



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE REAKTİF OKSİJEN
TÜREVLERİNE BAĞLI NOX5'İN SPERM MOTİLİTESİ İLE
İLİŞKİSİ**

BENAY DAYLAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Şule AYLA

İSTANBUL- 2021

TEZ ONAYI

Kurum: İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi: Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Öğrenci: Tez Başlığı: Erkek İnfertilitesinde Reaktif Oksijen Türevlerine Bağlı Nox5'in Sperm Motilitesi ile İlişkisi

Sınav Yeri: İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Tarihi: 08.01.2021

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Doç. Dr. Şule AYLA

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

1. Doç. Dr. İlknur Keskin
2. Doç. Dr. Gamze Tanrıverdi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ

BEYAN

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

Benay DAYLAN



TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek tezimin planlanması, yürütülmesi esnasında bilgi ve desteği ile gerekse hayat tecrübeleri ile her koşulda bana yol gösteren ve bu tecrübeleri benimle paylaşan, desteğini ve güvenini bir an olsun eksiltmeyen çok değerli danışmanım Doç. Dr. Şule Ayla'ya,

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca deneyim ve bilgileriyle her türlü yardımda bulunan ve her koşulda yanımda olan çok değerli bölüm başkanımız Doç. Dr. İlknur Keskin ve biricik hocam Dr. Öğr. Üyesi Seda Karabulut'a,

Hasta temin edilmesi aşamasında yanımda bulunduğum ve tez dönemim boyunca beni her konuda motive eden, tüm bilgilerini benimle paylaşan ve destekleyen IVF ünitesi laboratuvarında değerli embriyolog Tuğba Varlı Yelke, Tuğba Şenel Ustabas ve Şebnem Yazıcı'ya,

Çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum, her konuda ve her koşulda yardımlarıyla bana destek olan, Arş. Gör. Olgu Enis Tok, Ahsen Kaplan, Ceren Erdem Altun, Arş. Gör. Oya Korkmaz, Arş. Gör. Dr. Bircan Kolbaşı, Öğr. Gör. Volkan Bülbül, Uğurcan Altıok, Arş. Gör. Çağrı Çakıcı ve tüm ekip arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren ve her türlü desteği sağlayan babam Bekir Sıtkı Daylan, annem Dilek Daylan, babaannem Mühelhel Daylan ve bütün aile üyelerime,

Beni hep motive eden sevgili ve biricik arkadaşlarım İrem Kaya Yorgun, Göksu Kaşarcı, Pınar Köseoğlu, Sudem Şimşek, Cansu Can, Eylem Canyalçın, Bengisu Deniz, Eda Günaydın Kara, Gizem Demirkan, Burçe Balcı ve Özge Biçeroğlu'na

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEZ ONAYI..... | i |
| BEYAN..... | ii |
| TEŞEKKÜRLER | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| TABLolar LİSTESİ..... | vii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | viii |
| 1. ÖZET..... | 1 |
| 2. ABSTRACT..... | 3 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ | 4 |
| 4. GENEL BİLGİLER | 6 |
| 4.1. İnfertilite Nedir?..... | 6 |
| 4.2. Erkek İnfertilitesi..... | 7 |
| 4.3. Erkek Üreme Sistemi..... | 8 |
| 4.3.1 Spermatogenez..... | 10 |
| 4.3.2. Sperm Yapısı | 13 |
| 4.3.3. Sperm DNA Yapısı..... | 14 |
| 4.3.4. Sperm DNA Hasarı..... | 16 |
| 4.4. Erkek İnfertilitesi ve Reaktif Oksijen Türevleri (ROT) | 16 |
| 4.4.1. ROT'un Sperm İşlevi Bakımından Önemi..... | 17 |
| 4.4.2. Semendeki ROT'un Kaynağı | 18 |
| 4.4.3. Oksidatif Stres: Potansiyel Kökenleri..... | 18 |
| 4.4. Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) Oksidaz (Nox), Reaktif Oksijen Türleri, Proton Pompası ve İntraselüler pH | 20 |
| 4.4.1. NADPH Oksidaz 5 (Nox5)..... | 22 |
| 4.4.2. Nox5'in İntraselüler Trafığı | 25 |
| 5. MATERYAL VE METOT | 28 |
| 5.1. Hasta Grupları | 28 |
| 5.2. Hasta Dışlanma Kriterleri..... | 28 |
| 5.3. Semen Analizi | 28 |
| 5.4. Motilite Değerlendirilmesi | 29 |

| | |
|---|----|
| 5.5. Morfolojik Değerlendirme..... | 31 |
| 5.6. Sperm Kromatin Yapısı..... | 34 |
| 5.7. Sperm Örneklerinden Total Oksidan ve Total Antioksidan Miktarlarının Belirlenmesi..... | 34 |
| 5.7.1 ROT ölçümü | 34 |
| 5.8. Sperm Hücrelerinde Nox5 Proteininin İmmünohistokimya Analizi..... | 35 |
| 5.9. Western Blot Analizi | 36 |
| 5.10. İstatiksel Analiz..... | 37 |
| 6. BULGULAR..... | 38 |
| 6.1. Morfolojik Analiz..... | 38 |
| 6.2. Sperm Kromatin Yapısının Belirlenmesi | 40 |
| 6.3. Sperm Örneklerinden Oksidan ve Antioksidan Miktarlarının Belirlenmesi ... | 41 |
| 6.5. İmmünohistokimya Bulguları..... | 43 |
| 6.8. Western Blot Bulguları..... | 46 |
| 7.TARTIŞMA VE SONUÇ | 47 |
| 8. KAYNAKLAR | 50 |
| 9.ETİK KURUL ONAY FORMU | 59 |
| 10.ÖZGEÇMİŞ | 63 |

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

| | |
|---------------|--|
| CAM kinaz II: | Ca ²⁺ -kalmmodulin-dependent protein kinaz II |
| Duox1: | Dual Oksidaz 1 |
| Duox2: | Dual Oksidaz 2 |
| DSÖ: | Dünya Sağlık Örgütü |
| GPX: | Glutatyon Peroksidaz |
| NOX5: | NADPH Oksidaz 5 |
| NS: | Normozoospermik |
| OAS: | Oligoastenozoospermik |
| OxPTM: | Oksidatif Post-Translasyonel Modifikasyonlar |
| OS: | Oksidatif Stres |
| PRDX: | Peroksiredoksin |
| PUFA: | Polyunsaturated fatty acid (çoklu doymamış yağ asitleri) |
| ROT: | Reaktif Oksijen Türleri |
| cAMP: | siklik adenozin 3',5'-monofosfat |
| SUMO: | Small ubiquitin-like modifier |
| SOD: | Süperoksit dismutaz |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 4.3.1 Erkek Üreme Sistemi | 10 |
| Tablo 5.4.1. DSÖ Sperm Parametreleri, 2010 | 30 |
| Tablo 5.4.2. DSÖ Semen Parametreleri | 31 |
| Tablo 6.6. OAS ve NS Gruplarındaki NOX5 Proteininin İmmünohistokimyasal Skorlama Sonuçlarının Değerlendirilmesi | 45 |
| Tablo 6.7. NOX5 Protein Ekspresyonunun Kromatin Yapısı, Oksitativ Stres ve Motilite ile Korelasyonu | 45 |



ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 4.1.1. Çiftlerde infertilite dağılımları grafiği | 7 |
| Şekil 4.3.1. Memeli spermatogenez aşamaları..... | 13 |
| Şekil 4.3.2.1. Spermin yapısı | 14 |
| Şekil 4.3.3.1. Protamin-toroid yapısı | 16 |
| Şekil 4.4.3.1. Oksidatif stres ve erkek inferilitesine yol açan ROT üretimi | 20 |
| Şekil 4.4.1 Nox5'in yapısını gösteren diyagram | 22 |
| Şekil 4.4.1.1. Nox5'in düzenleyici mekanizmalarını gösteren şematik diyagram | 24 |
| Şekil 4.4.2.1. Nox5'in hücre sinyali ve fonksiyonundaki rolünü gösteren diyagram | 26 |
| Şekil 5.3.1. Yayma preprati hazırlama diagramı..... | 29 |
| Şekil 5.5.1. Spermac stain kit..... | 32 |
| Şekil 5.5.2. Sperm morfoloji analizlerinde kullanılan laboratuvar ekipmanları | 33 |
| Şekil 6.1.1. Spermac boyama | 38 |
| Şekil 6.1.2. Diff-quick boyama | 39 |
| Şekil 6.2.1. NS ve OAS gruplarının kromatin bütünlüğü analizi..... | 40 |
| Şekil 6.2.1.1. NS ve OAS gruplarının kromatin bütünlüğü analizi..... | 41 |
| Şekil 6.4.1. NS ve OAS hasta grupları arasında total antioksidan ve total oksidan seviyelerinin değerlendirilmesi | 42 |
| Şekil 6.4.2. NS ve OAS hasta grupları arasında oksidatif stres değerlendirilmesi | 42 |
| Şekil 6.5.1. NS Hastalarında Nox5'in immünohistokimya boyaması | 43 |
| Şekil 6.5.2. OAS hastalarda Nox5'in immünohistokimya boyaması | 44 |

1. ÖZET

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİNE BAĞLI NOX5'İN SPERM MOTİLİTESİ İLE İLİŞKİSİ

İnfertilite (kısırlık) bir yıl korunmasız cinsel birleşme sonrasında gebelik elde edememe olarak tanımlanmaktadır. Dünya genelinde infertilite her altı çiftten birini ilgilendiren bir konudur ve vakaların yarısında erkek kaynaklı problemler bulunmaktadır. Erkek genital bezindeki enfeksiyon, varikosel, kullanılan ilaçlar, çevresel faktörler, sigara alışkanlığı gibi çeşitli koşullar erkek infertilitesi ile alakalıdır. Bununla beraber, genelde semen plazmasında Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) artması ve buna karşı antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalışı infertilite problemlerinin temelini oluşturmaktadır. ROT aşırı miktarda üretildiğinde, antioksidan savunma sistemi zayıf düşer antioksidanlar ile oksidanlar arasındaki dengeyi bozarak süre ve yapısına bağlı oksidatif hasar oluşur. Özellikle DNA'yı hedef alan ROT, lipit, nükleik asid, protein gibi biyolojik makromoleküllerin fonksiyonlarını bozarak, sperm işlevini olumsuz etkiler. Spermatozoonlardaki artan ROT miktarı ise DNA hasarı ve azalan motilite (hareketlilik) ile bağlantılıdır. Aynı zamanda ROT sperm baş ve orta kısmındaki çoklu doymuş yağ asitlerinin çoklu doymuş peroksidasyonu sonucunda sperm morfolojisini bozar ve sperm motilitesinde azalmaya yol açar. Buna bağlı olarak artan ROT seviyesi sperm motilitesini azaltmaktadır. Öte yandan memeli hücrelerinde NADPH oksidazlar (Nox-1-5), süperoksit anyon (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROT' ların temel kaynağı olarak belirtilmektedir. Plazma membranında yer alan Nox enzimleri O_2^- üretimi için gerekli elektron donörü olarak NADPH'ı aktive etmektedirler. Bu O_2^- molekülü, H_2O_2 oluşturmak üzere kendiliğinden ya da enzimatik olarak süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile indirgenebilir. Bu sebep ile Nox5 ekspresyonu arttığında ROT seviyesinde de artış olur ve bu da sperm motilitesini azaltmaktadır. Bu çalışmada 30 Normozoospermik (NS) ve 30 oligoastenozoospermik (OAS) hastalarından alınan kullanılmayan ve tıbbi atık olarak imha edilen semen örnekleri kullanılmıştır. Semen örneklerinde sperm motilite ve fonksiyonu üzerinde etkili olan Nox5'in protein ekspresyon seviyesi belirlenmiştir. Aynı zamanda bu proteinin oksidatif stres, sperm motilitesi ve kromatin yapısı ile ilişkisi açıklanmıştır. Bu bilgiler ışığında ve daha

sonra yapacağımız farklı moleküler çalışmaların desteği ile, bu proteinin sperm fonksiyon analizlerinde bir test yöntemi olarak kullanılmasına katkı sağlamayı amalamaktayız.

