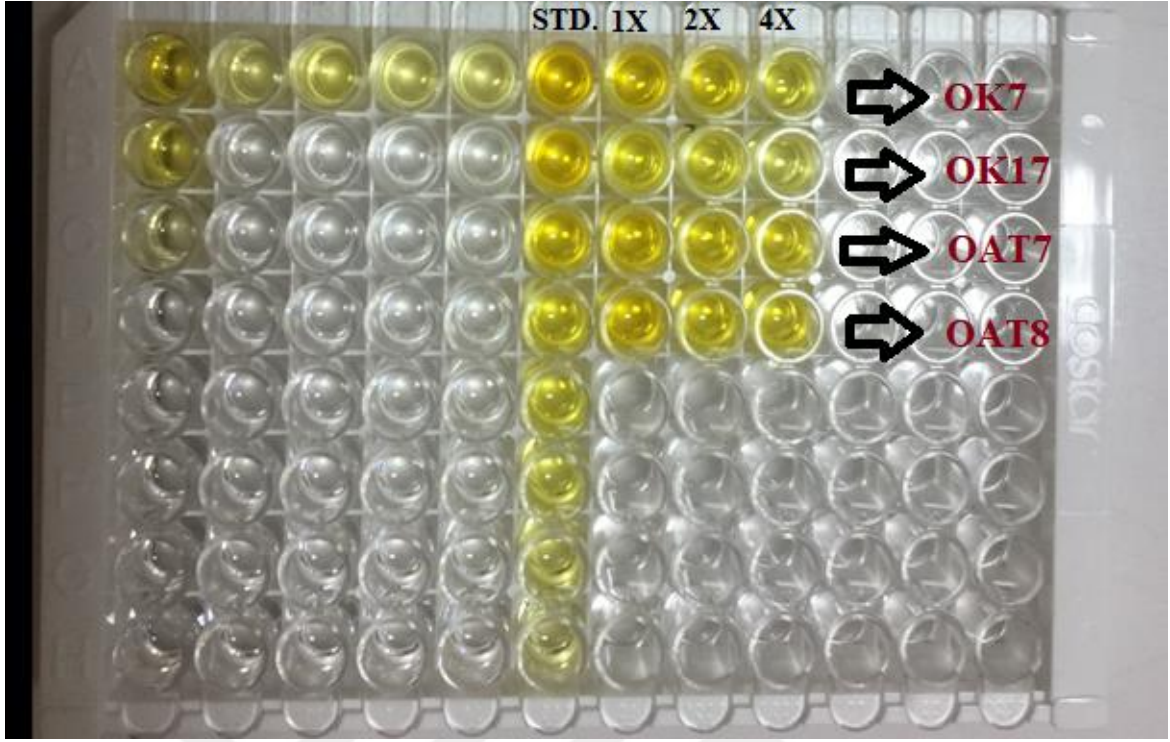
GRP78		Kat Dilüsyon	Kontrol-Hasta Optimizasyon (OD450)			
ng/mL	OD450		OK7	OK17	OAT7	OAT8
40	3.012	1x	2.179	1.218	2.338	2.348
20	2.673	10x	0.3127	0.1693	0.5705	0.4118
10	1.888	50x	0.06620	0.07080	0.1982	0.1793
5	0.9402	100x	0.07400	0.09960	0.1195	0.1246
2,50	0.4772	500x	0.03470	0.05620	0.04010	0.1219
1,25	0.2753	1000x	0.02870	0.05960	0.03150	0.07170
0,63	0.1290	5000x	0.02480	0.02230	0.004300	0.02950
0 (blank)	0	10000x	0.02150	0.02670	-0,002700	0.009100

Elde edilen OD450 değerlere göre standart rekombinant GRP78 proteini için standart eğri çizildi (Şekil 31).



Şekil 31. GRP78 proteini için seri dilüsyonlarla elde edilen standart eğri

Bu egride kitin GRP78 konsantrasyonu için lineer yanıt aralığının 0.63 ng/mL ile 10 ng/mL arasında olduğu saptandı ($R^2 = 0,9996$) (kırmızı çizgi, Şekil 31). Son iki değer olan 20 ve 40 ng/mL'de eğrinin platoya ulaştığı görüldü. Yaptığımız bu optimizasyon deneyinde kontrol ve hasta seri dilüsyonları için elde edilen OD450 değerleri incelendiğinde, 10 kat üstü dilüsyonların kullandığımız bu kit için seminal plazma GRP78 konsantrasyonunu ölçmede anlamsız olacağına karar verildi. Bir sonraki optimizasyon deneyinde hasta ve kontrol örnekleri için 1X-10X arası seri dilüsyon yapılmasına karar verildi.

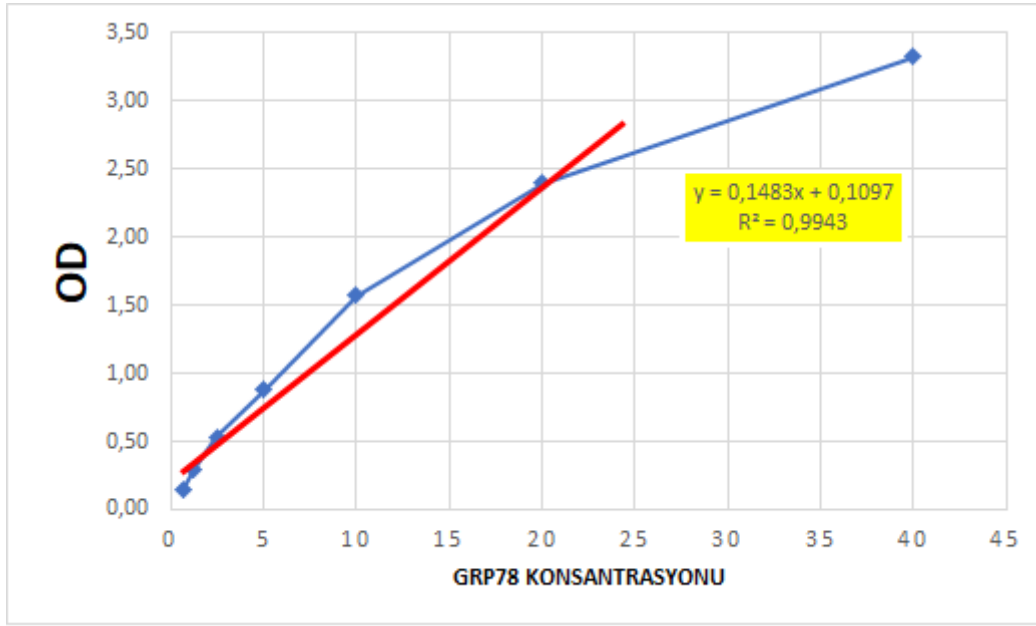


Şekil 32. İkinci optimizasyonda GRP78 ELISA mikrolakasının kuyulara stop solüsyonu konulduktan sonraki görüntüsü (STD sütunu: Standart eğri için 40-0,63 ng/mL arası rekombinant GRP78 dilüsyonları, diğer sütunlar: kontrol ve hasta örneklerinin 1X,2X ve 4X dilüsyonları)

Tablo 10. Blank çıkarılarak 450 nm’de standart eğri, hasta ve kontrol seri dilüsyonları için elde edilen OD değerler

GRP78 ng/mL	OD450	Kat Dilüsyon	Kontrol-Hastalar Optimizasyon (OD450)			
			OK7	OK17	OAT7	OAT8
40	3,323	1x	2,141	0,8445	1,821	2,002
20	2,398	2x	1,453	0,616	1,343	1,104
10	1,57	4x	0,5927	0,229	1,2	1,073
5	0,8771					
2,50	0,5336					
1,25	0,2967					
0.63	0,1452					
0(blank)	0					

Elde edilen OD450 değerlere göre standart rekombinant GRP78 proteini için standart eğri çizildi (Şekil 33). Bu egride kitin GRP78 konsantrasyonu için lineer yanıt aralığının 0.63 ng/mL ile 20 ng/mL arasında olduğu görüldü ($R^2 = 0,9943$) (kırmızı çizgi, Şekil 33). Son değer olan 40 ng/mL'de eğrinin platoya ulaştığı görüldü. Yapılan optimizasyon sonucu 2X dilüsyonun çalışmada kullanılmasına karar verildi.



Şekil 33. İkinci optimizasyon çalışmasında GRP78 proteini için seri dilüsyonlarla elde edilen standart eğri

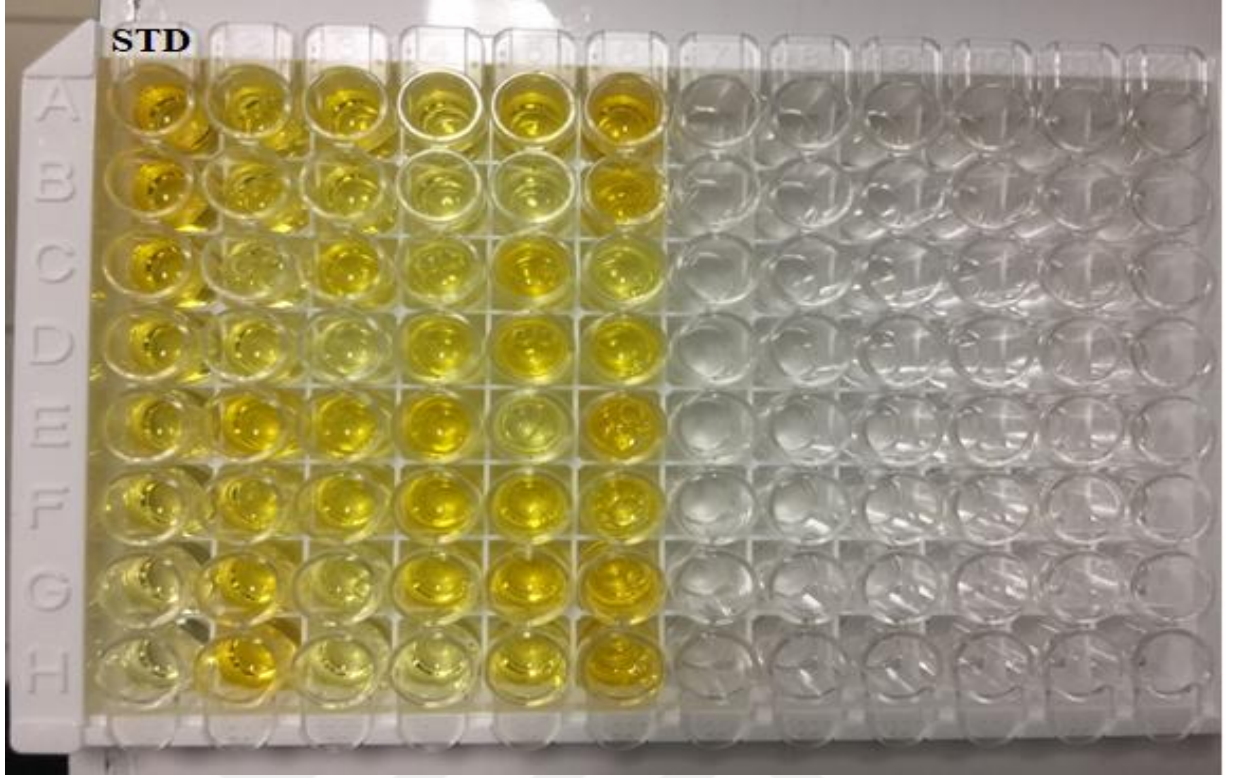
4.3. ELİSA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Optimizasyon çalışmalarına istinaden belirlenen dilüsyon katsayısına karar verildikten sonra tüm örnekler için iki farklı günde okuma yapıldı. Sandviç ELISA yöntemi ile incelenen fertil ve infertil bireylere ait toplam 40 örnekteki GRP78 tayini sonuçlarının görüntüleri Şekil 34 ve Şekil 36'da gösterildi.

İlk sütunda standart eğri için 40-0,63 ng/mL arası rekombinant GRP78 dilüsyonları, diğer sütunlarda ise kontrol ve hasta örnekleri yer almaktadır (Tablo 11). A2 ve D4 arası kuyucuklar kontrol grubuna, E4 ve H8 arası kuyucuklar ise OAT grubuna aittir. Tüm örnekler için 2X dilüsyon yapıldı ve elde edilen absorbans değerleri Tablo 12'de verildi. Bazı örneklerde 2X dilüsyonun doğru sonuç vermeyeceği düşünülerek bir sonraki okumada bu örnekler için farklı dilüsyon katsayıları kullanıldı.