Anahtar Kelimeler: Motilite, Nox5, NS, OAS, ROT, Sperm



2. ABSTRACT

ASSOCIATION OF NOX5 WITH THE SPERM MOTILITY DUE TO REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE MALE INFERTILITY

Infertility is defined as not being able to get pregnant after one year of unprotected sexual intercourse. One out of every six couple is infertile and most of the cases are caused by male related factors. Various conditions such as infection of the male genital tract, varicocele, drug usage, environmental factors and smoking are related to male infertility. Nonetheless, increase of reactive oxygen species (ROS) and inadequate antioxidative defense mechanisms are basic problems in the infertility. In case of excess production of ROS, antioxidative defense mechanism become inadequate and balance between antioxidants and oxidative is abolished, as a result oxidative damage may occur as dependent to ROS exposure time and structure. Specifically, DNA targeting ROS negatively effects the sperm function by damaging the macromolecules such as lipid, nucleic acid and protein. Increasing levels of ROS is associated with DNA damage and decrease of motility. Nevertheless, ROS damage the sperm morphology and decrease the sperm motility by poly-saturated peroxidation of poly-unsaturated fatty acids. Moreover, NADPH oxidases (NOX-1-5), superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are known as basic source of ROS. NOX enzymes in the plasma membrane provide electron to activate the NADPH in order to produce O_2^- . This O_2^- molecule is reducible by itself or enzymatically via superoxidodismutase (SOD) to form H_2O_2 . Therefore, ROS increases as with the expression of NOX5 and this decreases the sperm motility. In this study, disposable semen samples from 30 normozoospermic (NS) and 30 oligozoospermic (OAS) patients were used. NOX5 expression levels were detected in these samples which is effective on sperm motility and function. Moreover, association of NOX5 with the ROS, sperm motility and DNA fragmentation were investigated. Within this scope, we are suggesting this molecule as marker to help the sperm function analyses and we aim to support our result by further studies, this may help to further molecular studies about sperm functions.

Key Words: Motility, NOX5, NS, OAS, ROS, Sperm

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite (Kısırlılık) bir yıl boyunca düzenli ilişkiye girip gebelik elde edememe durumudur. Bu tanıma göre, infertilite toplumun %15'ini etkilemektedir. Erkek infertilitesi ise; bir erkeğin sağlıklı bir kadın partner varlığında korunma olmaksızın cinsel ilişki sonrasında 12 ay sonunda çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır [1]. Çiftlerin yaklaşık %25'i bir yıl içerisinde gebelik elde edememektedirler ve bunların da %15'i infertilite için tedavi olup, %5'i istemelerine rağmen çocuk sahibi olamamaktadır. İnfertilite hem erkeği hem de kadını etkileyen bir durumdur. Çocuk sahibi olamayan infertil çiftlerin %40'ı ise erkek infertilitesinden kaynaklanmaktadır.

Erkek infertilitesine kronik stres, ürogenital anomaliler, metabolik hastalıklar, reaktif oksijen türevleri (ROT) ve genetik bozukluklar, sperm üretim bozukluğuna bağlı nedenler (non-obstrüktif) ve sperm taşıyıcı kanallarda oluşan tıkanıklıklar gibi çeşitli faktörler neden olabilir [2].

Spermatozoon mitokondrisi tarafından üretilen süperoksit, hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO), hidroksil radikalleri (HO) ve peroksinitrit gibi ROT'lar ve bunların kombinasyonlarına ait aşırı miktarlar infertiliteye yol açabilmekte ve hücrel metabolizmayı olumsuz şekilde hareket edebilmektedir [3]. Normalde somatik hücrelerdeki ROT'ların varlığı birtakım antioksidanlar tarafından engellenir [4]. Oksidatif stres (OS) ise ortamdaki ROT miktarının artması, buna karşın antioksidanların azalması durumunda ortaya çıkmaktadır. Bu olay çok ciddi hücre hasarına ve hatta hücre ölümüne bile sebep olabilmektedir [5]. Sperm hücrelerinde ise bu olay sperm motilitesi ve mitokondriyal aktiviteyi azaltabilir. Bunun sebebi sperm hücresi, motilite için ihtiyacı olan enerjiyi sağlamak üzere bol miktarda mitokondri içermektedir. Hücredeki ROT ana kaynağının mitokondri olması sperm hücresindeki ROT miktarını arttırmaktadır [6].

Semen plazmasında ROT'ların yüksek seviyelerde artması ve buna karşı antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalışı infertilite konusundaki problemin temel kaynağını oluşturabilir. ROT'a bağlı olarak gelişen zarar, proteinleri, lipidleri ve DNA'yı hedef almakta, sonuç olarak spermin işlevini ve hücrel hayatta

kalma oranını olumsuz etkileyebilmektedir. Spermatozoonlardaki artan ROT miktarları DNA hasarı ve azalan motilite ile bağlantılıdır [7].

DNA'daki hasarlar çeşitli nedenlerden dolayı meydana gelmektedir. Spermatozoon DNA'sında oluşan bu hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonunun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları, DNA'da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır [8]. ROT'un sebep olduğu DNA hasarı hücrelerin programlı hücre ölümünü hızlandırmakta ve bunun da infertiliteye sebep olan spermatozoon sayısının azalması ile ilgili olarak, üreme üzerine olumsuz bir etki yaptığı düşünülmektedir [9].

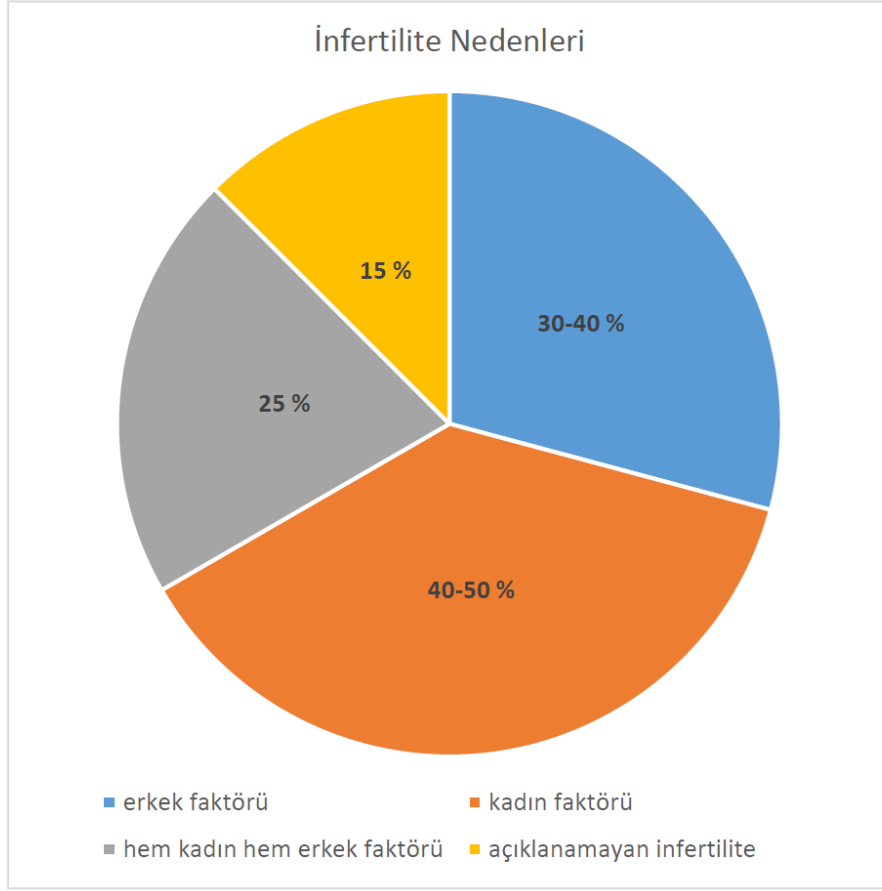
Memeli hücrelerinde NADPH oksidazlar, süperoksit anyon (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROT'ların temel kaynağı olarak belirtilmektedir [10]. Plazma membranında yer alan Nox enzimleri O_2^- üretimi için gerekli elektron donörü olarak NADPH'ı aktive etmektedirler. Bu O_2^- molekülü, H_2O_2 oluşturmak üzere kendiliğinden ya da enzimatik olarak süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile indirgenebilir [11]. Nox5, Nox ailesinin yeni keşfedilen bir üyesi olup kalmodulin-benzeri amino terminal domaini ve dört kalsiyum bağlayıcı heliks-loop-heliks yapı domainini (EF hand) içermektedir. Nox5 özellikle testis, uterus, dalak, lenf nodülleri ve endotelial hücrelerde eksprese edilmektedir [12].

Bu çalışmada amacımız insan normozoospermik (NS) ve oligoastenozoospermik (OAS) hastalardan alınan kullanılmayan ve tıbbi atık olarak imha edilecek semen örneklerinde sperm motilite ve fonksiyonu üzerinde etkili olan, Nox5 protein ekspresyon seviyesini belirlemek ve bu proteininin OS, sperm motilitesi ve kromatin bütünlüğü ile ilişkisini anlamaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfertilite Nedir?

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre infertilite bir yıl boyunca düzenli bir cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememe durumudur [13]. İnfertilite toplumun %15'ini etkileyen ciddi bir problemdir ve infertil çiftlerin sayısı artış göstermektedir. İnfertilite sadece erkeğe ya da sadece kadına bağlı nedenlerle ortaya çıkabildiği gibi hem erkek hem de kadına bağlı nedenlerle de görülebilir. Bunların dışında kadın ve erkeğin normal olduğu halde gebeliğin gerçekleşmediği bir durum daha vardır. Bunlar da açıklanamayan infertilite grubunu oluşturmaktadır. Kadın kaynaklı infertilite %40-50, erkek kaynaklı infertilite %30-40, hem kadın hem erkek kaynaklı infertilite %25, açıklanamayan infertilite ise %15 oranında görülmektedir[14]. İnfertiliteye neden olan birçok faktör vardır. Bunlar arasında biyolojik faktörler, oksidatif stres, enfeksiyonlar, yaşam tarzı ve çevresel faktörler sayılabilmektedir [2] (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1. Çiftlerde infertilite dağılımları grafiği (Bayram H., 2019)

4.2. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesine erkek genital bezindeki enfeksiyon, varikozel, ilaçlar, çevresel faktörler, sperm atım bozukluğu, sigara alışkanlığı ve ROT gibi çeşitli koşullar neden olur [15].

İnfertilite erkeklerin yaklaşık %7'sini etkilemektedir. Vakaların %40'ında erkek infertilitesi anormal sperm parametreleriyle bağlantılıdır ve aynı zamanda düşük sperm sayısı ve motilitedeki yetersizlik erkek infertilitesi nedenleri arasındadır [16].

Son zamanlarda yapılan birçok araştırmada, erkek infertilitesine neden olduğu düşünülen sebeplere yeni bir tanesi eklenmiştir. Oksidatif Stres (OS) olarak bilinen bu bozukluk spermde DNA hasarı yaratarak infertiliteye neden olabilmektedir. Sperm

kalitesi düşük olan hastalarda OS'a neden olan serbest radikallerin fazla olduğu gösterilmiştir [17].

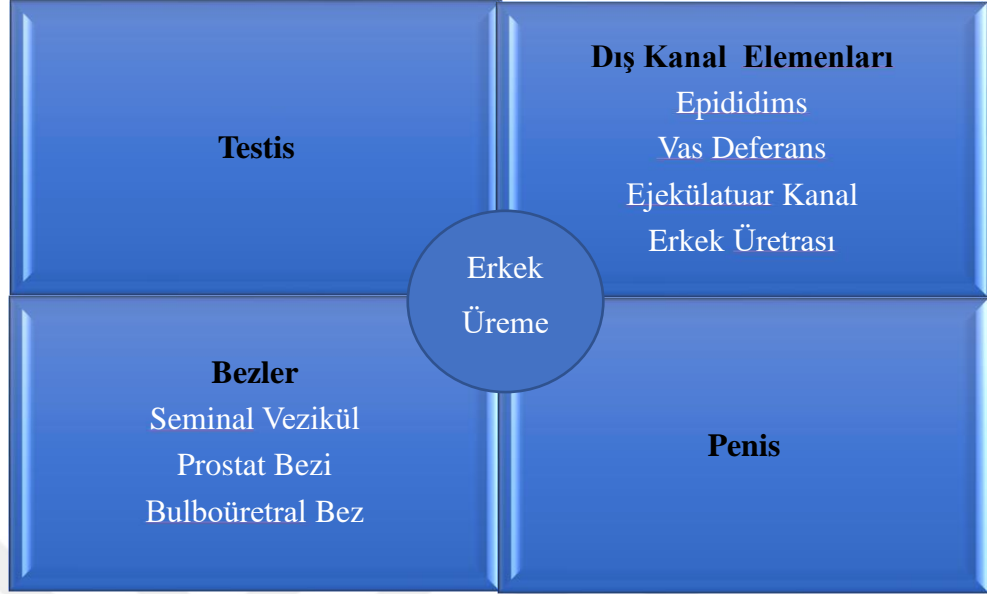
4.3. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşur (Tablo 4.3.1). Testisin spermatogenez (erkek gametleri olarak adlandırılan spermin üretimi) ve steroidogenez (seks hormonları olarak da adlandırılan androjenlerin sentezlenmesi) olmak üzere başlıca iki görevi vardır [18]. Genital kanallar ve yardımcı bezler sperm aktivitesi için gerekli olan salgıları üretmeden sorumludur aynı zamanda spermatozoonları ve salgıları penil üretradan dışarı atmak için kasılırlar. Bu salgılar spermatozoonlara gerekli besinleri sağlarlar. Spermatozoonlar ile yardımcı bezlerin salgıları, penis yoluyla dişi üreme sistemine bırakılan semeni oluşturur [19].

Her bir testis yaklaşık olarak 250 lobçuktan oluşur ve her bir lobçuk bir yada daha fazla oldukça uzun kıvrıntılı seminifer tübül ve testesteron üreten interstisyel (leyding) hücreleri içeren vasküler stromadan oluşur. Seminifer tübüller prizmatik sertoli hücrelerini içere spermatogenik epitelden oluşur. Sertoli hücreleri yüzeylerine gömülü olan birçok germ hücresinin desteklenmesini ve beslenmesini sağlar. Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantılar seminifer tübül içinde iki bölme oluşmasına sebep olur. Spermatogonyumları içeren bazal bölme ve spermatosit ve spermatitleri içeren adluminal bölme. Sertoli hücreleri adrojen-bağlayıcı protein üretir. Bu protein testesteronu daha yoğun hale getirir ve sertoli hücreleri aynı zamanda farklılaşan spermatitlerin sitoplazmik artıklarını fagositoz ile ortadan kaldırır ve spermi tübül boyunca taşıyan sıvıyı salgılar. Spermatogonyum olarak adlandırılan kök hücreler mitoz ile çoğalarak primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler haploid sekonder spermatosit oluşturmak üzere ilk mayoz bölünmeye girer. Kısa bir aradan sonra sekonder spermatositler ikinci mayoz bölünmeye girerek küçük yuvarlak spermatidleri oluşturur, spermatidler sertoli hücrelerine gömülü halde farklılaşırlar. Spermatid spermiyogenez aşamasına geçer, bu aşamada çekirdeğin yoğunlaşması, orta parçada mitokondri ile sarılmış uzun flagella oluşumu ve perinüklear akrozomal başlık

oluşumu gözlenir. Seminifer tübüllerden sperm kısa düz tübüllere girer, buradan mediastinum testisteki rete testis kanallarına ulaşır, sonrasında sayıları 15-20 arasında değişen ve sıvı emiliminin gerçekleştiği duktuli efferentes ile epididimise ulaşır. Duktuli efferentese gelen sperm epididimisin baş kısmında epididim kanalına girer ve epididimisin gövde ve kuyruk kısmından geçer, bu bölgede sperm son olgunlaşmasını geçirir ve ejakulasyon öncesinde kısa süreli depolanması yapılır. Epididimşs yabancı çok katlı prizmatik epitel ile örtülmüştür. Epitel uzun sterosilyalara sahip esas hücreler içerir. Epididimisin uzunluğu boyunca düz kas hücre katmanı sayısı artar. Ejakulasyonda epididimisin gövde ve kuyruk kısımları duktus deferense açılır. Duktus deferens de yabancı çok katlı prizmatik epitel ile örtülmüştür ve perisaltik hareket için üç katlı kalın düz kas tabakası ile çevrelenmiştir. Semen büyük çoğunluğu bir çift seminal vezikül tarafından üretilir. Semine veziküldeki salgılayıcı mukazonun yapmış olduğu çok sayıda ince katlanmalar ayırt edicidir. Seminal vezikülden gelen her bir kanal bir duktus deferense ejakulatuvar kanal olarak katılır. Medial prostat bez içinde, iki ejakulatuvar kanal ve tübuloasinar prostatik bezlerden gelen düzinelerce kanal üretra ile bileşir ve üretra semeni penis boyunca taşır. Seminal vezikülden gelen semen birleşenleri, spermi besler. Kadın üreme yolundaki silya ve kas etkinliğini aktifleştirir ve sperm atılması için gerekli olan viskositeyi kontrol eder. Penis iki dorsal korpora kavernoza ve periüretral korpus spongiyozum içerir. Hepsi vasküler kavernöz dokudan ve bu yapıları saran az miktarda düz kas ve helisin arterlerinden oluşur. Ereksiyon için, parasempatik uyarı, küçük helisin arterlerinin kaslarını ve komşu dokuları gevşetir, kavernöz doku damarlarının kan ile dolmasına imkan tanır; genişleyen korpora venöz kan boşalmayı baskılar ve bu üç korpora kitlesinin sertliğini ve genişlemesini daha da arttırır. Ejakulasyon sırasında, sempatik uyarı, helisin arterleri boyunca kan akışını baskılayarak, kavernöz dokulardan kanın çıkmasına izin verir[19].

Tablo 4.3.1 Erkek Üreme Sistemi



4.3.1 Spermatogenez

Spermatogonyumdan sperm gelişim sürecine spermatogenez denir. Ergenlik çağında kök ve progenitör hücre olan spermatogonyumlar yuvarlak, küçük ve yaklaşık 12 µm çapındaki hücrelerdir. Bu hücreler seminifer tübül bazal membranın hemen üstünde yer alır ve aynı zamanda Sertoli hücrelerinin yüzeyleriyle yakın ilişki halindedirler. Fakat Sertoli hücrelerinin arasında bulunan tıkaçıcı bağlantıların altında yer aldığı için 'kan-testis' bariyerine katılmazlar.

Toplam 3 tip spermatogonyum vardır [20]. Bunlar histolojik preparatlardaki nükleus görünümü esas alınarak birbirlerinden ayrılmışlardır. Tip A koyu spermatogonyumlar kromatinleri ince granüllere sahiptir. Aynı zamanda nükleusları oval ve yoğun bazofilik yapıdadır. Bu spermatogonyumlar ya kök hücre olarak kalır ya da bölünerek Tip A açık spermatogonyumları oluşturur. Tip A açık spermatogonyumlar ise ince granüllü, açık renk boyanan ve oval nükleusa sahiptir. Aynı zamanda mitoz bölünme sonucu sayılarını arttırıp Tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar yoğunlaşmış kromatin yapısında ve yuvarlak nükleuslara sahiptirler. Mitotik bölünmelerini ve DNA sentezini tamamlayan Tip B

spermatogonyumlar primer spermatositi oluşturmak için bölünürler (Şekil 4.3.1). Bu olay yaklaşık on gün sürmektedir. Birinci mayoz bölünmenin 'Profaz' aşamasında leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez evreleri görülür. Burada gerçekleşen olaylar sırasıyla homolog kromozom eşleşmesi için gerekli sinaptonemal kompleks oluşumu, 'homolog kromozomların eşleşmesi' (sinaps), 'crossing-over' (homolog kromozomlarda kardeş olmayan kromatidler arasında bilgi değişimi) ve son olarak 'disjunction' (homolog kromozomların ayrılma) olayıdır. Profaz evresinden sonra kardeş kromatidler metefaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçerek sekonder spermatositlere ayrılır. İkinci mayoz bölünmenin tamamlanması ile spermatidler oluşur [21].

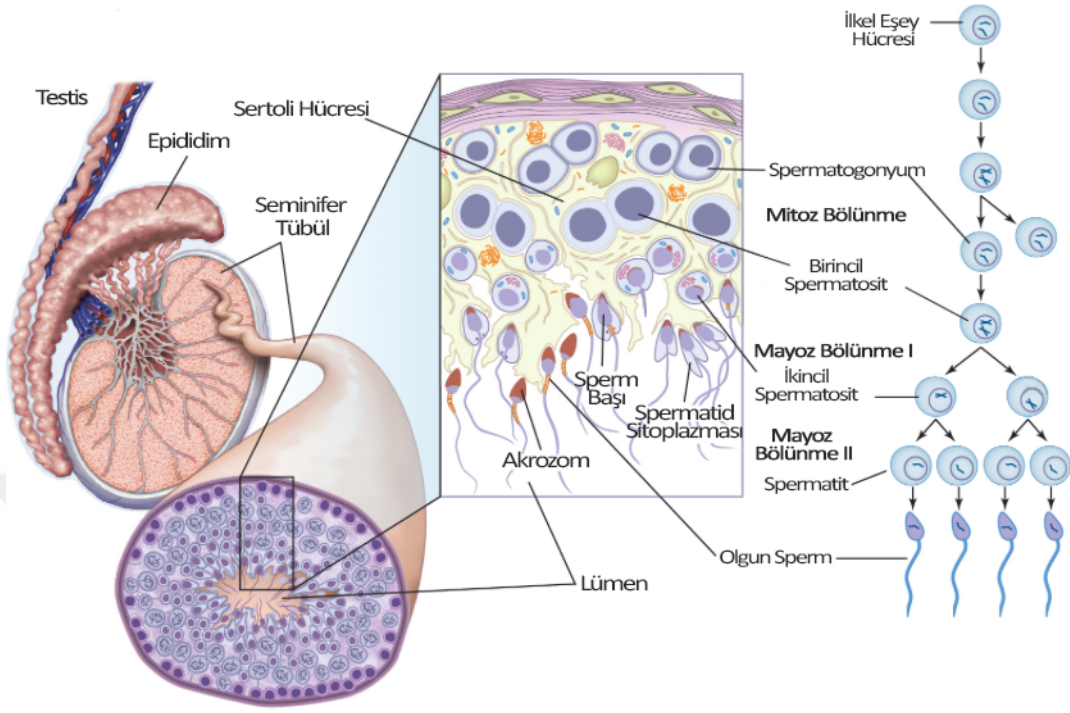
DNA sentezinin son fazlarında primer spermatosit oluşuktan sonra mayoz başlamadan önce DNA'larını replike ederler. Bunun sonucunda her primer spermatositte normal sayıda kromozom ($2n$) bulunur. Her kromozom iki kardeş kromatidten oluştuğu için DNA miktarı $4d$ 'dir. Mayoz 1 kromozom sayısını yarıya ($2n$ 'den n 'e) indirir. Böylece DNA miktarını haploid duruma getirir. Mayoz 2'den önce DNA replikasyonu olmadığı için bu bölünmeden sonra her bir spermatid haploid (n) sayıda kromozoma sahiptir[22].

Spermatogenezin son evresi olan spermiyogenez spermatidlerin morfolojik değişime uğrayarak sperm oluşması sürecine denir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Haploid spermatidler yaklaşık 7-8 μm çapındadır. Aynı zamanda hücreler seminifer tübül lümenine yakınırlar. Spermiyogenez 'akrozom oluşumu', 'çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını', 'flagellum gelişimini' ve 'sitoplazmanın kaybolması' aşamalarını bir süreçtir. Spermiyogenez üç önemli fazdan oluşur.

- I. Kamçı (flagellum) gelişimi: Kamçı, distal sentriyolden gelişmeye başlar. Bu gelişimden sentriyoller sorumludur. Aksonem yapısı dış yoğun fiberler ve fibroz kılıf ile çevrilidir. Dış yoğun fiberlerin etrafını kılıf gibi saran mitokondriyonlar boyun kısmında yer alır. Aynı zamanda mitokondriyonların bulunduğu bu bölüm kuyruğun 'orta parçası' dır. 'Esas parça' ise kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin dışında bulunan fibröz kılıfı içerir. 'Son parça' ise kamçının sonunda bulunan 5 μm kısmıdır ve sadece aksonemal kompleksi içerir[22].

II. Akrozom gelişimi: Spermin kafasında bulunan enzim içeren keseciklerdir. Bu enzimler hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin etkisi gösteren proteaz enzimleridir. Bu enzimler fertilizasyon (döllenme) sırasında açığa çıkar ve görevleri yumurtayı delmektir. Akrozomun gelişim süreci 4 fazdan oluşur. Bunlar; Golgi fazı, kep (şapka) fazı, akrozomal faz ve son olarak maturasyon (olgunlaşma) fazıdır[22].

- **Golgi Fazı:** Spermatidlerin sitoplazmasında bulunan Golgi kompleksinde proakrozomal granüller birikir ve bu granüller biraraya gelerek Golgiden ayrılır. Akabinde ayrılan bu granüller akrozomal granülü oluştururlar. Bu arada sentriyoller akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Böylelikle çekirdeğin alt tarafında kamçı aksonemi oluşur ve Sentriyoller tekrar nukleusa göç ederken aksonemal bileşenleri etrafına sarar[22].
- **Kep (şapka) fazı:** Akrozomal vezikül, nukleusun ön parçasının üzerine yayılır. Yeniden oluşan bu yapıya 'akrozomal kep' denir. Akrozomal kepin altında kalan nukleer zarf porlarını kaybederek kalınlaşır. Aynı zamanda nukleer içerikte yoğunlaşır[22].
- **Akrozomal Faz:** Akrozom apikal plazma membranına yaklaşır. Böylelikle çekirdeğin üçte birlik kısmını örter. Sitoplazmik mikrotübüller spermatidin arka kutbuna doğru uzar ve silindirik bir kılıf olan 'manşet'i oluşturur. Distal sentriyolden 9+2 mikrotübül yapısındaki aksonem oluşur. Mitokondriyonlar ise aksonem boyunca göç ederler[22].
- **Maturasyon (olgunlaşma) fazı:** Spermin arta kalan sitoplazma kısmı sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Daha sonra spermler seminifer tübülün lümenine serbest bırakılır[22].