Tablo 11. Örneklerin ELISA plakası üzerindeki sıralaması (A1-H1: Referans Standardın bulunduğu sütun ng/ml cinsinden verilmiştir. K: Kontrol grubuna, OAT: Hasta grubuna ait örneklerin sıralaması)

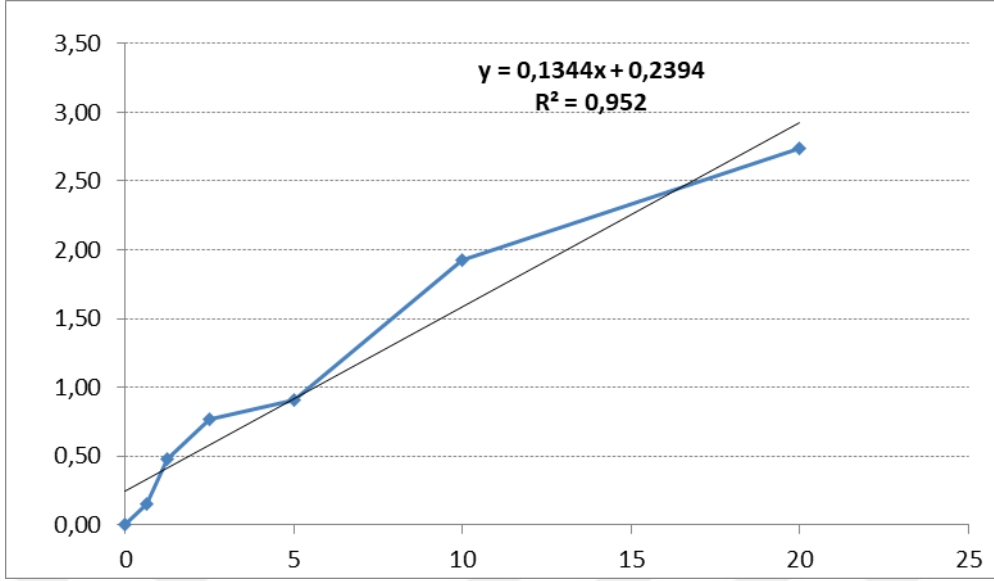
	1	2	3	4	5	6
A	40	K1	K9	K17	OAT11	OAT23
B	20	K2	K10	K18	OAT13	OAT24
C	10	K3	K11	K19	OAT15	OAT25
D	5	K4	K12	K20	OAT16	OAT26
E	2,5	K5	K13	OAT5	OAT18	OAT27
F	1,25	K6	K14	OAT6	OAT20	OAT28
G	0,63	K7	K15	OAT8	OAT21	OAT29
H	0	K8	K16	OAT9	OAT22	OAT30



Şekil 34. Tüm örneklerin ilk ölçüm ELISA testi sonucu görüntüsü (STD: referans standart sütunu)

Tablo 12. Birinci ölçüm sonrası 450nm’de ölçülen absorbans değerler (A1-H1: Referans Standart)

	1	2	3	4	5	6
A	3,27	1,62	1,61	0,6757	1,639	3,538
B	2,735	1,147	0,6695	0,3386	0,244	2,747
C	1,927	0,3304	1,24	0,6109	1,902	0,5074
D	0,9024	0,5057	0,1985	0,8913	1,558	1,36
E	0,7683	2,137	1,267	2,057	0,7394	3,292
F	0,4814	0,8401	0,9875	1,863	1,533	1,888
G	0,155	1,281	0,2813	1,2	2,122	3,156
H	BLANK-0	2,274	0,1795	0,1668	0,8	2,645

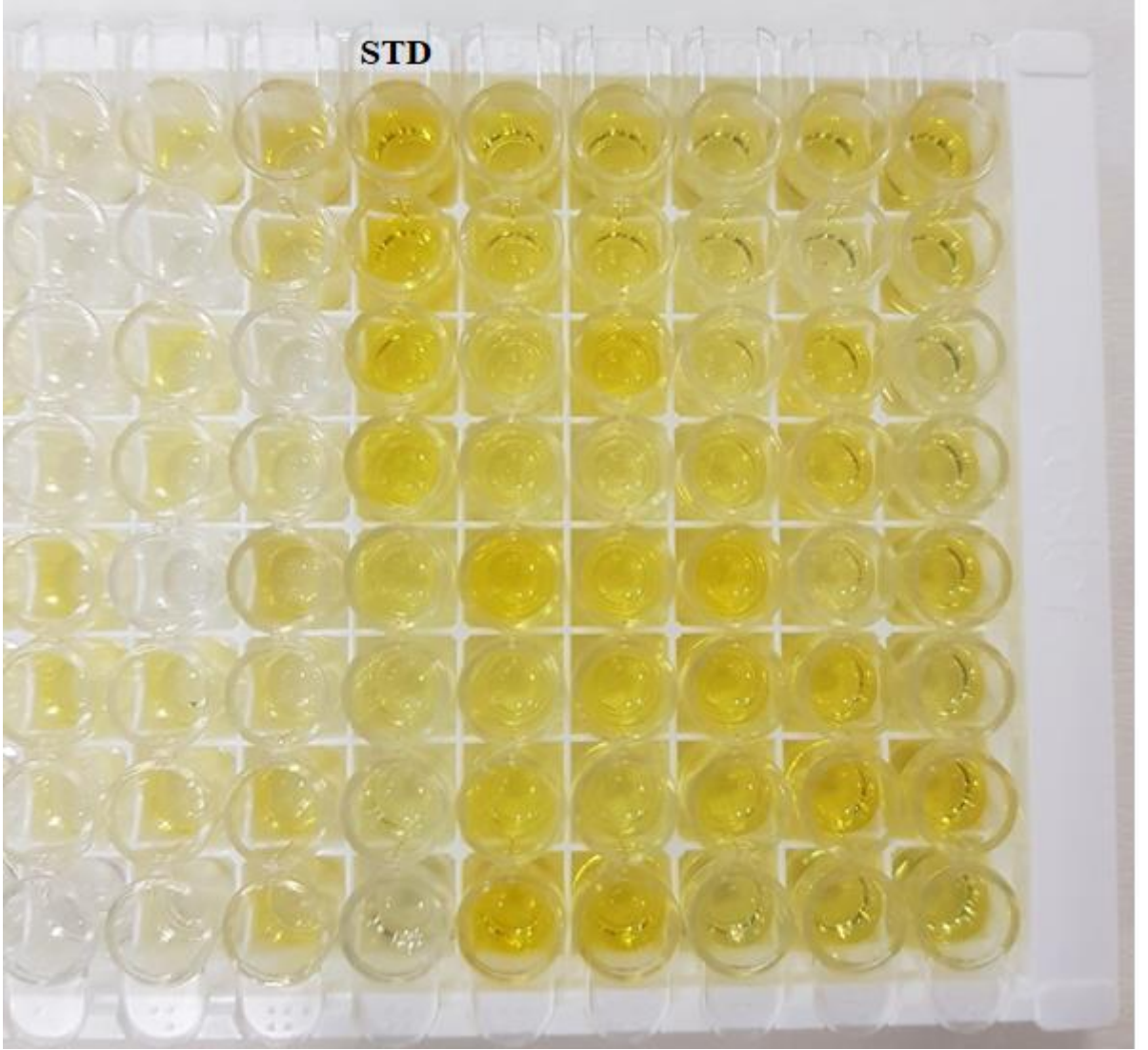


Şekil 35. Birinci ölçüm sonrası GRP78 proteini için seri dilüsyonlarla elde edilen standart eğri

Tablo 13. Birinci ölçüm için standart eğri formülü kullanılarak hesaplanan ham GRP78 konsantrasyonları (ng/mL)

	1	2	3	4	5	6
A	40,00	10,27	10,20	3,25	10,41	24,54
B	20,00	6,75	3,20	0,74	0,03	18,66
C	10,00	0,68	7,44	2,76	12,37	1,99
D	5,00	1,98	0,00	4,85	9,81	8,34
E	2,50	14,12	7,65	13,52	3,72	22,71
F	1,25	4,47	5,57	12,08	9,63	12,27
G	0,63	7,75	0,31	7,15	14,01	21,70
H	0,00	15,14	0,00	0,00	4,17	17,90

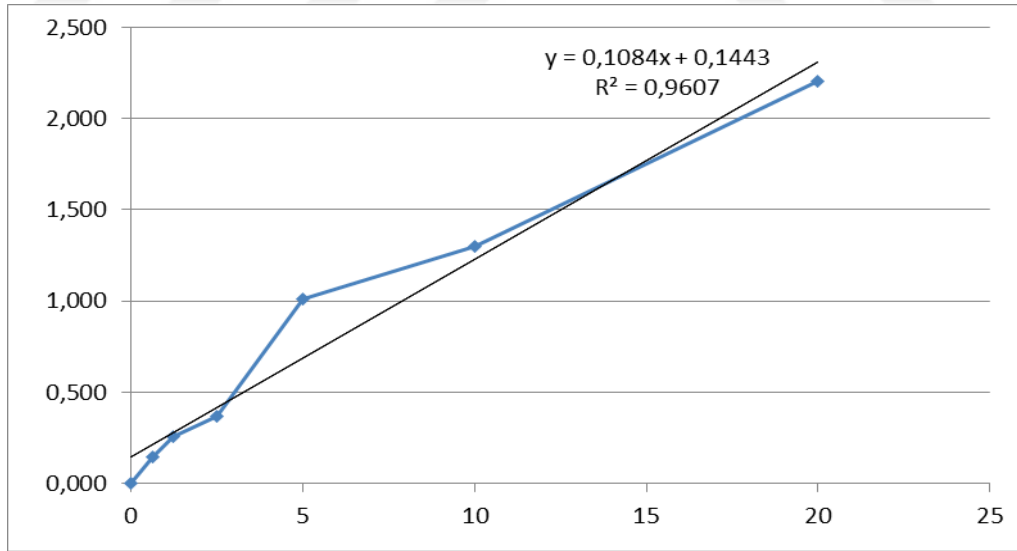
Birinci okuma sonuçlarına istinaden, ikinci ölçüm için bazı örneklerde 1X (Kontrol grubunda: C7, D8, G8, H8, B9, OAT grubunda: H9 ve B10) bazı örneklerde ise 4X (OAT grubu: A12, B12, E12, G12 ve H12) dilüsyon katları kullanıldı. Kalan örnekler 2X olacak şekilde seyreltildi. Elde edilen absorbands değerleri Tablo 14’te verildi.



Şekil 36. Tüm örneklerin ikinci ölçüm ELISA testi sonucu görüntüsü (STD: referans standart sütunu)

Tablo 14. İkinci ölçüm sonrası 450 nm’de ölçülen absorbands değerler (A7-H7: Referans Standart)

	7	8	9	10	11	12
A	2,66	1,20	1,11	0,57	0,95	1,34
B	2,21	0,88	0,86	0,41	0,24	0,71
C	1,30	0,53	1,87	0,40	1,21	0,27
D	1,01	0,54	0,38	0,73	1,01	0,48
E	0,37	1,69	1,07	1,76	0,35	1,05
F	0,25	0,53	0,97	1,29	1,47	0,48
G	0,14	0,94	0,53	0,99	1,82	1,47
H	BLANK-0	2,22	1,58	0,41	0,74	0,63



Şekil 37. İkinci ölçüm sonucu GRP78 proteini için seri dilüsyonlarla elde edilen standart eğri

Tablo 15. İkinci ölçüm için standart eğri formülü kullanılarak hesaplanan ham GRP78 konsantrasyonları (ng/mL)

	7	8	9	10	11	12
A	40,00	9,69	8,91	3,90	7,46	10,99
B	20,00	6,76	6,59	2,49	0,87	5,25
C	10,00	3,56	15,93	2,36	9,86	1,18
D	5,00	3,61	2,13	5,37	7,99	3,06
E	2,50	14,24	8,53	14,89	1,91	8,37
F	1,15	3,54	7,61	10,53	12,27	3,05
G	0,63	7,34	3,51	7,83	15,47	12,26
H	0,00	19,17	13,24	2,46	5,51	4,44

İki ölçüm için de hesaplanan ham konsantrasyonlar her bir örnek için belirlenen dilüsyon katsayısıyla çarpılarak gerçek GRP78 konsantrasyonları elde edildi. Grupların konsantrasyon sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 16 ve Tablo 17’de verildi.