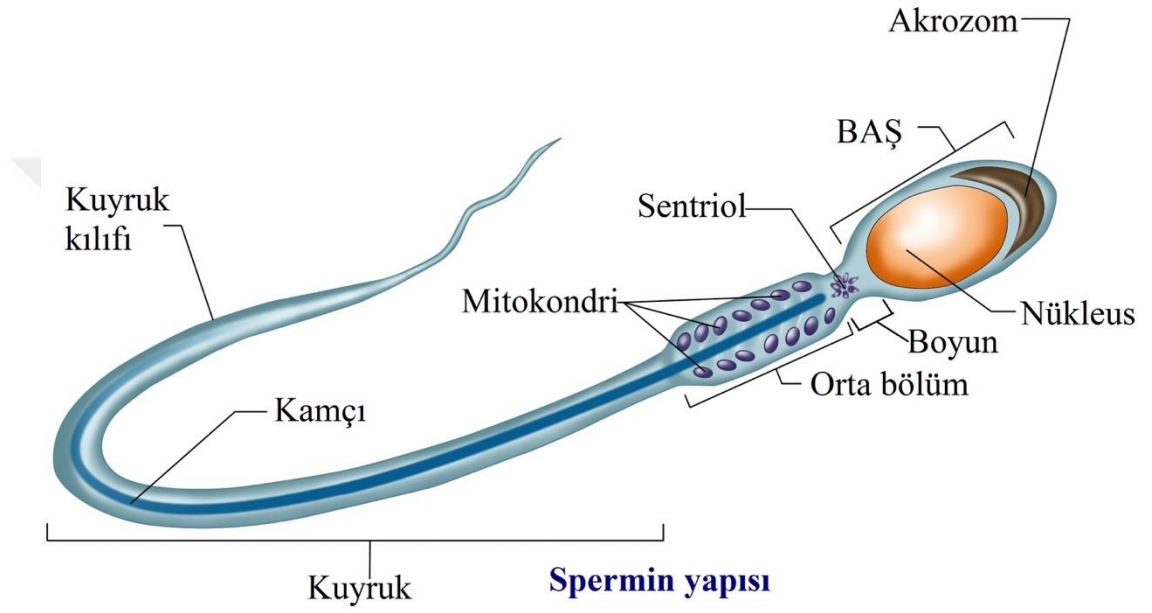
Şekil 4.3.1. Memeli spermatogenez aşamaları (Yaung G ve ark.)

4.3.2. Spermin Yapısı

Olgun insan spermi baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşur ve yaklaşık 60 μm uzunluğundadır. Sperm başı yassı, yaklaşık 4,5 μm uzunluğunda ve 3 μm genişliğindedir (Şekil 4.3.2.1). Bu kısımda nükleus bulunmaktadır ve nükleusun içinde erkeğin genetik özelliklerini taşıyan 23 kromozom bulunmaktadır. Ayrıca spermin baş kısmında golgi ve lizozom gibi organelleri barındıran akrozom yapısı bulunmaktadır. Aynı zamanda bu yapı içerisinde sindirim enzimlerini içeren kesecikler bulunmaktadır. En temel görevi ise döllenme sırasında yumurta hücresinin zarını delmektir.

Boyun kısmında ise mitokondri yer almaktadır. Bu organel ürettiği ATP enerjisi ile kamçının yapısını oluşturan mikrotübüllerin hareketini sağlamaktır.

Kuyruk ise sperm hücresinin yumurta hücresine hareketini sağlamaktadır. Normal şartlar altında bir sperm hücresi dakikada 3 mm hızla ilerleyebilmektedir. Ayrıca kuyruğun korunmasını sağlayan plazma zarı bulunmaktadır.



Şekil 4.3.2.1. Spermin yapısı

Sperm hücresine ait özelleşmiş yapılar gösterilmiştir. (<https://www.biyolojidersim.com/gametogenez-1-spermatogenez/>)

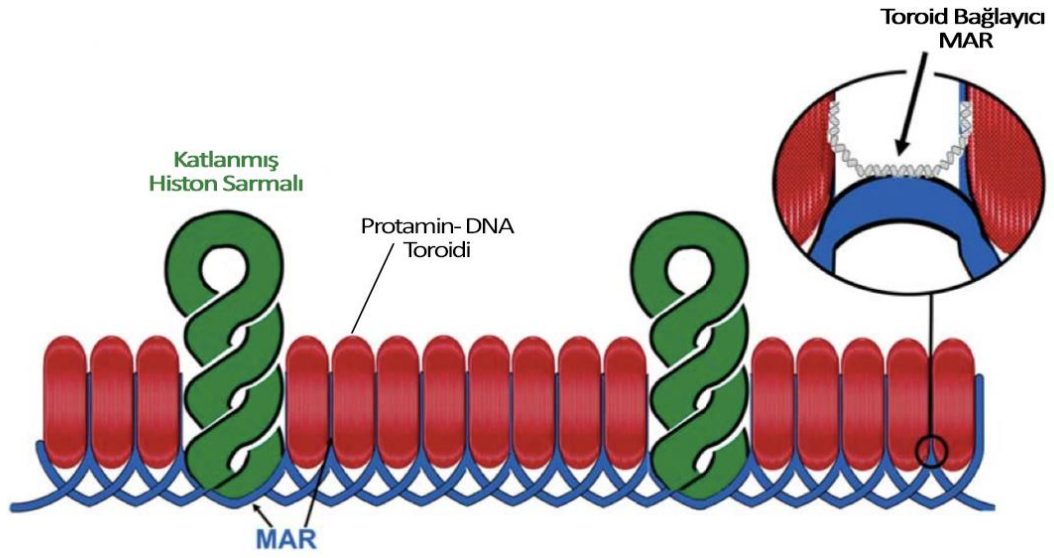
4.3.3. Sperm DNA Yapısı

Ökaryotlarda bulunan sperm kromatin yapısı kendine özgüdür ve sıkı paketlenmiş kompakt bir yapıdadır. Bu özelliğinden dolayı somatik hücrelerden oldukça farklıdır. Somatik hücrelerde, DNA histon proteinleri tarafından paketlenir ve histonlar kromatin hacmini artırırlar [23]. Sperm baş kısmında ise sperm DNA'sı

kısıtlı bir hacme sığabilmek için sıkıca paketlenmelidir [24]. Bu nedenle histonlara kıyasla daha küçük moleküler ağırlığı olan ve aynı zamanda bazik özellikteki 'Protaminler' DNA'nın sıkıca paketlenmesine yardımcı olur [25]. Protaminler arjininden zengin olup, büyüklüğü ise histonların yaklaşık yarısı kadardır. Protaminler tarafından DNA ipçikleri yoğunlaştırılır ve aynı zamanda sperm kromatinin temel paketlenme birimi olan toroid yapısı oluşur (Şekil 4.3.3.1). Toroidler ayrıca, proteindeki sistein kalıntıları arasındaki disülfid çapraz bağları ile daha sıkı bir yapı haline gelir [26]. Böylelikle bu sıkılaştırma baba genomunun taşıdığı genetik bilginin doğru bir şekilde aktarılmasını sağlar. Spermden kromatin nükleer matrikse bağlanacak şekilde bir düğüm bölgesi oluşturulur. Böylece bu organizasyon, gen ifadesinin ve DNA replikasyonunun düzenlenmesine yardımcı olur. Her protamin toroidi arasında nükleaza hassas kromatin yapısı vardır. Bu yapıya "toroid bağlayıcı" adı verilmiştir ve DNA'nın nükleer matrikse bağlanma bölgesidir (MAR) [27] (Şekil 4.3.3.1).

İnsan spermi P1 ve P2 olmak üzere iki tür protamin içerir aynı zamanda P1 protamini içeriği P2 protamini içeriğine benzerdir ve bu yüzden P1/P2 oranı yaklaşık 1'dir [28]. Ancak buna rağmen fonksiyonları birbirinden farklıdır. Bu fonksiyonel farklılıklar;

1. P1 proteinleri tüm memelilerde mevcutken P2 sadece belli memelilerde eksprese edilir. Bu da P1'in daha temel ve korunmuş bir fonksiyonu olduğunu, P2'nin ise bazı türlerde yardımcı fonksiyonu olduğunu göstermektedir.
2. P2 protaminler P1 protaminlerine daha az sistein grubu içerdikleri için daha az disülfid çapraz bağlantısı içerir. Bu durum ise DNA'yı hasarlara karşı daha açık bir hale getirir [26].



Şekil 4.3.3.1. Protamin-toroid yapısı (Dominguez K., 2011)

4.3.4. Sperm DNA Hasarı

Spermin görevi babaya ait olan genetik bilgiyi yumurtaya taşımaktır. Spermatozondaki 23 kromozoma ait DNA hasarına yol açan mekanizma halen tam olarak bilinmemektedir. Sperm DNA'sındaki hasarlar ve genomik kararsızlık sonucu DNA fragmantasyonu oluşur ve aynı zamanda infertil erkeklerin ejakülatlarında bulunan tek ve çift DNA kopmaları ile karakterizedir. Sperm kromatin anomalilerine zincir kırıklıkları, nüklear protein defektleri aynı zamanda etiyolojik faktör olarak da sigara, radyasyon ve çevresel şartlar neden olabilir [29]. Sperm DNA hasarı ve kromatin anormallikleri dört ana başlık altında toplanırsa; Kromatin paketleme anomalileri, apoptozis, kromozomal hasarlar ve en önemlisi OS'tur.

4.4. Erkek İnfertilitesi ve Reaktif Oksijen Türevleri (ROT)

Spermde oluşan DNA hasarı yüksek seviyede artan ROT ile ilişkilidir. Bununla beraber, genelde semen plazmasında ROT artması ve buna karşı antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalışı infertilite problemlerinin temelini oluşturmaktadır [30].

ROT aşırı miktarda üretildiğinde, antioksidan savunma sistemi yetersiz kalır antioksidanlar ile oksidanlar arasındaki dengeyi bozarak süre ve yapısına bağlı oksidatif hasar oluşturur. Özellikle DNA'yı hedef alan ROT; lipit, nükleik asid, protein gibi biyolojik makromoleküllerin fonksiyonlarını bozarak, sperm işlevini olumsuz etkiler. Spermatozoonlardaki artan ROT miktarı ise DNA hasarı ve azalan motilite ile bağlantılıdır. Aynı zamanda ROT sperm baş ve orta kısmındaki çoklu doymuş yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda sperm morfolojisini bozar ve sperm motilitesinde azalmaya yol açar. Buna bağlı olarak artan ROT seviyesi sperm motilitesini azaltmaktadır [31]. Somatik hücrelerdeki ROT'ların varlığı ise birtakım antioksidanlar tarafından engellenir. Bunlardan bazıları; süperoksitdismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPX) ve peroksiredoksin (PRDX)'lerdir [32]. Öte yandan, spermatozoa mitokondrisi tarafından üretilen süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO), hidroksil radikalleri (HO) ve NADPH oksidaz (Nox) gibi ROT'lar infertiliteye neden olmaktadır [33].

4.4.1. ROT'un Sperm İşlevi Bakımından Önemi

Sperm hiperaktivasyonu, kapasitasyon, akrozom reaksiyonları, zona pellusida bağlama ve sperm-oosit etkileşimi gibi dinamik fonksiyonlar için optimal seviyede ROT gereklidir [34]. ROT'ların kapasitasyon sırasında düzenli salınımı siklik adenozin 3',5'-monofosfat (cAMP) ile başlayan çeşitli moleküler modifikasyonları devreye sokmaktadır. cAMP aktivasyonu, fibröz sperm kılıfındaki tirozin fonksiyonel parçalarının fosforilasyonunu içermektedir. Aynı zamanda bu olay sperm motilitesi ve hiperaktivitesinde artışa yol açmaktadır[35]. ROT'ların sperm hiperaktivasyonundaki önemi, düşük OH^- ortamında inkübe edilen spermatozoonlar üzerinde de kanıtlanmıştır [36].

Hiperaktive sperm, protein tirozin fosforilasyonu, Ca^{+2} girişi, cAMP'de ve protein kinaz (PKA) seviyelerinde artış gibi birtakım olaylarda akrozom tepkimelerine gidebilir. Akrozom reaksiyonlarındaki ROT işlevi üç plazma membran proteininin fosforilasyonunu içermektedir [30]. Bunlar; O_2^- , H_2O_2 ve NO'dur. Buna ek olarak,

çoklu dokosaheksaenoik asit (DHA) gibi doymamış yağ asitleri de zona pellusida ve fertilizasyon için membran akışkanlığını sağlar.

4.4.2. Semendeki ROT'un Kaynağı

ROT'lar birçok radikal (örn., hidroksil iyonu $[OH^-]$, süperoksit iyon $[O_2^-]$, nitrik oksit $[NO]$, peroksil $[RO_2]$, lipid peroksil $[LOO]$ ve tilil $[RS^-]$) ve radikal olmayan molekülü kapsamaktadır [37]. Semendeki ROT'ların kaynağı genellikle nötrofil ve makrofajlar gibi semen plazmasında aktive olmuş lökositlerdir. Semen lökositleri spermatozonlardan bin kat daha fazla ROT üretmektedir [38]. Gelişmemiş ve morfolojik olarak anormal spermatozonlar semendeki diğer önemli ROT kaynağıdır [39]. Ancak, insan spermatozonlarındaki ana ROT kaynağı sperm mitokondrisindeki oksidatif fosforilasyondur [40]. DHA gibi PUFA'ları (çoklu doymamış yağ asitleri) hedef edinen ROT'lar sperm plazma membranında yer almaktadır. PUFA'lar sperm plazma membran akışkanlığını ve fizyolojik homeostazı korumak için gereklidir. ROT, PUFA'lar ile tepkimeye girerek bir zinciri başlatırlar. Yüksek enerji ihtiyacı seviyeleri sebebiyle sperm mitokondrisi infertil erkekte başlıca ROT kaynağı olmaktadır[2].

4.4.3. Oksidatif Stres: Potansiyel Kökenleri

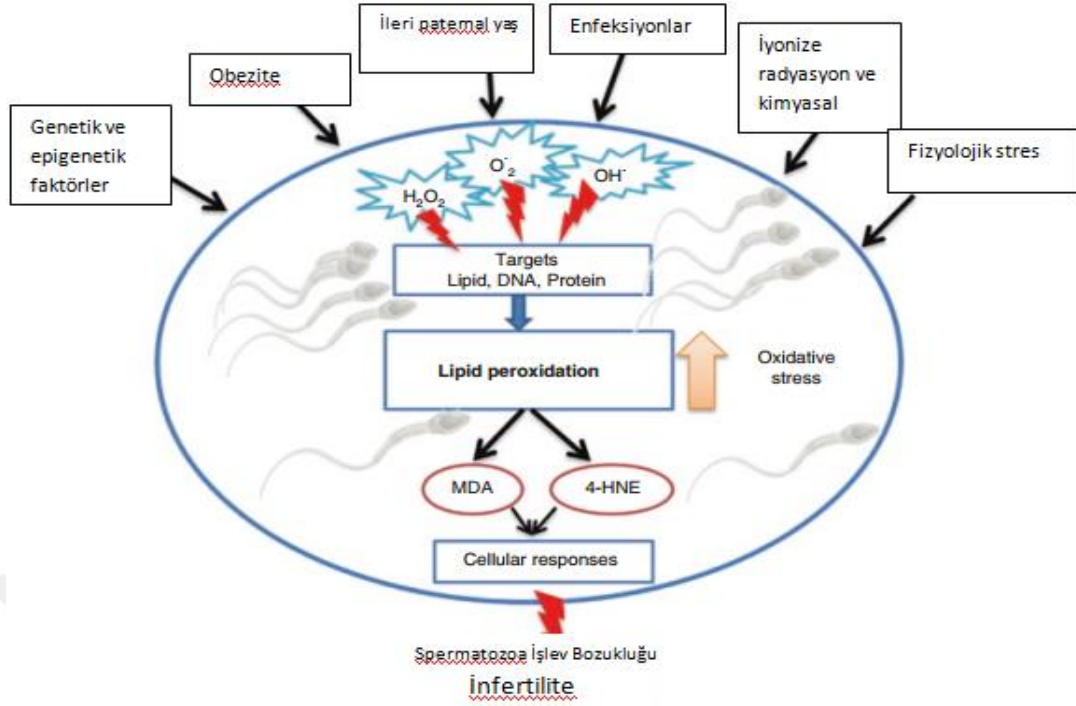
Oksidatif terimi 70'li yıllarda kullanılmaya başlanılmıştır ancak kavram olarak ilk kez iyonize radyasyon, serbest radikaller, peroksidazlar ve moleküler oksijenin benzer toksik etkilerinin tanımlandığı 50'li yıllarda karşımıza çıkmaktadır.

Oksijen yeryüzünde en yaygın bulunan elementlerden birisidir ve çeşitli metabolik yollar ile aerobik canlıların ihtiyacı olan enerjiyi karşılamada kullanılmaktadır. Spermdeki OS testiküler veya sperm gibi içsel kaynaklı olabileceği gibi yaşam biçimi ve çevresel faktörler gibi dış kaynaklı da olabilmektedir (şekil 4.4.3.1). ROT'un içsel kaynakları; hasarlı veya hatalı sperm yapısı ve enfeksiyon/inflamasyon, varikosel, kriptorşidizm ve yaşlanma gibi çeşitli diğer etiyolojiler olabilir [2].

Varikosel, spermatik damarların pampiniform pleksus'undaki anormal büyüme olarak tanımlanan patolojik bir koşuldur ve infertil erkeklerde artan ROT miktarları ile bağıntılıdır. Varikosel nedenli OS testiküler ısıyı yükselten retrograd akışının artmasından kaynaklanmaktadır [41]. Varikosel ayrıca azalan seminal plazma antioksidan aktivitesiyle de bağıntılıdır [42].

Genital bezlerde meydana gelen inflamasyon ve enfeksiyon sırasında lökositlerde artan ROT üretimi spermatozonlarda OS'ların ortaya çıkmasına sebep olmakta ve bu da spermde çeşitli işlevsel bozukluklara yol açmaktadır. 88 erkek birey üzerinde yapılan bir çalışmada OS ve lökosipermi arasında yüksek bir pozitif korelasyon olduğu ortaya konulmuştur. Testiküler inflamasyon sırasında meydana gelen aşırı ROT üretimi, indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNos), siklooksijenaz-2 ve interlökin-1b seviyelerinin seviyelerindeki artış ve buna paralel olarak azalan antioksidan seviyesi ile açıklanmıştır [43]. Yaşlanmanın, özellikle Leydig hücrelerinde antioksidan verimliliğini azaltarak testiküler OS üretiminde etkili olduğu ortaya konmuştur [44].

Tüm bunlara ek olarak iyonize radyasyon, toksinler ve kemoterapi gibi çeşitli dışsal veya çevresel etmenler testiküler ROT'u indükleyebilir ve anormal spermatogeneze yol açabilir [45]. Hidrolik yağ ve boyalardan kaynaklanan metoksietanol, toluen yan ürünleri, petrol kaynaklı sülfür dioksit, kadmiyum veya kurşun ve sigara gibi erkek fertilitasını etkileyen bu dışsal faktörlerden bazılarıdır[36].



Şekil 4.4.3.1. Oksidatif stres ve erkek inferilitesine yol açan ROT üretimi (Bisht.,2017)

4.4. Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) Oksidaz (Nox), Reaktif Oksijen Türleri, Proton Pompası ve İntraselüler pH

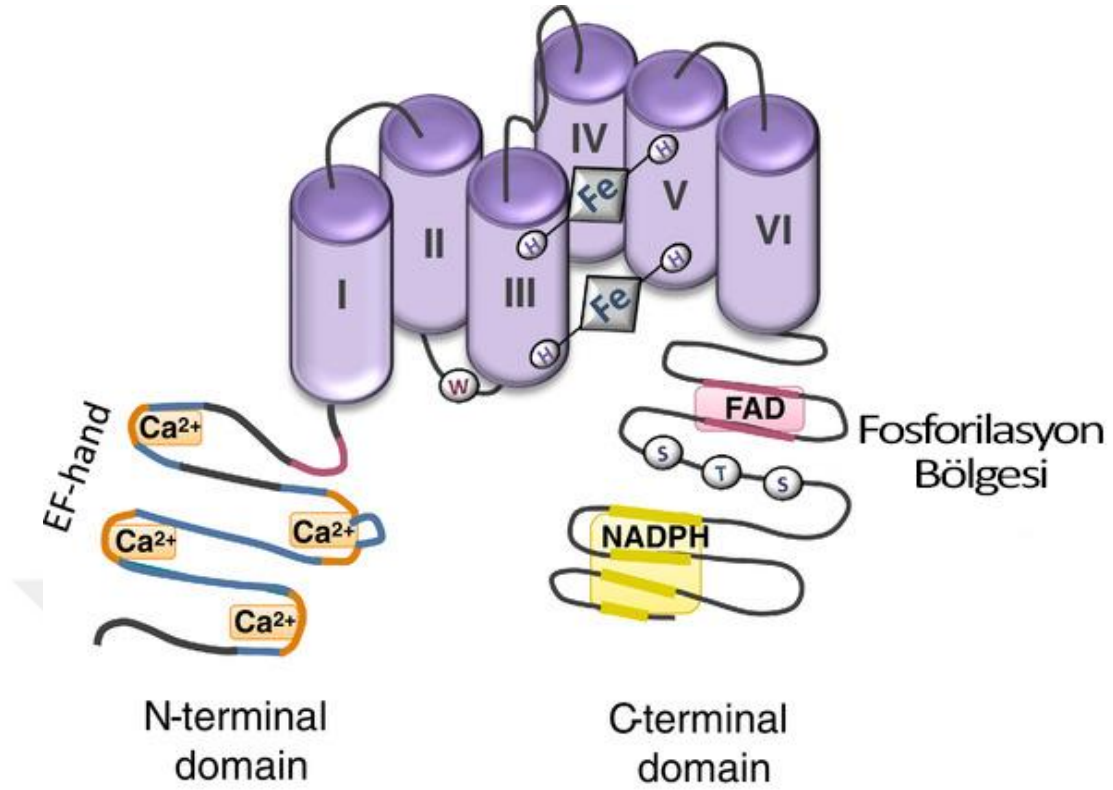
Nox'lar, çeşitli hücrelerde ve doku tiplerinde NADPH oksidazlar ve bağlayıcı proteinler tarafından düzenlenen aynı zamanda çok fonksiyonlu ve çeşitli gruplara bağlanabilen enzimlerdir. Nox aktivasyonu sırasında, elektron verici olarak NADPH, membran üzerinde O₂'yi O₂⁻'ye indirgeyerek iki elektron verir. Buradan yola çıkarak Nox'ların birincil görevinin O₂⁻ üretmek olduğu kanısına varılmıştır[46]. Ancak, bu işlemde iki proton üretilir ve bu da intraselüler pH'ı etkiler. Bu sebep ile Nox'ların iki fonksiyonu şu şekildedir;

1. ROT üretmek üzere elektron taşıma işlemi,
2. Protonların membran boyunca taşınması [47].

Nox aktivasyonu özellikle fagositozda büyük miktarda ROT üretimine ve buna bağlı olarak depolarizasyona ve azalan pH'ye yol açar [48].

7 farklı memeli türünde, Nox1-Nox2-Nox3-Nox4-Nox5, dual oksidaz 1 (duox1) ve dual oksidaz 2 (duox2) [49] gibi çeşitli Nox'lar tespit edilmiştir. Tüm bu Nox üyesi proteinlerin ortak bir yapısal homolojisi bulunmaktadır. Bahsedilen bu ortak protein yapısı, histidin bakiyeleri ile iki adet hem-bağlama bölgesini kapsayan 6 transmembran domaininden ve O_2^- üretimini kolaylaştırıcı C-terminal uçta yer alan bir NADPH-bağlayıcı bölgeden oluşmaktadır (Şekil 4.5.1). Nox'lar kademeli biçimde düzenlenir, heterojen olarak eksprese edilir ve işlevsel olarak farklılıklar gösterirler [50].

NADPH oksidazlar membranda elektron alışverişini kontrol eden transmembran protein ailesinin üyesidirler ve NADPH 'a dayalı tepkimede Nox5, O_2^- 'yi süperoksit (O_2^-), üretmek üzere indirgenir. Aynı zamanda hidrojen peroksit üretimi için gerekli olan dismutaz tepkimeleri gerçekleşir. İkincil reaksiyon türlerinin açığa çıkmasını sağlayan bu tür reaksiyonlara örnek peroksinitrit üretimini sağlayan O_2^- 'in niktrik oksit'le (NO) tepkimesi, hidroksil radikalleri (OH \cdot) üretimini sağlayan demir-katalizli Fenton reaksiyonları ve HOCl [46], peroksidazlardır.