Tablo 16. Kontrol grubunda her iki ölçüm sonucu hesaplanan gerçek GRP78 konsantrasyonları (ng/mL), ortalamaları ve standart sapmaları (K: Kontrol)

Kod	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Ortalama	S. Sapma
K1	20,54	19,39	19,97	0,82
K2	13,51	13,52	13,51	0,01
K3	1,35	3,56	2,46	1,56
K4	3,96	7,21	5,59	2,30
K5	28,24	28,48	28,36	0,17
K6	8,94	7,07	8,01	1,32
K7	15,50	14,68	15,09	0,58
K8	30,28	38,33	34,31	5,70
K9	20,40	17,82	19,11	1,82
K10	6,40	13,17	9,79	4,79
K11	14,89	31,86	23,37	12,00
K12	0,00	2,13	1,07	1,51
K13	15,29	17,06	16,18	1,25
K14	11,13	15,23	13,18	2,89
K15	0,62	3,51	2,07	2,04
K16	0,00	13,24	6,62	9,36
K17	6,49	7,81	7,15	0,93
K18	1,48	2,49	1,98	0,72
K19	5,53	4,71	5,12	0,58
K20	9,70	10,73	10,22	0,73

Tablo 17. OAT grubunda her iki ölçüm sonucu hesaplanan gerçek GRP78 konsantrasyonları (ng/mL), ortalamaları ve standart sapmaları (OAT: Hasta)

Kod	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Ortalama	S. Sapma
OAT1	27,05	29,77	28,41	1,93
OAT2	24,16	21,06	22,61	2,19
OAT3	14,29	15,65	14,97	0,96
OAT4	0,00	2,46	1,23	1,74
OAT5	20,83	14,91	17,87	4,18
OAT6	0,07	0,87	0,47	0,57
OAT7	24,74	19,72	22,23	3,55
OAT8	19,62	15,97	17,80	2,58
OAT9	7,44	3,82	5,63	2,56
OAT10	19,25	24,53	21,89	3,74
OAT11	28,01	30,94	29,48	2,07
OAT12	8,34	11,01	9,68	1,89
OAT13	49,09	43,97	46,53	3,61
OAT14	37,32	20,99	29,15	11,54
OAT15	3,99	2,36	3,17	1,15
OAT16	16,68	6,12	11,40	7,46
OAT17	45,43	33,49	39,46	8,44
OAT18	24,53	6,10	15,32	13,03
OAT19	43,40	49,03	46,22	3,98
OAT20	35,80	17,77	26,79	12,74

Tablo 18. Gruplara göre konsantrasyon miktarının Shapiro-Wilk normallik testi anlamlılık seviyeleri

Gruplar	p (Shapiro-Wilk)
Kontrol grubu protein konsantrasyonu	0,123*
Hasta grubu protein konsantrasyonu	0,434*

*p>0,05

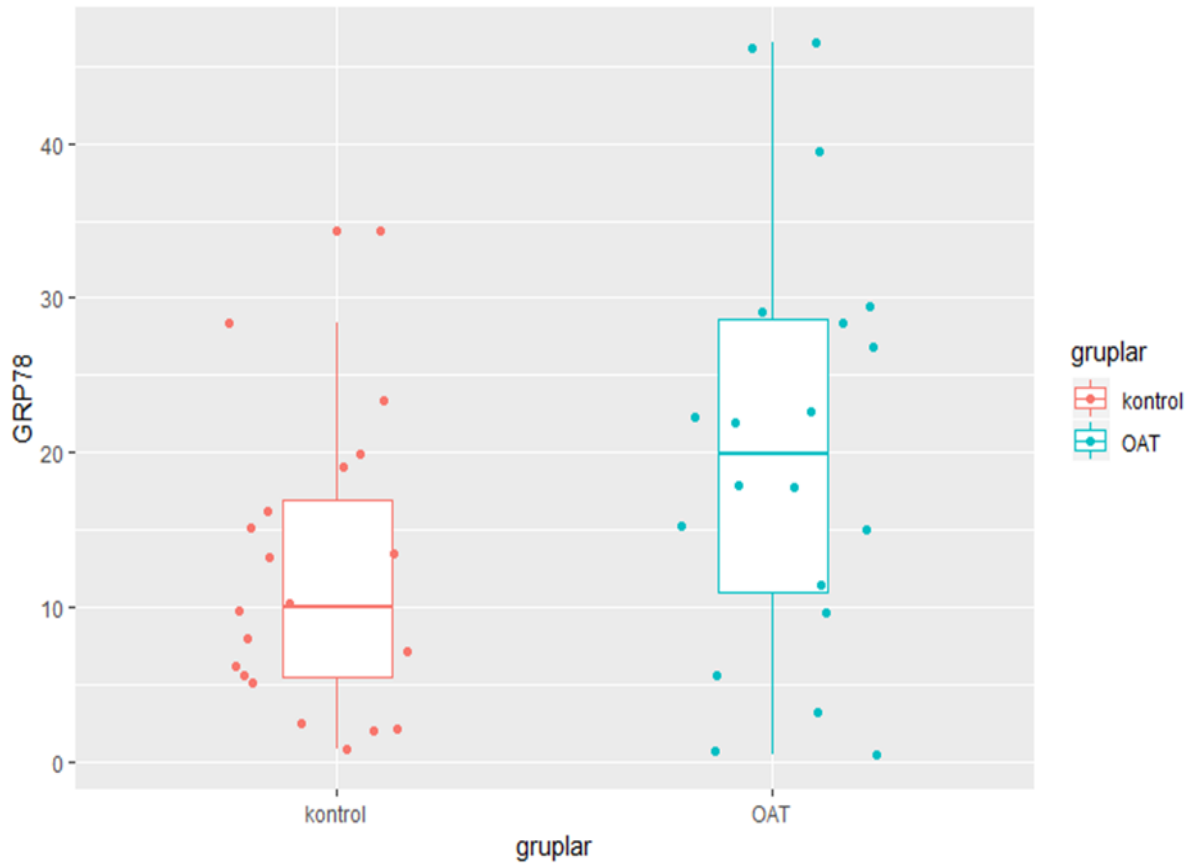
Tablo 19. Gruplara göre konsantrasyon seviyeleri özet istatistikleri ve bağımsız örneklem t testi anlamlılık seviyeleri

		Konsantrasyon (ng/mL)				p (Levene)	p (varyanslar homojen)
		Ort.	Min.	Maks.	SS		
Gruplar	Kontrol grubu GRP78 konsantrasyonu	12,16	1,07	34,31	9,21	0,121**	0,029*
	OAT GRP78 konsantrasyonu	20,52	0,47	46,53	13,63		

*p<0,05, **p>0,05

Hasta (OAT) gruplarının kontrol gruplarına göre daha yüksek protein konsantrasyon seviyesine sahip olup olmadıklarını incelemek için öncelikle gruplara ait ölçülerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testi ile incelendi ve Tablo 18’de verildi. Her iki grubun da anlamlılık seviyeleri 0,05’ten büyük olduğu için ölçülerin normal dağılıma uyduğu kabul edildi. Ardından, grupların varyanslarının homojen olup olmadığı Levene testi ile incelendi ve p=0,121>0,05 olduğu için grupların homojen olduğu kabul edildi. Bu durumda homojen gruplar için bağımsız iki örneklem t testi uygulandı ve anlamlılık seviyesi Tablo 19’da verildi. P=0,029<0,05 olduğu için grupların ortalamaları arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi.

GRP78 protein konsantrasyonu ortalaması hasta grubunda 20,52±13,63 ng/mL ve kontrol grubunda 12,16±9,21 ng/mL olarak saptandı (Tablo 19 ve Şekil 38). Bu veriler hasta grubunun ortalama GRP78 konsantrasyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 38: Kontrol ve OAT hastalarında seminal plazma GRP78 konsantrasyonları (ng/mL) ve ortalama değerleri

Kontrol ve OAT gruplarında ölçülen seminal plazma GRP78 konsantrasyonu ile sperm parametreleri arasındaki korelasyonu incelemek için Spearman korelasyon testi kullanıldı ve analiz sonuçları Tablo 20 ve Tablo 21 'de verildi.

Tablo 20. Kontrol grubuna ait GRP78 protein miktarının semen parametreleri ile arasındaki Spearman korelasyon katsayıları

		Hacim	Total Sperm Sayısı	Motilite	Morfoloji	Konsantrasyon
Kontrol Grubu GRP78 Protein Konsantrasyonu	Korelasyon	-0,104	0,156	0,068	-0,165	0,287
	p	0,664	0,512	0,776	0,487	0,219

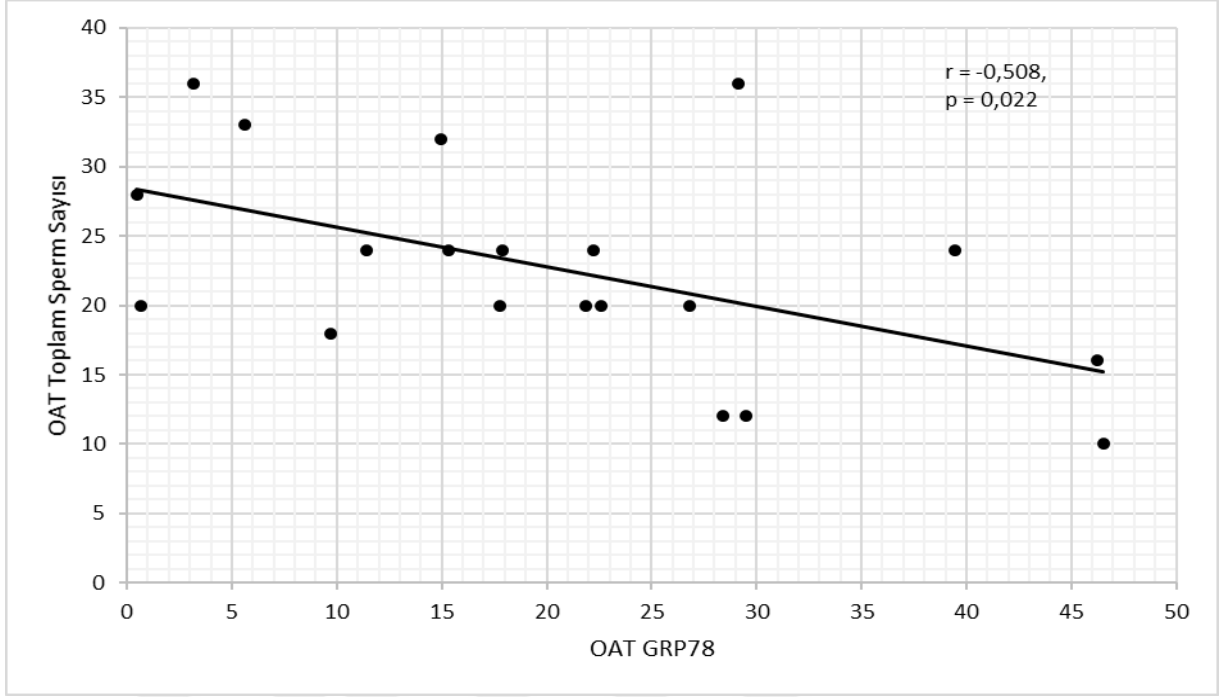
Tablo 20’de görüldüğü üzere kontrol grubu GRP78 konsantrasyonu ile semen parametreleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı. ($p>0,05$).

Tablo 21. OAT grubuna ait GRP78 protein miktarının semen parametreleri ile arasındaki Spearman korelasyon katsayıları

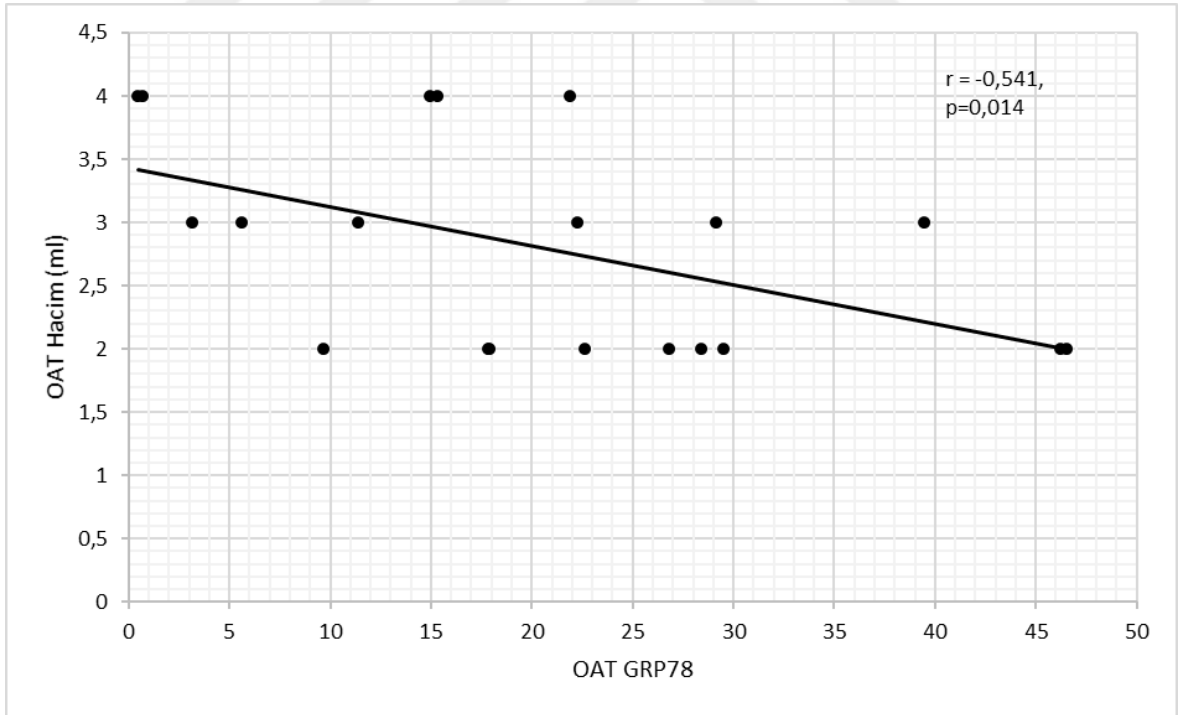
		Hacim	Total Sperm Sayısı	Motilite	Morfoloji	Konsantrasyon
OAT Grubu GRP78 Protein Konsantrasyonu	Korelasyon katsayısı	-0,541	-0,508	0,007	0,191	-0,134
	p	0,014*	0,022*	0,977	0,419	0,573

* $p<0,05$

OAT grubu seminal plazma GRP78 protein konsantrasyonu ve farklı semen parametreleri ile arasındaki korelasyonlar incelendiğinde, semen hacmi ve total sperm sayısı ile GRP78 arasında anlamlı negatif korelasyon bulundu (Tablo 21) ($p<0,05$). Anlamlı bulunan korelasyonlara ait grafikler Şekil 39 ve Şekil 40’da verildi.