Şekil 4.4.1 Nox5'in yapısını gösteren diyagram (Touyz RM., 2019)

4.4.1. NADPH Oksidaz 5 (Nox5)

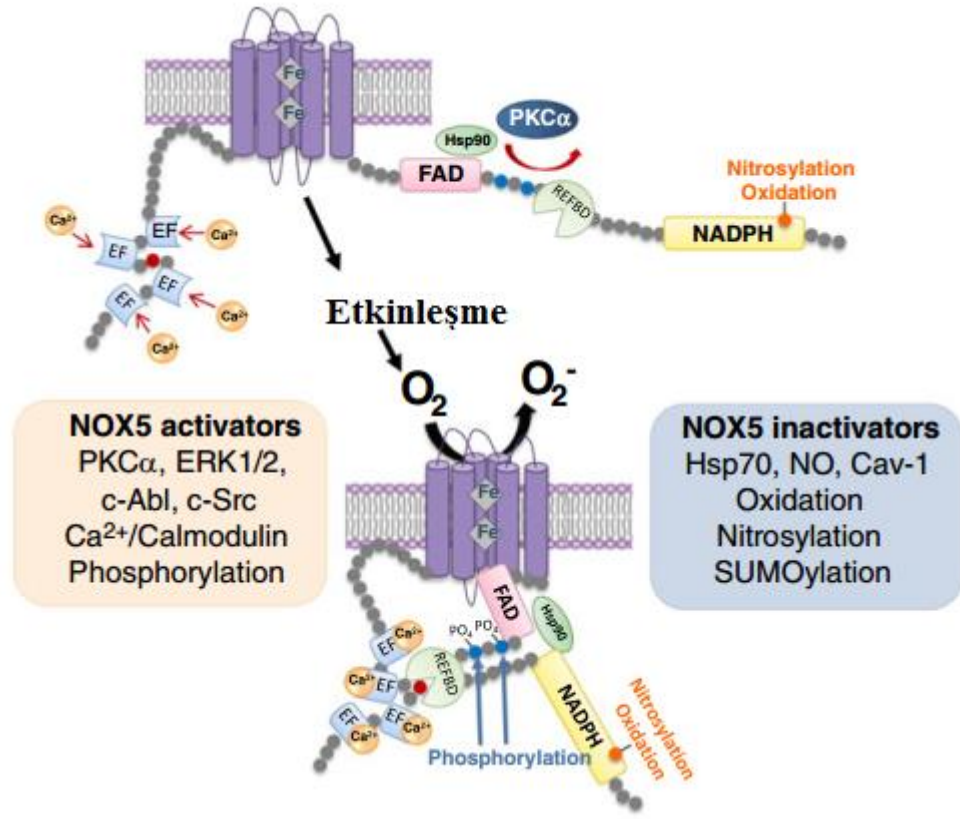
Nox5 yapısal olarak korunmuş, ardışık hem-bağlayıcı bölge içeren 6 adet transmembran-heliklerine ve intraselüler C-terminalinde FAD ve NADPH için bağlanma bölgesi oluşturan flavoprotein homoloji domainine sahiptir [51]. Ancak, kendisini diğer Nox üyesi moleküllerden ayıran birçok karakteristik özelliği de mevcuttur [52]. Nox5'in bu ayırt edici karakteristik özellikleri şu şekilde sıralanır:

1. Nox5 geni kemirgenlerde yoktur ancak memelilerin daha aşağı formunda bulunmaktadır.
2. Tek bir genden O₂⁻ üretimi sağlar.
3. Aktivasyonu için herhangi bir NADPH oksidaz alt ünitesine ihtiyaç duymaz.
4. Ayırt edici N-terminal uzantısı mevcuttur ve bu uzantı 3 ya da 4 adet Ca⁺² bağlayıcı EF hand içerir.

5. Nox5 aktivasyonu intraselüler serbest Ca^{+2} derişimlerine karşı son derece hassastır, buna örnek olarak Nox5 in Ca^{+2} 'un bulunmadığı koşullarda O_2^- üretemediğini ortaya koyan çalışmalar gösterilebilir.
6. Nox5, fosforilasyon ve oksidasyon da dahil olmak üzere çeşitli post-translasyonel modifikasyonlarca düzenlenir ancak Nox2'nin tersine glikolize olmadığı için "bona fide non-glikoprotein olarak tanımlanmıştır.
7. Nox5 kristalize edilmiş ilk ve tek NADPH oksidaz molekülüdür.

Nox5, çeşitli hücre tiplerinin O_2^- üretiminde önemli bir rol oynar. Bu yüzden Nox5 aktivasyonu hücrel indirgenmenin korunması için kontrol edilir. Nox5 aktivasyonu genetik etmenler, Ca^{+2} değişimi, fosforilasyon ve düzenleyici proteinlerle etkileşim de dahil çeşitli düzenleyici işlemleri içermektedir. Ancak buna zıt olarak, Nox5 inaktivasyonunun, özellikle oksidasyon, S-nitrosilasyon ve SUMO'lasyon (small ubiquitin-like modifier) gibi post-translasyonel modifikasyonlara dahil olduğu düşünülmektedir [48].

Nox5, Ca^{+2} artışında (kalmodulin), kinazlar ($PKC\alpha$, ERK1/2, CAM kinase II ve c-Abl) gibi bazı düzenleyici proteinlere yanıt oluşturduğunda veya post-translasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon) varlığında aktive olur. Nox5 yine, düzenleyici proteinler [caveolin-1 (Cav-1)], şaperon molekülleri [heat shock protein 70 (Hsp70)] ve post-translasyonel (oksidasyon, nitrosilasyon ve SUMO'lasyon) tarafından inaktif hale getirilir [53,54] (Şekil 4.5.3.1).



Şekil 4.4.1.1. Nox5'in düzenleyici mekanizmalarını gösteren şematik diyagram
(Touyz RM., 2019)

Nox5 ile ilişkili en ayırt edici özellik bu molekülün düzenlenmesi için Ca^{+2} 'a bağlı olarak çalışmasıdır [55]. Artan Ca^{+2} da aktive olan Nox5, çok aşamalı bazı işlemlerden geçmektedir [56]. İlk aşama Ca^{+2} 'nin artışı takiben, Ca^{+2} 'nin N-terminal bölgedeki "EF hand" domainine bağlanmasıdır. Bu durum, hidrofobik bölgelerin yapısal değişime uğramasına yol açmaktadır. Daha sonra, düzenleyici bölge, C-terminustaki katalitik domaine bağlanarak aktive olmasını sağlar. Nox5'in etkinleşmesi için gerekli olan Ca^{+2} seviyesi oldukça yüksektir ve buna bağlı olarak Ca^{+2} 'ye olan hassasiyetin belirlenmesinde başka bazı düzenleyici sistemler bu olaylara dahil olabilir. Böylelikle daha düşük Ca^{+2} seviyelerinde bile ROT üretimi kolaylaşmış olur. Sonuç olarak, Nox5 Ca^{+2} tarafından direkt olarak ya da diğer protein ve Ca^{+2} bağlayıcı kalmodulin ve PKC gibi kinazlarla etkileşime geçerek de dolaylı yoldan etkinleştirilmektedir [57].

Nox'ların post-translasyonel değişimleri Nox ailesine özel değildir çünkü Nox1, 2, 4 ve 5'in diğer proteinler gibi fosforile ve okside olduğu ve nitrosilatlandığı belirlenmiştir. Nox1-Nox4, Nox5'ten farklı olarak glutasyonilasyona uğramaktadır.

Nox5 in C-terminal bölgesi, bir grup serin ve treonin içermektedir ve bunlar PKC ERK1/2, c-Src, Abl1 ve Ca⁺²-kalmomodulin-dependent protein kinaz II (CAM kinaz II) gibi çeşitli kinazların etkisinde fosforillenirler [58,59]. Bu işlemler daha çok oksidazın fosforillenmesi için kullanılmaktadır [60]. Nox5 fosforilasyonu, Ca⁺²'ye olan hassasiyeti ve buna bağlı olarak oksidaz aktivitesini artırmaktadır.

Nox5 oksidasyonu enzim inaktivasyonu ile bağlantılıdır. Nox5 sistein ve ethionin içermekte ve oksidasyona karşı oldukça hassasiyet kazandırmaktadır [61]. Artan ROT durumunda, Nox5'in Ca⁺² bağlayıcı EF hand domaininde yer alan sistein ve methioni okside olur [62]. Bu durum bağlı Ca⁺² seviyelerini azaltmaktadır. Aynı zamanda enzimatik aktivasyonun azalmasına da neden olmuştur.

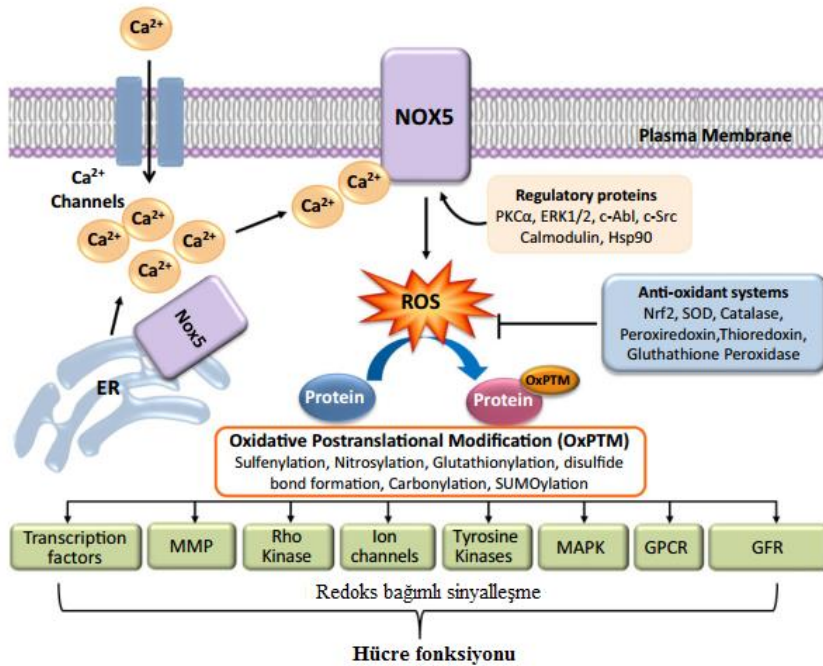
4.4.2. Nox5'in İntraselüler Trafiki

Nox1, 2, 3 ve 4 hücre membran-ilişkili p22phox için gerekli olduklarından dolayı birincil olarak hücre membranında yer alırlar [46]. Ancak buna zıt olarak Nox5 başlıca, perinükleer alanda yer alan hücre içi bölgelerde ve endoplazmik retikulum'da (ER) eksprese edilmektedir [63]. Ayrıca ER işlevi redoksa karşı hassas olup, Nox5 için gerekli olan Ca⁺² bakımından zengin bir ortam sağlamaktadır. Bu sebepten dolayı, ER- Nox5 ilişkisi Nox5 regülasyonunda önemlidir [64].

Hücre içinde Nox5 dinamiktir ve intraselüler bölgelerden kolesterol zengini mikrodomanler (caveolae/lipid yığınları) içeren hücre membranına doğru hareket edebilir. Bu özelliği Nox5 i PKC gibi düzenleyici proteinlerin yakınına getirerek çalışma mekanizmasını etkilemektedir [53]. Aynı zamanda Nox5-türevli ROT ko-lokalizasyonu ve redox-duyarlı moleküller bu mikrodoman bölgelerde sinyal yolağını verimli hale getirmektedir. Bu moleküler mekanizmaların Nox5 trafiki nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir çünkü N-glikolizasyon ve Sar1/Stx5 sinyallerini kullanarak ER plazma membranına hareket eden diğer Nox'ların tersine, Nox5 glikolize edilememektedir [65]. Ancak yinede, Nox5 trafiki glikolize edilmeden Sar1

sinyalini içeriyor gibi gözükmektedir. Nox5 hareketliliğinde yer alan diğer mekanizmalar, Nox5'in N-terminusunda bulunan ve fosfatidilinositol 4,5-bifosfat grubuna bağlanan polibazik domainler ile ilgili çalışmaktadır. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat plazma membranında yer alan çok-işlevli bir lipid molekülüdür. Bu lipid molekülü hücreler arası sinyal yollarının ve veziküler ve hücre-altı trafiğinin, temporal ve spatal özgünlüğünü etkiler [66].

Nox5 Ca^{+2} tarafından ve diğer düzenleyici mekanizmalar tarafından aktive edilir, buna ek olarak perinuklear alandan ve endoplazmik retikulum (ER) dan plazma membranına doğru bir akış gerçekleştirir [67]. Bu bölgede ise süperoksit (O^{-2}) üretmek üzere O_2 'nin indirgenmesini katalizler. Sonuç olarak hidrojen peroksit üretecek şekilde dismutasyon gerçekleşir [H_2O_2 ; spontane olarak üretilir ya da super oksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir]. Pro-oksidant ROT normalde redoks dengesini koruyacak şekilde çeşitli antikosidan sistemler tarafından kontrol edilir. Artan ROT üretimi, redoks sinyalinin ve hücre işlevini etkileyecek oksidatif post-translasyonel modifikasyonlara (OxPTM) yol açar (Şekil 4.4.2.1).



Şekil 4.4.2.1. Nox5'in hücre sinyali ve fonksiyonundaki rolünü gösteren diyagram

. (Touyz RM., 2019)

İnsanlarda, Nox5 geni, altı izoformu (Nox5 α , β , δ , γ , ϵ ve ζ) vardır ve kromozom 15 de yer almaktadır[68]. Nox5 α , β ve γ işlevsel olarak aktif olup ROT üretiminde yer alırlar. α ve β izoformları ana izoformlardır ve Nox ϵ tarafından negatif düzenlenirler bu da Nox5 indüklü ROT üretimini inhibe eder [69]. Nox δ , Nox ϵ ve Nox ζ izoformlarının yeterli miktarda O₂⁻ üretme kapasiteleri olmadığı düşünülmele beraber işlevsel önemleri de henüz ortaya konulamamıştır. Vasküler düz kas hücrelerinde histon deasetilaz 2 gibi epigenetik faktörler, Nox5 geninin promotör bölgesinin upregüle edilmesine yol açmaktadır [70]. İnsan Nox5 gen bölgesinin kodlayıcı sekansında yer alan bazı polimorfik yapılar da tanımlanmıştır. Bu polimorfik bölgerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilebilmesi için Nox5 bölgesindeki single nucleotid polimorfizm (tek nukleotid polimorfizmi) (SNP) 'lerin ROT üretimini nasıl etkilediğini Nox mutanları çeşitli Cos hücrelerinde araştırmışlardır [71]. Buna göre Nox5 kodlayıcı bölgedeki ekzonik SNP'lerin oksidaz molekülünün enzimatik işlevini artırmak yerine azalttığını bulmuşlardır.