Şekil 39. OAT grubu GRP78 değerleri ile OAT grubu total sperm sayıları arasındaki korelasyon



Şekil 40. OAT grubu GRP78 değerleri ile OAT grubu semen hacmi değerleri arasındaki korelasyon

5.TARTIŞMA

Literatürde erkek infertilitesi üzerine yapılan araştırmalar daha çok testiküler doku ve sperm odaklıyken, son yıllarda seminal sıvının öneminin anlaşılmasıyla birlikte bu konu hakkındaki çalışmalar hız kazanmıştır. Bilindiği üzere seminal sıvının %90'ı prostat ve seminal veziküllerden, kalan kısmı ise bulbouretral bezler (Cowper) ve epididimden salınan salgılardan oluşur (Rodriguez-Martinez ve ark., 2011). Üreme sistemi dokuları tarafından üretilen ve çiftleşme sırasında dişilere aktarılan seminal sıvı birçok protein içerir (SFP'ler). Bu proteinler dişilerde çok sayıda fizyolojik ve davranışsal değişiklik meydana getirir (Avila ve ark., 2011). Bu proteinlerin ejakülattaki miktarları her iki cinsiyetin üreme başarısını etkilemektedir. Bu nedenle seminal plazma seviyesinde fertil erkeklerle infertil erkekler arasında değişim gösteren proteinler infertilite patogenezinin anlaşılmasında önem arz etmeye başlamıştır.

İnsan seminal plazmasında 4.000 kadar protein tanımlanmıştır, ancak bu sayının 10.000 civarında olduğu düşünülmektedir (Gilany ve ark., 2014). Seminal plazma proteinleri ile metabolitleri sperm hareketliliği, kapasitasyon, sperm hücrelerinin korunması, akrozom reaksiyonu, dölleme ve embriyonik gelişim dâhil olmak üzere çeşitli üreme olaylarını düzenler. Spermin moleküler bileşenleri ve onları çevreleyen ortamlar da erkek fertilitasını ciddi şekilde etkilemektedir (Kraus ve ark., 2005).

Bu proteinlerden biri olan stres veya ısı şoku proteinleri hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda mevcut olan en korunmuş proteinlerdir (Schlesinger, 1990). Hücredeki ifadeleri çok çeşitli fizyolojik ve çevresel faktörlere cevap olarak ortaya çıkar. HSP'ler, hücrelerde normal büyüme koşulu altında (toplam proteinin %5-10'u kadar) yapısal olarak ifade edilen moleküler şaperonlar olarak görev yapar. Bununla birlikte proteinlerin katlanmasında, proteinlerin hücre içi taşınmasında, yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanmasında ve protein yıkımında esas rolü üstlenmektedir (Hendrick ve Hartl, 1993).

HSP'ler, hücre içi veya hücre dışı konumlarına bağlı olarak ikili bir işleve sahiptir. Hücre içi HSP'lerin koruyucu özelliği hücrelerin ölümcül şartlarda hayatta kalmalarını sağlar (Schmitt ve ark., 2007). Sitozoldeki koruyucu rollerinin yanı sıra, HSP'lerin, hücre dışı alanda veya plazma zarı üzerinde bulunduğu anda bağışıklık sisteminin uyarılmasında kilit rol oynadığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte genel bir görüş olarak insanlarda

serumdaki varlıkları, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar dâhil olmak üzere inflamasyon ve stres koşullarıyla ilişkilidir (Barreto ve ark., 2003).

HSP70'in hücrel strese cevap olarak çeşitli hücrelerden salgılandığı gösterilmiştir (Broquet ve ark., 2003). HSP70 sekresyonu, kültüre glial hücrelerde (Guzhova ve ark., 2001), insan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC'ler) (Lancaster ve Febbraio, 2005), insan makrofajlarında (Svensson ve ark., 2006), insan epitel hücrelerinde ve tümör hücrelerinde gösterilmiştir (Mambula ve Calderwood, 2006). Bununla birlikte HSP27, HSP60, HSP 90 ve HSP 110 gibi stres proteinleri (Davies ve ark., 2006) aynı zamanda GRP-78,- 94 calreticulin gibi glikozla düzenlenen proteinlerin, çeşitli durumlarda hücrelerden salındığı ve bitişik hücrelerle etkileşime girerek kan dolaşımına katıldığı gösterilmiştir (Robinson ve ark., 2005).

Bu proteinlerin hücrelerden neden salındığı ve işlevlerinin tam olarak ne olduğuyla ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Salgılanan HSP varlığına ilişkin ilk yayın Tytell ve ark. tarafından yapılmış, kalamarın dev aksonunda glia-akson transfer proteini olarak işlev gören "ısı şoku benzeri bir protein" üzerinedir. HSP70, HSC70 ve HSP100'ü içeren glia-akson transfer proteinlerinin ortam sıcaklığındaki artışla beraber bitişik glial hücrelerden kalamarın aksonuna transfer edildiklerini bildirmişlerdir (Tytell ve ark., 1986).

Bağımsız olarak, Hightower ve Guidon, HSP70'in, klasik salgı yollarının inhibitörleri tarafından engellenemeyen bir mekanizma ile hücrelerden salındığını göstermiştir (Hightower ve Guidon, 1989).

Basu ve arkadaşları ise, doku nekrozundan sonra salındığı varsayılan hücre dışı HSP70'in, bağışıklık sistemi reaksiyonlarını etkilediğini bildirmiştir (Basu ve ark., 2000).

Benzer şekilde Asea ve Calderwood, rekombinant HSP70'in, hücrede kalsiyum ve sitokin salınımı seviyesindeki artışa neden olarak makrofajları aktive edebileceğini göstermiştir (Asea ve ark., 2000). Bunlara ek olarak Glial hücrelerin, komşu nöronlara koruma sağlayan HSP70'i saldırdığı bildirilmiştir (Henderson ve Pockley, 2010, Zheng ve ark., 2010).

Tüm bunlarla birlikte hücre dışı HSP'nin, çeşitli biyolojik sıvılarda tespit edilmesinin ardından bazı klinik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Bunlara örnek olarak, çeşitli hastaların serumlarında HSP üyelerinin varlığı gösterilmiştir (Henderson ve Pockley, 2012).

Örneğin, dolaşımdaki HSP70 (Zhu ve ark., 2003) ve HSP60 (Zhang ve ark., 2008) seviyeleri koroner kalp hastalığı için bir risk faktörü olarak gösterilmiştir. Benzer şekilde, kardiyovasküler hastalıklara sahip bireylerin dolaşımında HSP60 tespit edilmiştir (Pockley ve ark., 2000). HSP60 aynı zamanda tip 2 diabetes mellituslu hastaların tükürük ve serumlarında gözlenmiştir (Yuan ve ark., 2011).

Bu çalışmalara ek olarak kanser hücrelerinin dolaşımında hücre stresi proteinlerinin varlığı ve tümör hacmine etkisi üzerine birçok çalışma bildirilmiştir. Bu çalışmalardan birinde, karaciğer kanserli hastalarda serum HSP70 seviyelerinin, karaciğer hastalığı olmayan kontrol grubunda ölçülenden anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Gehrmann ve ark., 2014).

Dutta ve arkadaşları ise hem sağlıklı kontrollere hem de kronik pankreatitli bireylere kıyasla, pankreas kanseri olan hastalarda serum HSP70 seviyelerinin anlamlı şekilde arttığını bildirmiştir (Dutta ve ark., 2012).

Son araştırmalar, hücre dışı HSP70'in çoğunlukla ölmekte olan hücrelerden köken aldığını göstermiştir (Basu ve ark., 2000). Bunun dışında HSP70'in aynı zamanda canlı hücrelerden de lipit salları içeren bir mekanizma vasıtasıyla aktif olarak salındığı bildirilmiştir. Sonuç olarak konvansiyonel olmayan bir salgılanma işleminden dolayı "aktif" ve hücre ölümüne bağlı "pasif" olmak üzere iki farklı hücre dışı HSP70 kaynağı olduğu düşünülmektedir (De Maio, 2011).

Ekstrasellüler HSP70'ler, serbest bir protein olarak bulunabildiği gibi ekzozomlar (Campanella ve ark., 2018) veya lizozomal endozomlar gibi lipit vezikülleri ile birlikte de bulunur (Mambula ve Calderwood, 2006). Aynı zamanda bu proteinlerin hücre dışı ortama ulaşmak için plazma zarını geçmeleri gerekir. Önceki varsayımlar göz önüne alındığında, HSP70'lerin kendiliğinden lipit katmanlarına yerleştirilebildiğine dair önemli kanıtlar bulunmuştur (Armijo ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda HSC70'in yapay lipit çift katmanlarına yerleştirildiğini göstermiştir (Arispe ve De Maio, 2000). Ek çalışmalar hem HSP70 hem de HSC70'in konsantrasyon-bağımlı olarak fosfatidilserin (PS) lipozomlarla etkileşime girdiğini göstermiştir (Arispe ve ark., 2002).

HSP'nin aktif salgılanması için önerilen diğer mekanizmalar arasında, proteinin ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıma benzeri bir sistem aracılığıyla lizozom lümenine yer değiştirdiği ve ayrıca hücrelerin endositik işlem yoluyla salındığı lizozom-endozom yolu

bulunmaktadır (Mambula ve Calderwood, 2006). Bu yol ayrıca, ER-Golgi yolundan geçmeden sitozolden hücre dışına hareket eden IL-1 salgılanması için de önerilmiştir (Andrei ve ark., 1999).

Hücre dışı veziküller (ekstrasellüler veziküller, EV'ler) lipit, protein ya da nükleik asit içeren, heterojen, nano boyutlu, zarla sınırlı yapılardır (Abels ve Breakefield, 2016). Apoptoz sonrası ortaya çıkan apoptotik cisimler (50-5000 nm), plazma zarından dökülen mikroparçacıklar (50-1000 nm) ve plazma zarı ile füzyonun ardından hücre dışı boşluğa salınan eksozomlar (40-100 nm) hücre dışı veziküllere ait oluşumlardır. Eksozomlar, endozomlarda içe doğru tomurcuklanma yoluyla intralüminal veziküller olarak oluşturulur. Plazma zarı ile füzyonun ardından, eksozomlar hücre dışı boşluğa salınır (Kalra ve ark., 2012).

EV'lerin birçok hücre tipi tarafından üretildiği bildirilmiştir. İdrar, tükürük, anne sütü, kan plazması, sinoviyal sıvı, nazal mukus, amniyotik sıvı, semen, beyin omurilik sıvısı ve safra hücrelerinden izole edilmişlerdir (Iraci ve ark., 2016). Bunun yanında genel olarak çoğu EV tipi köken aldıkları hücre türüne özgü proteinler içerir (Colombo ve ark., 2014). Bunlara örnek olarak, hücre adezyonu (integrin), antijen sunumu (MHC-I, MHC-II), stres regülasyonu (HSP70 ve HSP90), hücre migrasyonu (aktinler, miyosin, tubulin), transkripsiyon ve protein sentezini yöneten (histonlar, ribozomal proteinler, ubiquitin) gibi birçok protein verilebilir (Klingeborn ve ark., 2017).

Diğer vücut sıvılarındaki EV'lere benzer şekilde, seminal plazma EV'leri karakteristik bir protein, lipit ve RNA molekülü kümeleri içerir, ancak erkek üreme sisteminin farklı organları tarafından salınan EV'lerin bileşiminde de farklılıklar vardır (Utleg ve ark., 2003). Ayrıca, aynı organ tarafından farklı tipte EV'ler salınabilir (Poliakov ve ark., 2009). Seminal sıvıda bulunan EV'ler döllenme işlemine etki eder, sperm hareketliliğini, olgunlaşmayı düzenler ve dişi genital kanalındaki spermleri korur (Yanez-Mo ve ark., 2015).

Memelilerin seminal plazması, epididim kanalı ve erkek aksesuar bezlerinden köken alan çok sayıda EV tipi içerir (Frenette ve ark., 2006; Zijlstra ve Stoorvogel, 2016). İlginç bir şekilde seminal plazma, EV'lerin tanımlandığı ilk biyolojik sıvılardan biri olarak kabul edilmiştir. Bu EV'lerin prostattan salgılandığı düşünüldüğü için ilk olarak

prostazomlar adı verilmiş (Stegmayr ve Ronquist, 1982) ve prostasomların kapasitasyon ve akrozom ekzositozunun düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür (Bailey, 2010).

GRP78 bir ER şaperonudur ve yaygın olarak ER stresi için bir marker olarak kullanılmaktadır. Konvansiyonel olarak GRP78 bir ER lümen proteini olmasına rağmen hücre yüzeyi, sitozol, mitokondri ve çekirdek dâhil olmak üzere diğer çeşitli hücresel bölgelerde tespit edilmiştir. Bunun yanında hücre sinyal mekanizması, proliferasyon, invazyon, inflamasyon, bağışıklık reaksiyonları ve apoptozu kontrol eden yeni fonksiyonlar üstlendiğine dair pek çok kanıt ortaya çıkmaktadır (Ni ve ark., 2011). GRP78'in ER stresi ile indüksiyonu, ER bölmesinde GRP78'de bir artışa ve ayrıca, GRP78'in ER'den hücre yüzeyine transloke edilmesine yol açar (Zhang ve ark., 2010). Orada GRP78 hücre yüzeyi sinyalleşmesi için yeni bir yardımcı reseptör fonksiyonunu üstlenir. Bu nedenle, GRP78, UPR ve makrotofajiyi kontrol edebilir veya fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) / AKT proliferasyon yolaklarını aktive edebilir (Casas, 2017).

Bortezomib'in tümör anjiyojenezi üzerindeki inhibe edici etkilerinin araştırılmasında, birkaç tümör hücre hattının, tümör mikro ortamına yüksek miktarda GRP78 salgıladığı keşfedilmiştir. Bu çalışmada, tümör hücrelerinde ER stresi altında GRP78'in indüklenmesinin, GRP78'in salgılanmasına yol açtığı ve endotel hücrelerinin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak, hücre dışı GRP78'in ERK ve AKT yollarını aktive ettiği öne sürülmüştür (Kern ve ark., 2009).

Yapılan bir başka çalışmada PARP ile birlikte hücre yüzeyinde bulunan GRP78'in, PC3, HeLa ve H460 hücrelerinde ekstrinsik apoptotik yolağı tetikleyerek, TNF ile ilişkili apoptoza yol açan ligand aktivasyonuna aracılık ederek bir pro- apoptotik fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir (Burikhanov ve ark., 2009).

Yapılan diğer bir çalışmada ise insan rabdomiyosarkom hücrelerinde (TE671 ve RD), thapsigarjine (ER'nin Ca-ATPaz'ın güçlü bir inhibitörü, Tg) kronik olarak maruz kalınması sonucu stres proteini GRP78'in aşırı indüklendiği bulunmuştur. Bu bulgular genişletilerek proteinin hücre yüzeyinde eksprese edilmesine ek olarak, Tg'nin indüklediği GRP78'in hücre kültürü ortamına salınabileceği ve hücre dışı, serbest GRP78'in dolaşımında mevcut olabileceği bildirilmiştir (Delpino ve Castelli, 2002).

Salgılamaya fonksiyonuna sahip dokular ya da hücreler yüksek protein üretimi ve salgı yükü gerektirdiğinden, ER stresine cevap vermek için daha özelleşmiş bir yapıya sahiptirler. Erkek aksesuar bezleri erkek fertilitesinde salgı işlevinden sorumludur ve üreme için gerekli olan birçok seminal sıvı proteinini (SFP'ler) salgılar. Yapılan bir çalışmada erkek *Drosophila* aksesuar bezlerinde bazal seviyenin üzerinde bir aşırı ER stresinin normal üreme fonksiyonuna zarar vereceği ve infertiliteye neden olabileceği hipotezi ileri sürülmüş ve bunu araştırmak için sadece aksesuar bezlerde yanlış katlanmış protein ifadesi artırılarak veya UPR düzenleyicisi GRP78 nakavt edilerek incelemeler yapılmıştır. Sonuç olarak, aksesuar bezlerde ER stresinde aşırı artış olmuş ve buna bağlı olarak SPF üretiminde büyük bir azalma veya tamamen kayıp ile infertilite oluşumu gözlenmiştir. İlginç olarak, bu manipülasyonlar sperm üretimini, motilitesini ve transferini etkilememesine rağmen, iki model yine de infertilite ile sonuçlanmıştır (Chow ve ark., 2015).

GRP78, periovulatuvar dönemde kadınların yumurta sıvılarında da tespit edilmiştir. Bu proteinin insan yumurtalık epitel hücrelerinden salgılandığı ve döllenme sırasında sperm-zona pellucida bağlanmasını düzenleyebildiği bildirilmiştir (Marin-Briggiler ve ark., 2010).

Tüm bu bilgilerden yola çıkılarak literatürde ilk kez bizim çalışmamızda seminal plazmada bulunan GRP78 seviyesinde OAT sendromlu bireyler ile fertil bireyler arasında bir fark olup olmadığı araştırılmıştır. ELISA bulgularımız OAT grubunun GRP78 konsantrasyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 33 ve Tablo 19). Bu durum seminal plazmada GRP78 salınmasının infertil ve fertil bireyler arasında bir biyobelirteç olabileceği fikrini destekler niteliktedir.

Yayımlanan bir makalede astenozoospermik (AZS) erkeklerde GRP78 gen polimorfizmine bakılmış ve bunun yanında GRP78 promotörü mutasyonları ile serum GRP78 düzeyi arasındaki ilişki incelenmiştir. Serumda bulunan GRP78 seviyesi ELISA metodu kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuç olarak AZS hastalarının serumundaki GRP78 konsantrasyonu, kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ancak hasta-kontrol gruplarımız ve serum yerine seminal plazmada GRP78 konsantrasyonu incelememiz açısından bu çalışma ile farklılık göstermekteyiz (Qin ve ark., 2018).

Yapılan bir diğerk çalışmada ise GRP78'in kolon kanseri hücrelerinden hücre dışına eksozomlar vasıtasıyla taşındığı gösterilmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre yazarlar, kolon kanseri hücreleri tarafından gerçekleştirilen GRP78 salgılanmasını asetilasyon durumuyla ilişkilendirmişlerdir (Li ve ark., 2016). Son yıllarda bu çalışmalara benzer şekilde mikropartiküller ve eksozomlar gibi hücreSEL yapıların periferik kandaki ve farklı vücut sıvılarındaki varlığını gösteren sayısız makale yayınlanmasına rağmen, bu yapıların infertilite patogenezi üzerine olası etkileri hakkındaki çalışmalar oldukça yetersizdir.

Çalışmamızda OAT sendromlu hastalarda seminal plazma GRP78 konsantrasyonunu yüksek bulmamız ilk olarak, GRP78'in seminal plazmaya olası bir aşırı ER stresi sonucu hücre ölümüne bağılı olarak pasif şekilde taşınmış olabileceğini düşündürse de yukarıda bahsedilen çalışmalar göz önüne alındığında hücre ölümünden bağımsız farklı biyolojik süreçlerde aktif olarak taşınabileceği ihtimalinin de bulunduğunu görmekteyiz. İnfertilite özelinde GRP78'in seminal plazmaya aktif veya pasif taşınım mekanizması hakkında daha ileri düzeyde fonksiyonel çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. OAT sendromu kapsamında testiküler doku veya seminal plazmaya sekresyonu olan diğerk yapılar ER stresinde bir artış görülüp görülmediğı ve bunun artmış apoptozla bir ilişkisinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Çalışmamızda infertil bireylerde ölçülen GRP78 konsantrasyonu ile semen hacmi ve total sperm sayısı arasında anlamlı negatif korelasyon olduğu saptanmıştır (Şekil 34, Şekil 35 ve Tablo 21). Kontrol ve hastalarda semen hacminin birbirine çok yakın olması ve total sperm sayısının hastalarda kontrollere göre yaklaşık 4 kat az olması (Tablo 8), total sperm sayısı ve GRP78 düzeyi arasında bulduğumuz negatif korelasyonu daha da anlamlı hale getirmiştir. Bu durum; OAT sendromlu hastalarda GRP78'in olası bir aşırı ER stresi sonucu indüklenmiş olabileceğini, bunu takiben henüz bilinmeyen yollarla seminal plazmaya taşınmış olabileceğini ve sonuç olarak artan sperm apoptozu ile sperm sayısında düşüşe yol açabileceğini düşündürmektedir. İdiyopatik infertilite ve OAT sendromunda özellikle GRP78 ekspresyonunda artışa neden olabilecek şekilde bir ER stresinin varlığı ve seminal plazmaya GRP78 sekresyonunun kaynağı gelecekte yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla ortaya konabilecektir. Bu yöndeki araştırmalar OAT sendromu patogenezinin daha iyi anlaşılmasına ve ona uygun tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine büyük katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde erkek infertilitesinin nedenine dair birçok çalışma yapılmasına rağmen hala infertilitenin nedenleri tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan birçok çalışma infertilitede ısı şoku proteinlerinin büyük görev üstlendiğini göstermektedir. Bu proteinlerin ve etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılmasının erkek infertilitesinde terapötik hedeflerin oluşmasında kilit rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde HSP'lerin konvansiyonel hücre içi işlevlerinin dışında hücre fizyolojisi ve patolojisinde hücre dışı sinyal ligandları olarak da önemli roller oynadığı bilinmektedir. HSP'ler serbest formda salgılanmaya ek olarak eksozomlar olarak bilinen veziküler yapılar içinde hücrelerden salınabilir ve bu formda, hedef hücrelerin doğasına bağlı olarak çeşitli etkiler gösterebilir. Ancak HSP'lerin hücre dışı işlevleri oldukça karmaşıktır ve birçok hastalığın patogenezinde esas fonksiyonel mekanizma henüz bilinmemektedir.

OAT sendromlu hastalarda seminal plazmada bulunan proteinlerin işlevleri hakkındaki bilgiler oldukça yetersizdir. Bu tez çalışması ile literatürde ilk kez, OAT tanısı konulan infertil erkeklerin seminal plazmasında bulunan ısı şoku proteini GRP78 konsantrasyonu ve bunun çeşitli semen parametreleriyle olan ilişkisi incelenmiştir. Çalışmamızda OAT grubunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,7 kat yüksek konsantrasyonda GRP78 bulunması, bu proteinin infertilite için bir biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Ayrıca GRP78 konsantrasyonu ile özellikle total sperm sayısı arasında bulduğumuz anlamlı negatif korelasyon dikkat çekicidir. Ancak OAT sendromu kapsamında bu proteinin seminal plazmaya nasıl taşındığı, seminal plazmaya sekresyonu olan üreme ile ilgili yapılarda bir ER stresi aktivasyonunun olup olmadığı, bunun artmış sperm apoptozuyla ilişkisi ve apoptotik sürecin GRP78 sekresyonunu nasıl etkilediği hakkında daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalarda OAT sendromu kapsamında seminal plazmaya salınan eksozomların karakterize edilmesi, apoptotik ve ER stresi belirteçlerinin olup olmadıklarının belirlenmesi, immün sistemle olası etkileşimlerinin incelenmesi ve GRP78'in bu olaylara tam olarak hangi aşamalarda etki ettiğinin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Bunlara ek olarak hem örnek sayısı artırılarak hem de sadece OAT sendromlu değil diğer anormal sperm parametrelerine sahip bireylerde de benzer sonuçların elde edilip edilemeyeceği gelecekte araştırılması gereken konular arasındadır.