Nox5 aktivasyonu için NADPH'a ihtiyaç duymasa bile, çeşitli düzenleyici proteinlerce etkilenmektedir aynı zamanda protein kinaz C (PKC), kalmodulin, kaveolin-1i, c-Abl1 ve şaperon molekülleri (Hsp90 ve HSp70) gibi bazıları direkt olarak Nox5 ile etkileşime girebilir [67]. Bu etkileşimler Nox5 aktivitesini farklı bir biçimde etkilemektedir ve aynı zamanda enzimi sabitlemektedirler. Örneğin, PKC ve kalmodulin Nox5'i Ca⁺²'un aktivasyon artırıcı etkisine karşı hassaslaştırırken, caveolin-1 ile Nox5 etkileşimi, Nox5'in inaktivasyonuna yol açar [54].

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Hasta Grupları

İstanbul Medipol Üniversitesi MEGA Hastanesi Tüp Bebek Polikliniği'nde yapılan çalışmada 20-45 yaş aralığındaki 60 kişiden alınan (normozoospermik n=30, oligoastenoospermik n=30) ve tıbbi atık olarak imha edilecek semen örnekleri kullanılmıştır. İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul'undan etik kurul onayı (10840098-604.01.01-E.16100) alınmış ve çalışma kriterlerini sağlayan her hastadan 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' doldurmaları istenmiştir.

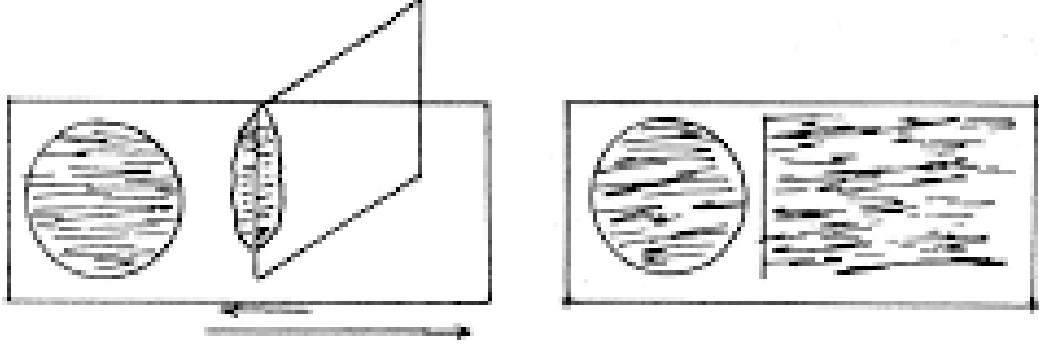
5.2. Hasta Dışlanma Kriterleri

Fizik muayenelerinde varikozel ve ürogenital sistem enfeksiyonu bulguları olan hastalar, testis tümörü, radyoterapi/kemoterapi alan hastalar, lökositospermi, doğumsal ve endokrin hastalık hikayesi olan hastalar ve <20-45> yaş erkek hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir[72]. Katılımcılar herhangi medikal hastalığı olmayan, ilaç kullanmayan hastalar arasından seçilmiştir.

5.3. Semen Analizi

DSÖ kriterleri göz önünde bulundurularak tüp bebek merkezindeki uzman bir kişi tarafından 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası hastanın semen örneği mastürbasyon yoluyla steril toplama kabına alınmıştır. Daha sonra ilk 5 dakika içinde hasta örneği likefaksiyon süresi boyunca 37 °C'lik etüvde 15 dakika bekletilmiştir. Likefaksiyon işleminden sonra semen örneği 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılmasının ardından 5 dakika boyunca 5.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra pastör pipet ile pellet kısmının yarısı alınarak -80 °C'ye, süpernatant kısmı ise -20°C'de muhafaza edilmiştir. Kalan pellet kısmının üzerine 4 ml yıkama medyumu (HTF/HEPES, AR-1023) eklenerek tekrar 5 dakika boyunca 5.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısım atılıp pellet kısmı pastör pipet ile alınıp pozitif şarjlı lama damlatılmış ve yayma preprati olarak hazırlanmıştır (Şekil 5.3.1). Bir droplet lam üzerine konularak yayma preprat hazırlanırken bir başka droplet

makler kamerası üzerine damlatılarak motilite sayımı için mikroskop altında incelenmiştir.



Şekil 5.3.1. Yayma preparatı hazırlama diagramı
(<https://munzur.edu.tr/birimler/akademik/yuksekokul/syo/bolumler/fizik/Pages/file/Mikro06.pdf>)

5.4. Motilite Değerlendirilmesi

Makler sayım kamerası (Sefi Medical Instr) ile 10X10'luk alandaki sperm sayılarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Sperm analiz sonuçları sperm sayısına, motilitelerine göre sınıflandırılmıştır. Yayma preparatları hazırlanarak spermac ve diff-quick boyamaları ile morfolojileri değerlendirilmiştir.

Spermatozoanın hareketlilik bakımından derecelendirilmesi için Faz kontrast mikroskopunda 40X objektif altında 100 sperm sayılmıştır. Motilite oranı belirlemek üzere sperm 4 gruba ayrılmıştır. Bunlar;

- A motilite, progresif motil (ileri hızlı hareketli) sperm için,
- B motilite, yavaş hareketli sperm için,
- C motilite, yerinde hareketli sperm için ve
- D motilite, hareketsiz sperm için olacak şekilde gruplanır ve sonuçlar yüzde (%) olarak verilir.

- A, B ve C motilite oranları toplamı toplam motiliteyi, A motilite oranı ise progresif motil sperm oranı olarak verilir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Laboratuvar kriterlerine göre değerlendirilmiş ve $>15 \times 10^6$ /ml sperm konsantrasyonunda, normal morfoloji $>4\%$ ve toplam hareketliliği $>40\%$ sahip bireyler NS, sperm konsantrasyonu $<15 \times 10^6$ /ml, normal morfolojisi $>4\%$ ve toplam hareketliliği $<40\%$ sahip olanlar ise OAS olarak kabul edilmiştir.

Tablo 5.4.1. DSÖ Sperm Parametreleri, 2010

| PARAMETRELER | 2010 DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ |
|----------------------------|--------------------------------|
| Baş | |
| Genişlik | 2.8 μm |
| Uzunluk | 4.1 μm |
| Boy/En | 1.5 |
| Akrozomal bölge | Başın %40-70'ini kaplamalıdır. |
| Boyun ve orta parça | |
| Genişlik | 0.6 μm |
| Uzunluk | 4.0 μm |
| Sitoplazmik atıklar | < Normal baş alanı 1/3'ü. |
| Kuyruk | |
| Uzunluk | 45 μm |
| Genişlik | < orta parça |

Tablo 5.4.2. DSÖ Semen Parametreleri [73]

| Parametre | DSÖ 2010 |
|---|---------------|
| Semen hacmi (mL) | 1,5 |
| Toplam sperm (10^6/ejakülat) | 39 (33-46) |
| Sperm sayısı/ ml (10^6/ ml) | 15 (12-16) |
| Total motilite (a+b) (%) | 40 (38-42) |
| Hızlı ileri hareketli, % | 32 (31-34) |
| Vitalite (canlı spermatozoa, %) | 58 (55-63) |
| Sperm morfoloji (normal form, %) | 4 (3.00-4.00) |
| pH | ≥ 7.2 |
| Peroxidaz-pozitif lökosit (10^6/ml) | <1.0 |

5.5. Morfolojik Değerlendirme

Spermac stain kit (FertiPro, SPS050) kullanılarak boyanan sperm hücrelerinin baş, boyun, kuyruk morfolojisi gözlemlenmiş ve faz-kontrast mikroskobu (Olympus BX51) ile değerlendirilmiştir

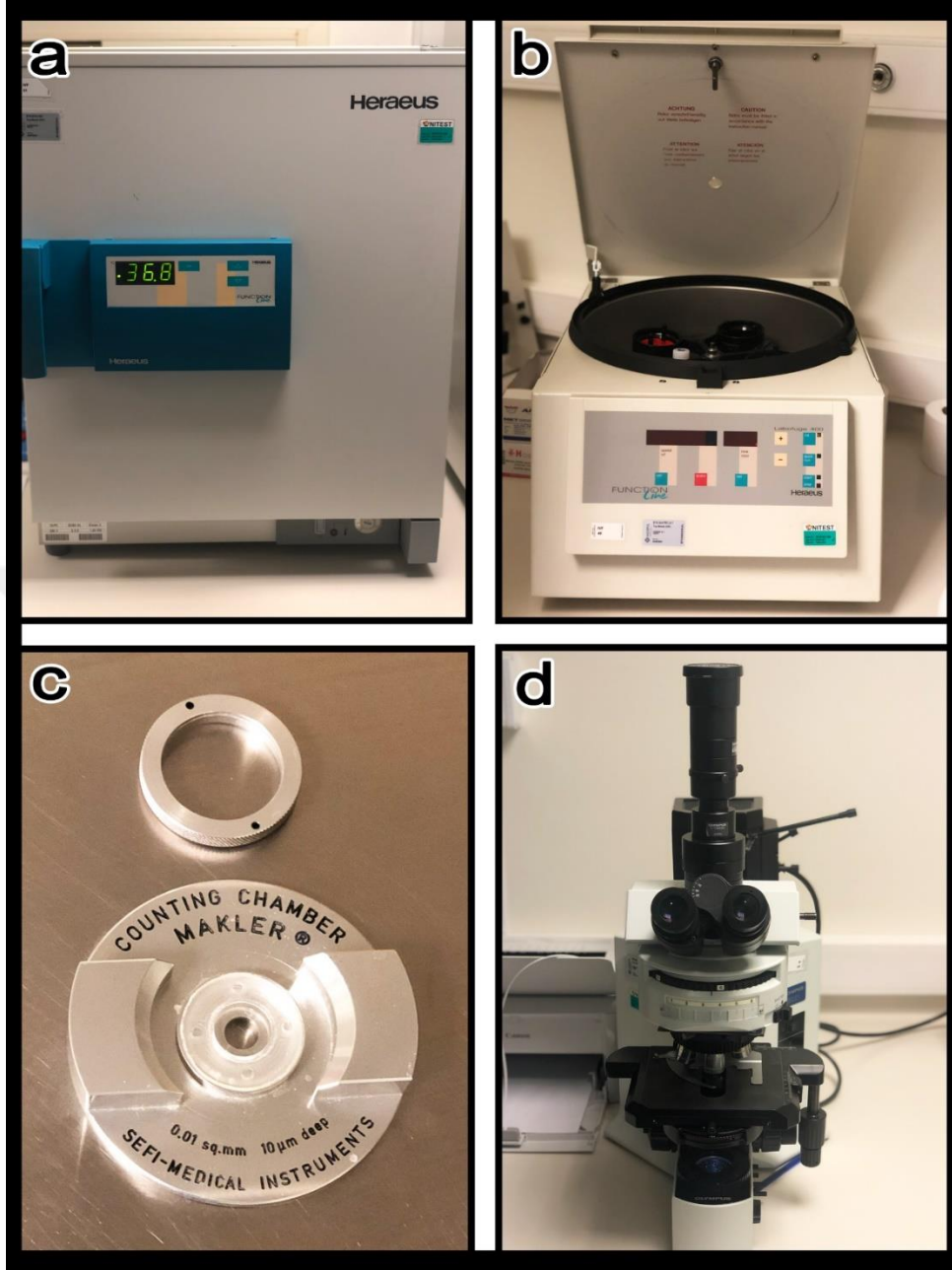
1. Sperm örnekleri lam üzerine damlatılmıştır ve diğer bir lam ile 45° lik bir açıyla sperm yayması yapılmıştır.
2. Kuruduktan sonra sırası ile fiksatif ve üç farklı boyama (A, B, C) solüsyonunda her birinde birer dakika tutularak boyanması sağlanmıştır. Spermac stain kit bazik bir boyama olduğu ve nükleusta asidik bir yapıya sahip olduğu için A boyası spermin baş bölgesini boyamıştır. B ve C boyası ise sırasıyla spermin boyun ve kuyruk bölgelerini boyamıştır.
3. Preparatlar kuruduktan sonra faz-kontrast mikroskobunda 100X büyütme ile Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir.
4. Baş, boyun, kuyruk ve sitoplazma morfolojilerine bakılarak 'ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ni) altında fotoğraf çekilmiştir.



Şekil 5.5.1. Spermac stain kit

Diff-Quick kiti kullanılarak spermlerin baş, boyun, kuyruk morfolojileri ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ni) ile değerlendirilmiştir.