KAYNAKLAR

- Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: Biogenesis, RNA cargo selection, content, release and uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36, 301-12.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MRA. Unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13, 37.
- Agger P. Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. *Fertil Steril* 1971;22:286-97.
- Aitken R J, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB. Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 2011;141, 139-50.
- Akhmerova LG. Leydig cell development. *Usp Fiziol Nauk* 2006; 37, 28-36.
- Alam MS, Ohsako S, Tay TW, Tsunekawa N, Kanai Y, Kurohmaru M. Di(N-Butyl) Phthalate induces vimentin filaments disruption in rat sertoli cells: A possible relation with spermatogenic cell apoptosis. *Anat Histol Embryol* 2010; 39, 186-93.
- Allen R L, O'brien DA, Jones CC, Rocket DL, Eddy EM. Expression of heat shock proteins by isolated mouse spermatogenic cells. *Mol Cell Biol* 1988; 8, 3260-6.
- Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 1999; 10, 1463-75.
- Arispe N, De Maio A. ATP and ADP modulate a cation channel formed by hsc70 in acidic phospholipid membranes. *J Biol Chem* 2000; 275, 30839-43.
- Arispe N, Doh M, De Maio A. Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins hsc70 and hsp70. *Cell Stress Chaperones* 2002; 7, 330-8.
- Armijo G, Okerblom J, Cauvi DM, Lopez V, Schlamadinger DE, Kim J, Arispe N, De Maio A. Interaction of heat shock protein 70 with membranes depends on the lipid environment. *Cell Stress Chaperones* 2014; 19, 877-86.
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. Hsp70 stimulates cytokine production through a cd14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000; 6, 435-42.
- Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7, 1001-12.

- Aston KI, Conrad DFA. Review of genome-wide approaches to study the genetic basis for spermatogenic defects. *Methods Mol Biol* 2013; 927, 397-410.
- Avila FW, Sirot LK, Laflamme B, Rubinstein CD, Wolfner MF. Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annu Rev Entomol* 2011;56, 21-40.
- Avila MF, Cabezas R, Torrente D, Gonzalez J, Morales L, Alvarez L, Capani F, Barreto GE. Novel interactions of grp78: upr and estrogen responses in the brain. *Cell Biol Int* 2013; 37:521-32.
- Bailey JL. Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med* 2010; 56: 334-48.
- Barreto A, Gonzalez JM, Kabingu E, Asea A, Fiorentino S. Stress-induced release of hsc70 from human tumors. *Cell Immunol* 2003; 222: 97-104.
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12: 1539-46.
- Beckham JT, Wilmink GJ, Mackanos MA, Takahashi K, Contag CH, Takahashi T, Jansen ED. Role of hsp70 in cellular thermotolerance. *Lasers Surg Med* 2008; 40: 704-15.
- Bedford JM, Calvin H, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1973; 18: 199-213.
- Bedford JM. The status and the state of the human epididymis. *Hum Reprod* 1994;9:2187-99
- Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998; 282: 290-3.
- Bhattacharjee G, Ahamed J, Pedersen B, El-Sheikh A, Mackman N, Ruf W, Liu C, Edgington TS. Regulation of tissue factor--mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005. 25: 1737-43.
- Bjorndahl L. The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl* 2010; 12: 33-5.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22: 1506-12.
- Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. Relation between semen quality and

- fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 1998; 352: 1172-7.
- Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt C, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, Patterson D, Schellenberg G. D. Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (hspa2). *Genomics* 1994; 23: 85-93.
- Borges E, Jr. Total motile sperm count: a better way to rate the severity of male factor infertility? *Jbra Assist Reprod* 2016; 20: 47-8.
- Bostofte E, Bagger P, Michael A, Stakemann G. Fertility prognosis for infertile men: results of follow-up study of semen analysis in infertile men from two different populations evaluated by the cox regression model. *Fertil Steril* 1990; 54: 1100-6.
- Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 2006; 13: 363-73.
- Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 71-99.
- Broquet AH, Thomas G, Masliah J, Trugnan G, Bachelet M. Expression of the molecular chaperone hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J Biol Chem* 2003; 278: 21601-6.
- Brown DB, Merryman DC, Rivnay B, Houserman VL, Long CA, Honea KL. Evaluating a novel panel of sperm function tests for utility in predicting intracytoplasmic sperm injection (icsi) outcome. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 461-77.
- Buck TM, Wright CM, Brodsky JL. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 751-61.
- Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 2006; 125: 443-51.
- Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR, Rangnekar VM. The tumor suppressor par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell* 2009; 138: 377-88.
- Campanella C., Pace A, Caruso Bavisotto C, Marzullo P, Marino Gammazza A, Buscemi S, Palumbo Piccionello A. Heat shock proteins in alzheimer's disease: role and targeting. *Int J Mol Sci* 2018; 19:1-8
- Casas C. Grp78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. *Front Neurosci* 2017; 11: 177-144-45.
- Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* 2006; 8: 143-57.

- Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, Oehninger S. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2006; 21: 1791-4.
- Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, Singh NP. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl* 2006; 27: 112-20.
- Chevalier M, Rhee ., Elguindi EC, Blond SY. Interaction of murine bip/grp78 with the dnaj homologue mtj1. *J Biol Chem* 2000; 275: 19620-7.
- Chow CY, Avila FW, Clark AG, Wolfner MF. Induction of excessive endoplasmic reticulum stress in the drosophila male accessory gland results in infertility. *Plos One* 2015; 10:E0119386.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1-16.
- Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255-89.
- Cook KL, Shajahan AN, Warri A, Jin L, Hilakivi-Clarke LA, Clarke R. Glucose-regulated protein 78 controls cross-talk between apoptosis and autophagy to determine antiestrogen responsiveness. *Cancer Res* 2012; 72: 3337-49.
- Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 231-45.
- Cornejo VH, Pihan P, Vidal RL, Hetz C. Role of the unfolded protein response in organ physiology: lessons from mouse models. *Iubmb Life* 2013; 65: 962-75.
- Corsi AK, Schekman R. Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1996; 271: 30299-302.
- Curry PT, Atherton RW. Seminal vesicles: development, secretory products, and fertility. *Arch Androl* 1990; 25: 107-13.
- Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983-92.
- Dada R. Sperm dna damage diagnostics: when and why. *Transl Androl Urol* 2017; 6: S691-S694.

- Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *Febs Lett* 2007; 581: 3702-10.
- Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ., Johnson E, Wardle TD, Andrew SM, Williams JH. Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and groel. *Clin Exp Immunol* 2006; 145:183-9.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova, N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven GA. Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1327-32.
- De Kretser DM, Huidobro C, Southwick GJ, Temple-Smith, PD. The role of the epididymis in human infertility. *J Reprod Fertil Suppl* 1998; 53: 271-5.
- De Los Rios J, Cardona WD, Berdugo J A, Correa C, Arenas A, Olivera-Angel M, Pena RB, Cadavid AP. Sperm parameters in 113 subjects after recent fatherhood did not correlate with WHO standards. *Arch Esp Urol* 2004; 57: 147-52.
- De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999; 11: 1-12.
- De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the stress observation system: a form of communication during injury, infection, and cell damage. it is never known how far a controversial finding will go! dedicated to ferruccio ritossa. *Cell Stress Chaperones* 2011; 16: 235-49.
- Delpino A, Castelli M. The 78 Kda glucose-regulated protein (grp78/bip) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep* 2002; 22: 407-20.
- Diemer T, Desjardins C. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999.; 5: 120-40.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy E. M. Targeted gene disruption of hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 3264-8.
- Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, Van Den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts L. C. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17: 13-6.
- Dong D, Ni M, Li J, Xiong S, Ye W, Virrey J.J, Mao C, Ye R, Wang M, Pen L, Dubeau L, Groshen S, Hofman FM, Lee AS. Critical role of the stress chaperone grp78/bip in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Res* 2008; 68: 498-505.

- Doroudgar S, Glembotski CC. New concepts of endoplasmic reticulum function in the heart: programmed to conserve. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 55: 85-91.
- Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol* 2014; 11: 278-88.
- Dun MD, Aitken R J, Nixon B. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update* 2012; 18: 420-35.
- Dutta SK, Girotra M, Singla M, Dutta A, Otis Stephen F, Nair PP, Merchant NB. Serum Hsp70: a novel biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Pancreas* 2012; 41: 530-4.
- Eddy EM. Hsp70-2 Heat-shock protein of mouse spermatogenic cells. *J Exp Zool* 1998; 282: 261-71.
- Eddy EM. Role of heat shock protein hsp70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 1999; 4:23-30.
- El-Melegy NT, Ali ME. Apoptotic markers in semen of infertile men: association with cigarette smoking. *Int Braz J Urol* 2011; 37: 495-506.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
- Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* 2002; 17: 2904-11.
- Emery BR, Carrell, DT. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl* 2006; 8: 131-42.
- Esteves SC. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *J Hum Reprod Sci* 2013; 6:176-82.
- Esteves SC, Roque M, Bedoschi G, Haahr T, Humaidan P. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nat Rev Urol* 2018; 15: 535-562.
- Evers JL. Female subfertility. *Lancet* 2002; 360: 151-9.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 2207-16.

- Fawcett DW. Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Adv Biosci* 1973;**10**:83-99.
- Feng G, Kaplowitz N. Colchicine protects mice from the lethal effect of an agonistic anti-fas antibody. *J Clin Invest* 2000; **105**: 329-39.
- Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. The human y chromosome's azoospermia factor b (azfb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet* 2003; **40**: 18-24.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 2007; **14**: 734-45.
- Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta C. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; **65**: 606-10.
- Fernandez-Fernandez MR, Valpuesta JM. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. *F1000res* 2018; **7**: 754,41
- Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 2000; **103**: 273-82.
- Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 152-6.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; **22**: 226-39.
- Frenette G, Girouard J, Sullivan R. Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis. *Biol Reprod* 2006; **75**: 885-90.
- Fu Y, Li J, Lee AS. Grp78/Bip inhibits endoplasmic reticulum bik and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. *Cancer Res* 2007; **67**: 3734-40.
- Fu Y, Wey S, Wang M, Ye R, Liao CP, Roy-Burman P, Lee AS. Pten null prostate tumorigenesis and akt activation are blocked by targeted knockout of er chaperone grp78/bip in prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 19444-9.
- Fujisawa M, Ishikawa T. Soluble forms of fas and fas ligand concentrations in the seminal plasma of infertile men with varicocele. *J Urol* 2003; **170**: 2363-5.

- Gajate C, Mollinedo F. Lipid rafts and fas/cd95 signaling in cancer chemotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2011; 6: 274-83.
- Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53: 35-40.
- Gehrmann M, Cervello M, Montalto G, Cappello F, Gulino A, Knape C, Specht HM, Multhoff G. Heat shock protein 70 serum levels differ significantly in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Front Immunol* 2014; 5: 307-358.
- Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carre-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B, Association Des Cytogeneticiens De Langue F. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for icsi: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* 2001; 16: 82-90.
- Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, Karakitsios K, Mantzavinos T, Giotitsas N, Loutradis D, Dimitriadis F, Saito M, Miyagawa I, Tzoumis P, Sylakos A, Kanakas N, Moustakareas T, Baltogiannis D, Touloupides S, Giannakis D, Fatouros M, Sofikitis N. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl* 2006; 8:643-73.
- Gilany K, Moazeni-Pourasil RS, Jafarzadeh N, Savadi-Shiraz E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. *Mol Reprod Dev* 2014; 81: 84-6.
- Goldstein M, Schlegel P. *Surgical and Medical Management of Male Infertility*. Cambridge University Press 2013.
- Govin J, Caron C, Escoffier E, Ferro M, Kuhn L, Rousseaux S, Eddy EM, Garin J, Khochbin S. Post-meiotic shifts in hspa2/hsp70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 2006; 281: 37888-92.
- Green DR, Ferguson TA. The role of fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 917-24.
- Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiol Rev* 2016; 96: 1-17.
- Guzel E, Arlier S, Guzeloglu-Kayisli O, Tabak MS, Ekiz T, Semerci N, Larsen K, Schatz F, Lockwood CJ, Kayisl UA. Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 75-421
- Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliova O, Fridlanskaya I, Tytell M, Cheetham M, Margulis B. In vitro studies show that hsp70 can be released by glia and that exogenous hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res* 2001; 914: 66-73.

- Heckert LL, Griswold MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 129-48.
- Hellwig CT, Passante E, Rehm M. The molecular machinery regulating apoptosis signal transduction and its implication in human physiology and pathophysiology. *Curr Mol Med* 2011; 11: 31-47.
- Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 2000; 33: 341-65.
- Henderson B, Pockley AG. Molecular chaperones and protein-folding catalysts as intercellular signaling regulators in immunity and inflammation. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 445-62.
- Henderson B, Pockley AG. Proteotoxic stress and circulating cell stress proteins in the cardiovascular diseases. *Cell Stress Chaperones* 2012; 17: 303-11.
- Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 349-84.
- Hightower LE, Guidon PT, Jr. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol* 1989; 138: 257-66.
- Holdcraft RW, Braun RE. hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 2004; 27: 335-42.
- Hosseinifar H, Gourabi H, Salekdeh GH, Alikhani M, Mirshahvaladi S, Sabbaghian M, Modarresi T, Gilani MA. Study of sperm protein profile in men with and without varicocele using two-dimensional gel electrophoresis. *Urology* 2013; 81: 293-300.
- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-88.
- Inoue S, Tomasini R, Rufini A, Elia AJ, Agostini M, Amelio I, Cescon D, Dinsdale D, Zhou L, Harris IS, Lac S, Silvester J, Li WY, Sasakin M, Haight J, Brustle A, Wakeham A., Mckerlie C, Jurisicova A, Melino G, Mak TW. Tap73 is required for spermatogenesis and the maintenance of male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 1843-8.
- Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B, Pluchino S. Focus on extracellular vesicles: physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 171.
- Johnson L, Barnard JJ, Rodriguez L, Smith EC, Swerdloff RS, Wang XH, Wang C. Ethnic differences in testicular structure and spermatogenic potential may predispose

- testes of asian men to a heightened sensitivity to steroidal contraceptives. *J Androl* 1998; 19: 348-57.
- Johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998; 70:397-411.
- Juyena, NS, Stelletta C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl* 2012; 33: 536-51.
- Kaler LW, Neaves WB. Attrition of the human leydig cell population with advancing age. *Anat Rec* 1978; 192: 513-8.
- Kalra H, Simpson RJ, Ji, H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borrás FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Kramer-Albers EM, Lim SK, Llorente A, Lotvall J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Nolte-T Hoen EN, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TS, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sanchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, Van Balkom BW, Vazquez J, Vidal M, Wauben MH, Yanez-Mo M, Zoeller M, Mathivanan S. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *Plos Biol* 2012; 10: E1001450.
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 105-11.
- Kathrins M, Niederberger C. Diagnosis and treatment of infertility-related male hormonal dysfunction. *Nat Rev Urol* 2016; 13: 309-23.
- Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002; 110: 1389-98.
- Kern J, Untergasser G, Zenzmaier C, Sarg B, Gastl G, Gunsilius E, Steurer M. Grp-78 secreted by tumor cells blocks the antiangiogenic activity of bortezomib. *Blood* 2009;114: 3960-7.
- Kim SK, Lee HJ, Yang H, Kim HS, Yoon YD. Prepubertal exposure to 4-tert-octylphenol induces apoptosis of testicular germ cells in adult rat. *Arch Androl* 2004 ; 50: 427-41.
- Kim SK, Yoon YD, Park YS, Seo JT, Kim JH. Involvement of the fas-fas ligand system and active caspase-3 in abnormal apoptosis in human testes with maturation arrest and sertoli cell-only syndrome. *Fertil Steril* 2007; 87: 547-53.

- Klingeborn, M., Dismuke, W. M., Skiba, NP, Kelly U, Stamer WD, Bowes Rickman C. Directional exosome proteomes reflect polarity-specific functions in retinal pigmented epithelium monolayers. *Sci Rep* 2017; 7: 4901.
- Kraus M, Ticha M, Zelezna B, Peknicova J, Jonakova V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar aqn spermadhesins. *J Reprod Immunol* 2005; 65: 33-46.
- Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25: 271-85.
- Krausz C, Forti G, Mcelreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl* 2003; 26:70-5.
- Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson R K, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 2001; 29: 279-86.
- Lachance C, Fortier M, Thimon V, Sullivan R, Bailey JL, Leclerc P. Localization of Hsp60 and grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa. *Int J Androl* 2010;33: 33-44.
- Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of hsp70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 2005; 280: 23349-55.
- Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU. Successive action of dnak, dnaj and groel along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 1992 ; 356: 683-9.
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005; 118: 265-7.
- Lee AS. The Glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 504-10.
- Lee AS. The Er chaperone and signaling regulator grp78/bip as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005; 35: 373-81.
- Lee AS, Delegeane AM, Baker V, Chow PC. Transcriptional regulation of two genes specifically induced by glucose starvation in a hamster mutant fibroblast cell line. *J Biol Chem* 1983; 258: 597-603.
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheid K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 138: 2081-8.

- Li YJ, Song TB, Cai YY, Zhou JS, Song X, Zhao X, Wu XL. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci* 2009; 108: 427-36.
- Li Z, Srivastava P. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol*, Appendix 1, Appendix 1t 2004; 7:452-12.
- Li Z, Zhuang M, Zhang L, Zheng X, Yang P, Li Z. Acetylation modification regulates Grp78 secretion in colon cancer cells. *Sci Rep* 2016; 6: 30406.
- Liberek K, Galitski TP, Zylicz M, Georgopoulos C. The DnaK chaperone modulates the heat shock response of escherichia coli by binding to the sigma 32 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3516-20.
- Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest* 1987; 80: 281-5.
- Lima SB, Cenedeze MA, Bertolla RP, Filho PA, Oehninger S, Cedenho AP. Expression of the hspa2 gene in ejaculated spermatozoa from adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril* 2006; 86: 1659-63.
- Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 399-425.
- Lobo V, Rao P, Gajbhiy R, Kulkarn V, Parte P. Glucose regulated protein 78 phosphorylation in sperm undergoes dynamic changes during maturation. *Plos One* 2015; 10: E0141858.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithie O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11162-6.
- Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999; 140: 1709-17.
- Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene* 2013; 32: 805-18.
- Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. Grp78/Bip is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 5688-97.

- Ma XH, Piao SF, Dey S, Mcafee Q, Karakousis G, Villanueva J, Hart LS, Levi S, Hu J, Zhang, G, Lazova R, Klump V, Pawelek JM, Xu X, Xu W, Schuchter LM, Davies MA, Herlyn M, Winkler J, Koumenis C, Amaravadi RK. Targeting er stress-induced autophagy overcomes braf inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* 2014; 124: 1406-17.
- Maekawa M, O'brien DA, Allen RL, Eddy E. M. Heat-Shock cognate protein (hsc71) and related proteins in mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 1989; 40: 843-52.
- Majzoub A, Agarwal A. Antioxidant therapy in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Indian J Urol* 2017; 33: 207-214.
- Mambula SS, Calderwood SK. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol* 2006; 177: 7849-57.
- Marin-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverria MF, Munuce MJ, Ghersevich S, Caille AM, Hellman U, Corrigall VM, Vazquez-Levin MH. Glucose-regulated protein 78 (Grp78/Bip) is secreted by human oviduct epithelial cells and the recombinant protein modulates sperm-zona pellucida binding. *Fertil Steril* 2010; 93: 1574-84.
- Mascarenhas M N, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *Plos Medicine* 2012;9.
- Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 670-84.
- Mayorga-Torres BJM, Camargo M, Cadavid AP, Du Plessis SS, Cardona-Maya WD. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? *Andrologia* 2017; 49:1-75
- Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20: 432-8.
- Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, Horst J. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection--prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod* 1998; 13: 576-82.
- Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: A Review. *Int J Androl* 1995; 18: 169-84.
- Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Hart JP, Johnson CE, Pizzo SV. The role of Grp 78 in alpha 2-macroglobulin-induced signal transduction. evidence from ma interference that the low density lipoprotein receptor-related protein is associated

- with, but not necessary for, Grp 78-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277: 42082-7.
- Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Wang F, Pizzo SVA. Novel receptor function for the heat shock protein Grp78: Silencing Of Grp78 gene expression attenuates alpha2m*-induced signalling. *Cell Signal* 2004; 16: 929-38.
- Moghbelinejad S, Mozdarani H, Ghoraieian P, Asadi R. Basic and clinical genetic studies on male infertility in iran during 2000-2016: a review. *Int J Reprod Biomed* 2018; 16: 131-148.
- Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and hsp 70-2 knockout mice. *Dev Dyn* 1997; 208: 125-36.
- Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ. Immunoglobulin binding protein (bip) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem* 1997; 272: 4327-34.
- Murphy CJ, Richburg JH. Implications of sertoli cell induced germ cell apoptosis to testicular pathology. *Spermatogenesis* 2014; 4: E979110.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'rourke K, Shevchenk A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. Flice, a novel fadd-homologous ice/ced-3-like protease, is recruited to the cd95 (fas/apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-27.
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 2006; 85: 629-34.
- Ni M, Lee AS. Er chaperones in mammalian development and human diseases. *Febs Lett* 2007;581: 3641-51.
- Ni M, Zhan Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical Grp78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J* 2011; 434: 181-8.
- Ni M, Zhou H, Wey S, Baumeister P, Lee AS. Regulation of perk signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the upr regulator Grp78/Bip. *Plos One* 2009; 4: E6868.
- Nuti F, Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 504-13.
- O'flynn O'brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A Review. *Fertil Steril* 2010; 93: 1-12.

- Oakberg EFA. Description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 1956; 99: 391-413.
- Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 2015; 10: 173-94.
- Omran HM, Bakhiet M, Dashti MG. Dna integrity is a critical molecular indicator for the assessment of male infertility. *Mol Med Rep* 2013;7: 1631-5.
- Oren M, Rotter V. Introduction: P53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci*,2002; 55, 9-11.
- Palermo GD, Colombero LT, Hariprashad JJ, Schlegel PN, Rosenwaks Z. Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing icsi. *Hum Reprod* 1999; 17: 570-5.
- Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 1999; 276: E310-6.
- Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of Grp78 in physiologic and pathologic stress. *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23:150-6.
- Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol* 2006; 7: R40.
- Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, De Faire U, Frostegard J. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* 2000; 36:303-7.
- Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate* 2009; 69: 159-67.
- Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 2009; 50: 336-47.
- Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum Reprod* 1999; 14: 2513-6.
- Pouyssegur J, Shiu RP, Pastan I. Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell* 1977; 11: 941-7.
- Povey AC, Stocks SJ. Epidemiology and trends in male subfertility. *Hum Fertil (Camb)* 2010; 13: 182-8.

- Purandhar K, Jena PK, Prajapati B, Rajput P, Seshadri S. Understanding the role of heat shock protein isoforms in male fertility, aging and apoptosis. *World J Mens Health* 2014; 32: 123-32.
- Qin H, Wang R, Pang X, Wei Y, Yang F, Wang J. Association of Grp78 promoter polymorphisms and serum Grp78 level with risk of asthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2018; 35: 2223-2231.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the dnaj/hsp40 family, the crucial partners for hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* 2006 ; 63: 2560-70.
- Quinones QJ, De Ridder GG, Pizzo SV. Grp78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. *Histol Histopathol* 2008; 23: 1409-16.
- Rahman MS, Kwon WS, Pang MG. Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2017; 84: 749-759.
- Ramsay RG, Ciznadija D, Mantamadiotis T, Anderson R, Pearson R. Expression of stress response protein glucose regulated protein-78 mediated by c-myb. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1254-68.
- Rao RV, Peel A, Logvinova A, Del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the er chaperone Grp78. *Febs Lett* 2002; 514: 122-8.
- RatoL, Alves MG, Socorro D, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol* 2012; 9: 330-8.
- Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein Grp78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of atp binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 20915-24.
- Redgrove KA, Mclaughlin EA. The role of the immune response in chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: a double-edged sword. *Front Immunol* 2014; 5: 534.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997; 34: 9-19.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-30.
- Reynolds N, Cooke H. J. Role of the daz genes in male fertility. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 72-80.

- Riccioli A, Salvati L, D'alessio A, Starace D, Giampietri C, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E. The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. *Andrologia* 2003; 35: 64-70.
- Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE. Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci* 2005; 25: 9735-45.
- Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 2011; 66 Suppl 1: 11-22.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 1997; 16: 2262-70.
- Roosen-Runge EC, Holstein AF. The human rete testis. *Cell Tissue Res* 1978; 189: 409-33.
- Rosser MF, Washburn E, Muchowski PJ, Patterson C, Cyr DM. Chaperone functions of the e3 ubiquitin ligase chip. *J Biol Chem* 2007; 282: 22267-77.
- Rowinsky EK. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9394-407.
- Sabanegh E, Agarwal A. Male infertility. In: Wein, A. (Ed.), *Campbell's urology*. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA 2012.
- Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 39-51.
- Sakkas D, Mariethoz M, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251: 350-5.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003;7: 428-32.
- Schlegel PN. Causes of azoospermia and their management. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16:561-72.
- Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 1990; 265:12111-4.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 15-27.

- Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv* 2000; 74: 281-6.
- Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;74: 739-89.
- Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1501-15.
- Shen S, Wang J, Liang J, He D. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J Urol* 2013; 31: 1395-401.
- Shu CW, Sun FC, Cho JH, Lin CC, Liu PH, Chen PY, Chang MD, Fu HW, Lai YK. Grp78 and raf-1 cooperatively confer resistance to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 2008; 215:627-35.
- Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999;4:38-47.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, Mcpherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock, S, Rohlfling T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RW, Wilson RK, Rozen S, Page DC. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003 ; 423: 825-37.
- Smith KD, Rodriguez-Rigau LJ, Steinberger E. Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fertil Steril* 1977; 28:1314-9.
- Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G992-9.
- Souza A, Schorr-Lenz AM, Lucca F, Bustamento-filho IV. The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. *Anim. Reprod* 2017; 1234-1244.
- Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 1982;10: 253-7.
- Steiner N, Borjan B, Hajek R, Johrer K, Gobel G, Willenbacher W, Kern J, Gunsilius Untergasser G. Expression and release of glucose-regulated protein-78 (Grp78) in multiple myeloma. *Oncotarget* 2017; 8: 56243-56254.

- Stetler RA, Gan Y, Zhang W, Liou AK, Gao Y, Cao G, Chen J. Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 2010; 92: 184-211.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-78.
- Summers DW, Douglas PM, Ramos CH, Cyr DM. Polypeptide transfer from hsp40 to hsp70 molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* 2009; 34: 230-3.
- Sun FC, Wei S, Li CW, Chang YS, Chao CC, Lai YK. Localization of Grp78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J* 2006; 396: 31-9.
- Svensson PA, Asea A, Englund MC, Bausero MA, Jernas M, Wiklund O, Ohlsson BG, Carlsson LM, Carlsson B. Major role of hsp70 as a paracrine inducer of cytokine production in human oxidized ldl treated macrophages. *Atherosclerosis* 2006; 185: 32-8.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Embo Rep* 2006; 7: 880-5.
- Takano S, Wadhwa R, Mitsui Y, Kaul SC. Identification and characterization of molecular interactions between glucose-regulated proteins (Grps) mortalin/grp75/peptide-binding protein 74 (pbp74) and grp94. *Biochem J* 2001;357: 393-8.
- Takemoto H, Yoshimori T, Yamamoto A, Miyata Y, Yahara I, Inoue K, Tashiro Y. Heavy chain binding protein (Bip/Grp78) and endoplasmic reticulum chaperone are exported from the endoplasmic reticulum in rat exocrine pancreatic cells, similar to protein disulfide-isomerase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 296: 129-36.
- Terada K, Yomogida K, Imai T, Kiyonari H, Takeda N, Kadomatsu T, Yano M, Aizawa S, Mori M. A type I DNAJ homolog, dja1, regulates androgen receptor signaling and spermatogenesis. *Embo J* 2005;24: 611-22.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
- Ting J, Lee AS. Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *Dna* 1988; 7: 275-86.
- Triantafilou M, Fradelizi D, Triantafilou K. Major histocompatibility class one molecule associates with glucose regulated protein (Grp) 78 on the cell surface. *Hum Immunol* 2001;62: 764-70.
- Tytell M, Greenberg SG, Lasek RJ. Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res* 1986; 363: 161-4.

- Utleg AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, Hood L, Lin B. Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate* 2003; 56: 150-61.
- Vogt PH. Azoospermia factor (azf) in yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 81-93.
- Wahlstrom T, Huhtaniemi I, Hovatta O, Seppala M. Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57:825-30.
- Wang M, Ye R, Barron E, Baumeister P, Mao C, Luo S, Fu Y, Luo B, Dubeau L, Hinton DR, Lee AS. Essential role of the unfolded protein response regulator Grp78/bip in protection from neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* 2010; 17:488-98.
- Wang PJ, Mccarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of x-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 2001;27: 422-6.
- Wang W, Lu N, Xia Y, Gu A, Wu B, Liang J, Zhang W, Wang Z, Su J, Wang X. Fas and Faslg polymorphisms and susceptibility to idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 141-7.
- Wei X, Li Q, Han Z, Lin D, Yu P. Differences in caspase-8 and -9 activity and sperm motility in infertile males of li nationality in china. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 4721-6.
- Wey S, Luo B, Lee AS. Acute inducible ablation of Grp78 reveals its role in hematopoietic stem cell survival, lymphogenesis and regulation of stress signaling. *Plos One* 2012a ; 7:E39047.
- Wey S, Luo B, Tseng CC, Ni M, Zhou H, Fu Y, Bhojwani D, Carroll WL, Lee AS. Inducible knockout of Grp78/Bip in the hematopoietic system suppresses pten-null leukemogenesis and akt oncogenic signaling. *Blood* 2012b; 119: 817-25.
- Wisniewska M, Karlberg T, Lehtio L, Johansson I, Kotenyova T, Moche M, Schuler H. Crystal structures of the atpase domains of four human Hsp70 isoforms: Hspa11/Hsp70-Hom, Hspa2/Hsp70-2, Hspa6/Hsp70b', And Hspa5/Bip/Grp78. *Plos One* 2010; 5:E8625.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30:87-5.
- Wu X, Wan S, Lee MM. Key factors in the regulation of fetal and postnatal leydig cell development. *J Cell Physiol* 2007; 213: 429-33.

- Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colas E, Cordeiro-Da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Kramer-Albers EM, Laitinen S, Lasser C, Lener T, Ligeti E, Line A, Lipps G, Llorente A, Lotvall J, Mancek-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'T Hoen EN, Nyman TA, O'driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pallinger E, Del Portillo HA, Reventos J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sanchez-Madrid F, Santarem N, Schallmoser K, Ostefeld MS, Stoorvogel W, Stukelj M, Van Der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; 4: 270-66.
- Yang J, Zong Y, Su J, Li H, Zhu H, Columbus L, Zhou L, Liu Q. Conformation transitions of the polypeptide-binding pocket support an active substrate release from hsp70s. *Nat Commun* 2017; 8: 1201.
- Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 1998; 273:33741-9.
- Yuan J, Dunn P, Martinus RD. Detection of Hsp60 in saliva and serum from type 2 diabetic and non-diabetic control subjects. *Cell Stress Chaperones* 2011; 16: 689-93.
- Zakeri ZF, Wolgemuth DJ, Hunt CR. Identification and sequence analysis of a new member of the mouse Hsp70 gene family and characterization of its unique cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 2925-32.
- Zhang H, Chen W, Duan CH, Zhang CF. Overexpression of Hspa2 is correlated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* 2013; 11: 141.
- Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008; 454: 455-62.
- Zhang LH, Zhang X. Roles of Grp78 in physiology and cancer. *J Cell Biochem* 2010;110: 1299-305.
- Zhang X, He M, Cheng L, Chen Y, Zhou L, Zeng H, Pockley AG, Hu FB, Wu T. Elevated heat shock protein 60 levels are associated with higher risk of coronary heart disease in chinese. *Circulation* 2008; 118: 2687-93.
- Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator Grp78/Bip. *J Biol Chem* 2010; 285:15065-75.

- Zheng H, Nagaraja GM, Kaur P, Asea EE, Asea A. Chaperone function of recombinant hsp72 produced in insect cells using a baculovirus expression system is retained. *J Biol Chem* 2010;285: 349-56.
- Zhou H, Zhang Y, Fu Y, Chan L, Lee AS. Novel mechanism of anti-apoptotic function of 78-kda glucose-regulated protein (Grp78): endocrine resistance factor in breast cancer, through release of b-cell lymphoma 2 (Bcl-2) from Bcl-2-interacting killer (Bik). *J Biol Chem* 2011; 286:25687-96.
- Zhu D, Dix DJ, Eddy EM. Hsp70-2 is required for Cdc2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* 1997;124: 3007-14.
- Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, Csako G, Rott D, Zalles-Ganley A, Ogunmakinwa, J., Halcox J, Epstein SE. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1055-9.
- Zijlstra C, Stoorvogel W. Prostatosomes as a source of diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J Clin Invest* 2016; 126: 1144-51.
- Zorzi E, Bonvini P. Inducible Hsp70 in the regulation of cancer cell survival: analysis of chaperone induction, expression and activity. *Cancers (Basel)* 2011; 3:3921-56.

EKLER

Ek.1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu Örneği

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ *

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

İdiyopatik erkek infertilitesi ile seminal plazma GRP78 protein düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

İnfertilite (doğal yolla çocuk sahibi olamama), çiftlerin en az bir yıl korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye girmelerine rağmen çocuk sahibi olamamaları durumudur. İnfertilite tüm nüfusun yaklaşık %15'inde görülmektedir ve bunun yarısının erkeklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Erkeklerde görülen doğal yolla çocuk sahibi olamama durumu günümüzde gelişmiş toplumlar başta olmak üzere tüm dünyada giderek artan bir

şekilde görülmeye başlayan güncel bir sağlık sorunudur. Bu sorunun bir bölümünün genetik, hormonal veya sperm çıkışı ile ilgili problemlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Tüm bu faktörlerin normal olduğu ancak yine de çocuk sahibi olamama durumunun söz konusu olduğu vakalar nedeni bilinmeyen infertilite vakaları olarak adlandırılır. Araştırmanın konusu bu tür nedeni bilinmeyen infertilite vakalarında semende bulunan bir proteinin (GRP78) seviyesindeki değişim üzerinedir. Bu proteinin sperm hücresinde stres artışı sonucu hücre ölümü ve dolayısıyla sperm sayısında azalma ile ilişkili olabileceği araştırmanın temel dayanak noktasıdır. Bu araştırma ile ayrıca farklı semen değişkenleri (sperm şekli, hareketliliği vb) ile bu proteinin miktarı arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Bu araştırma için sizin teşhis ve tedavi amacıyla vermiş olduğunuz semen örneğinizden sadece küçük bir miktar alınacaktır. Bu örnekten sperm hücreleriniz ve hücre üstünde kalan semen sıvınız ayrılacak ve her ikisi de uygun koşullarda saklanacaktır. Daha sonra semen sıvınızda bulunan bir proteinin miktarı o proteini tanıyan antikorlar aracılığıyla ölçülecektir. Bütün araştırma bu semen örneği üzerinde yapılacaktır ve size tedavi için uygulanacak işlemler haricinde ek bir ilaç uygulaması veya canınızı acıtacak girişimsel herhangi bir uygulama yapılmayacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığınız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir. Bu araştırmaya katılmak için semen örneğinizden küçük bir miktarı vermeniz yeterli olacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Bu araştırma için başvurmuş olduğunuz merkezde teşhis için vermiş olduğunuz semen örneği haricinde size herhangi bir uygulama yapılmayacağı için bu çalışmanın sizin için herhangi bir yan etkisi, ağrı oluşturma veya sağlığınıza zarar verme riski söz konusu değildir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Bu çalışma ile nedeni bilinmeyen doğal yolla çocuk sahibi olamama ile ilgili olarak sperm hücresi kaybında rol alan bir proteinin semende belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırılacaktır. Bu çalışmaya katılarak hastalığın oluş mekanizmasında bilinmeyen bir bileşenin ortaya çıkarılmasında ve gelecekte bu tanıyı alan hastalar için tedavi geliştirilebilmesinde önemli bir katkı sağlamış olacaksınız.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilirim. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici tarafından karşılanacak ve size veya bağlı olduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca Çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod (“Kod”) numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Düzenleyici otorite veya diğer denetim kurumları tarafından atanmış kişiler, doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler. Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Doktorunuzun çalıştığı kurum yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır. Doktorunuzdan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahibsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahibsiniz. Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Yrd. Doç. Dr. M. Alper ARSLAN
0554 6821070

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:

Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışmadan çıkmak istemeniz halinde ayrılabilirsiniz. Bu durumda tedavi kurumunda göreceğiniz bakım ve tedaviler etkilenmeyecek, herhangi bir aksama olmayacaktır.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR?

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilirim ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

***Açıklamalar katılımcının anlayabileceği açıklıkta ve teknik terimlerden uzak bir şekilde belirtilmelidir.**

Ek.2: Gönüllü Anket Formu

Hasta ve Kontrol Grupları İçin	
Hastanın Adı, Soyadı:	
Dosya No:	
Hastanın Yaşı:	
Hastanın Mesleği:	
Adres:	
Tel:	
Annenin Memleketi: Babanın Memleketi:	
İnfertilite Süresi:	
Sperm Sayısı:	
Sigara kullanıp kullanmadığı	
Alkol kullanıp kullanmadığı	
In vitro fertilizasyon deneme sayısı	

Ek.3: Etik Kurul Kararı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU


Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/1259-1308

15 .12.2017

Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Alper ARSLAN

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **İdiyopatik erkek infertilitesi ile seminal plazma GRP78 protein düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması** başlıklı OMÜ KA EK 2017/402 Karar nolu Genetik çalışma+ Biyokimya çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergelerine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 30.11.2017 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof. Dr. Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selin KAYA

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 05.07.1991

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans (İstanbul Kültür Üniversitesi, 2014)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: -

E-posta: selin.kaya.77@hotmail.com