1. Yayma preparatları kuruduktan sonra şale içindeki fiksatifte (metil alkol içinde tri-methan boyası) 15 saniye tutulmuştur.
2. Solüsyon 1 (ksantin boyası) içinde 10 saniye tutulmuştur.
3. Solüsyon 2 (azine A ve metilen mavisi) içinde 5 sn tutulmuştur.
4. Preparat çeşme suyu ile yıkanmıştır.
5. Daha sonra preparatlar ışık mikroskobunda 100X objektifi ile değerlendirilmiştir



Şekil 5.5.2. Sperm morfoloji analizlerinde kullanılan laboratuvar ekipmanları

a) Etüv (Heraeus,Almanya), **b)** Santrifüj (Heraeus,Almanya), **c)** Makler Sayım Kamerası (Sefi-Medical Instruments,İsrail), **d)** Faz-Kontrast Mikroskopuna (Olympus, Japonya) ait görüntüler.

5.6. Sperm Kromatin Yapısı

Çalışma hipotezi doğrultusunda hasta gruplarına ait sperm hücrelerindeki kromatin yapısını göstermek amacıyla toluidin blue ile boyama yapılmıştır.

- Sperm yayma örnekleri 4°C'de %96'lık etanol-aseton içerisinde fikse edilmiştir.
- Preparatlar 0.1 N HCl içerisinde hidroliz edildikten sonra distile su ile yıkanmıştır.
- Ardından preparatlar 10 dakika %0,05 toluidin blue boyası ile boyanmıştır.
- Distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Preparatlar kuruduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak 100X objektifinde ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ni) ile değerlendirilmiştir.

5.7. Sperm Örneklerinden Total Oksidan ve Total Antioksidan Miktarlarının Belirlenmesi

5.7.1 ROT ölçümü

ROT ölçümü için alınan semen örneklerinin seminal plazması kullanılmıştır. Semen örnekleri santrifüj ile çöktürüldükten sonra süpernatant kısmında ROT ölçümü gerçekleştirilmiştir.

- **Total Antioksidan Tayini (TAS)**

Total antioksidan seminal plazmada kolorimetrik olarak ölçülmüştür. ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) reaktifi; tampon çözelti varlığında ortamın pH'sı sabit tutularak; hidrojen peroksit ile radikal hale getirilmiştir. Oluşan çözelti kendine özgü koyu yeşil-lacivert arası bir renge sahiptir. Seminal plazma ilave edildiğinde seminal plazma içerisindeki antioksidanlar mevcut ABTS radikallerini nötralize etmiştir. Nötralizasyon gerçekleştiği ölçüde çözeltinin rengi açılmıştır. Dolayısıyla seminal plazma bulunan total antioksidan miktarı ile çözeltinin renk şiddeti orantılıdır. 658 nm'de çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Standart olarak kullandığımız çözeltinin absorbans molarite verileri kullanılarak numunenin total antioksidan molaritesi hesaplanmıştır.

- **Total Oksidan Tayini (TOS)**

Total oksidan seminal plazmada kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Fe_2SO_4 suda çözünür ve Fe^{2+} açığa çıkmıştır. Seminal plazmada bulunan oksidanlar Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} e yükseltgenmesini sağlamıştır. Kullanılan X-orange reaktifi Fe^{3+} ile renkli bir kompleks vermiştir. Oluşan rengin şiddeti; total oksidan miktarı ile orantılıdır. 658 nm'de absorbans ölçülmüştür. Standart olarak kullandığımız çözeltinin absorbans değerleri kullanılarak; numunenin total oksidan molaritesi hesaplanmıştır.

Oksidatif stres indeksi (OSİ) is $TOS/TAS \times 10$ formülü ile hesaplanarak bulunmuştur.

5.8. Sperm Hücrelerinde Nox5 Proteininin İmmünohistokimya Analizi

- Hastalardan alınan örnekler likefiye olduktan sonra yıkanmıştır ve pellet kısmı ayrılıp pozitif şarjlı lama yayma preparat olarak hazırlanmıştır.
- Örnekleri fikse etmek amacıyla %4'lük Nötral Buffered Tamponlu Formalin solüsyonunda oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir.
- Daha sonra şale içerisindeki PBS solüsyonunda 5 dakika olmak üzere 3 kez yıkanmıştır.
- Hücrelerdeki endojen peroksidaz aktivasyonunu doyurmak amacıyla preparatlar %3'lük H_2O_2 içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Solüsyondan alınan örnekler 3 defa 5'er dakika olmak üzere PBS'te yıkanmıştır.
- 10 ml Sitrat Buffer ve 90 ml distile su ile hazırlanan solüsyonda 800 Watt'ta kaynama işlemi gerçekleşene kadar mikrodalgada kaynatılmıştır. Kaynayan sitrat buffer içerisine örnekler koyulup 200 watt'ta 10 dakika kaynatılmıştır ve daha sonra 30 dakika oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuştur.
- Preparatlar soğutulduktan sonra 5'er dakika olmak üzere 3 kere PBS ile yıkanmıştır.
- Bloking solüsyonu örnekleri kapatacak kadar damlatılarak 10 dakika bekletilmiştir.

- Primer antikor NOX5 (Abcam, cat no: ab191010, 1/50 dilüsyon) preparat üzerine damlatılmış ve 1 gece +4°'de nemli ortamda inkübasyonu sağlanmıştır.
- Ertesi gün inkübasyondan alınan preparatlar 3 defa 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkanmıştır.
- Biotinlenmiş solüsyonu örneklerin üzerini kapatacak kadar damlatılarak 10 dakika oda sıcaklığında, nemli bir ortamda bekletilmiştir.
- Daha sonra preparatlar 5'er dakika olmak üzere 3 kere PBS ile yıkanmıştır.
- Yıkandıktan sonra üzerine HRP enzim solüsyonu damlatılarak 10 dakika boyunca aynı şartlarda bekletilmiştir.
- 1/50 oranında DAB kromojen/substrat hazırlanmıştır ve boyanma gözlemlenerek yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir.
- Süre sonunda Mayer's hematoksilen boyası damlatılarak 3 dakika bekletilmiş ve çeşme suyunda mordanlama işlemi yapıldıktan sonra preparatlar biomount ile kapatılmıştır.
- Preparatlar kuruduktan sonra Nox5 protein ekspresyonu gösteren bölgelerin skorlaması yapıp 100X objektifinde ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ni) altında fotoğrafları çekilmiştir[74].

5.9. Western Blot Analizi

Alınan semen örnekleri -80°C'de saklanarak, aynı gruba ait örneklerden eşit hacimde alınıp birleştirilerek havuzlama (pooling) metodu ile analiz yapılmıştır. Gruplara ait semen örnekleri 4 °C' de 15 dakika 10,000 × g' de santifurüj edilerek süpernatant atılıp hücresel kısım elde edilmiş ve RIPA lizis tamponu ile homojenize edilmiştir. Homojenat 4 °C' de 15 dakika 10,000 × g' de santifurüj edilerek süpernatant toplanmıştır. Daha sonra NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılarak süpernatantlardaki total protein miktarları spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır. %1.25 2-merkaptotanol ilave edilmiş örnek tamponu ile karıştırılan protein örnekleri kuru blok ısıtıcı kullanılarak 70°C' de 10 dakika denatüre edilmiştir. Örnekler ve protein standardı SURELOCK XCELL dikey jel sistemi (Invitrogen) elektroforez düzeneğinde hazır Bolt %4-12'lik Bis-Tris gradient jeline yüklenerek

yürütme çözeltisi içinde, 160 volt' ta yürütülmüştür. Elektroforezden sonra jeller çıkarılıp iBlot 2 PVDF Regular Stack sandviç sistem (Invitrogen –IB24001) içerisine yerleştirilip iBlot 2 Dry Blotting Sistem kullanılarak 7 dk' da proteinlerin PVDF membrana transferi gerçekleştirilmiştir. iBind solüsyon kiti ve kartları kullanılarak iBind deteksiyon cihazı (Invitrogen-SLF1000) ile membran deteksiyon işlemi uygulanmıştır. Bu sistemle tayin edilecek protein miktarını saptamak için proteinlerin aktarıldığı PVDF membran bloklama solüsyonu, Nox5 birincil antikor (Abcam, cat no: ab191010, 1/400 dilüsyon) ve HRP bağlı ikincil antikor ile inkübe edilmiştir. Deteksiyon işleminden sonra distile su ile yıkanan membranlar ECL kemiluminesans kit (Advansta, K-12045-D20) kullanılarak görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir. Protein miktarlarının normalizasyonu β -Aktin kullanılarak yapılmıştır. Görüntülenen protein bantları Image J programı kullanılarak dansitometrik olarak ölçülüp sayısal veriler elde edilmiştir.

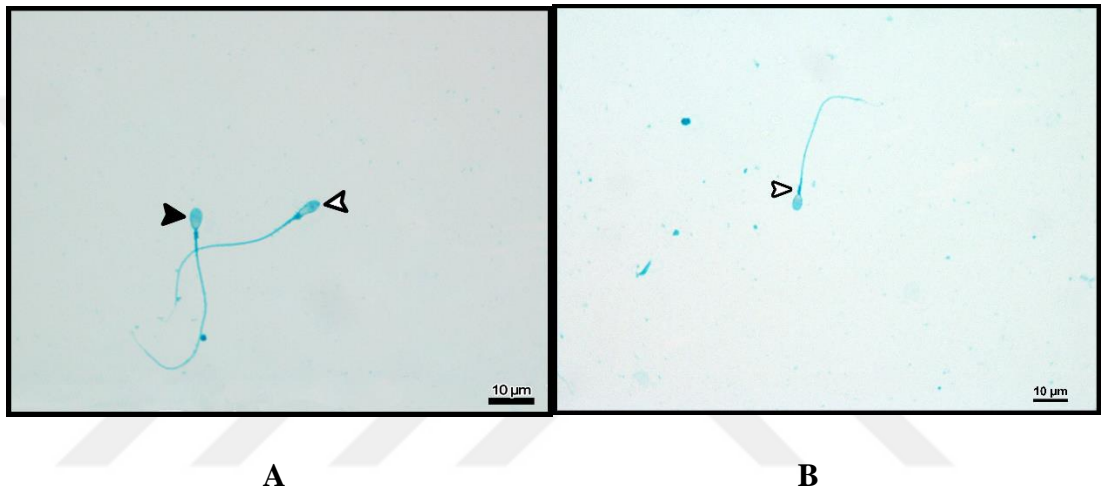
5.10. İstatiksel Analiz

Yapılan ölçümlerin istatistiksel analizi Graph-Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizler için Student t testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

6. BULGULAR

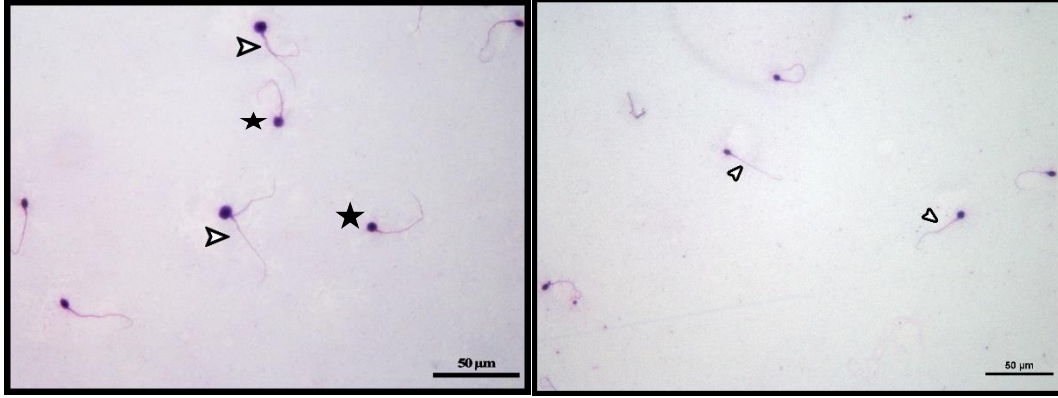
6.1. Morfolojik Analiz

NS ve OAS hastalara ait sperm hücreleri ile yapılan morfolojik değerlendirme Spermac boyama ve Diff-quick boyama yöntemleriyle yapılmıştır. NS hastalarda normal morfolojide sperm gözlemlenirken, OAS hastalarda boyun kırığı, kıvrık kuyruk, sitoplazmik droplet gibi defektler gözlemlenmiştir (Şekil 6.1.1, Şekil 6.1.2).



Şekil 6.1.1. Spermac boyama

Spermac boyası ile boyanan sperm hücrelerinin morfolojileri gösterilmiştir. OAS grubundaki normal baş morfolojisine sahip hücreler (siyah ok) ve uzun baş morfolojisine sahip hücreler (beyaz ok) gösterilmiştir (Şekil 6.1.1. A). NS grubuna ait sperm hücreleri gösterilmiştir. (Şekil 6.1.1. B). **Bar=10 µm.**



A

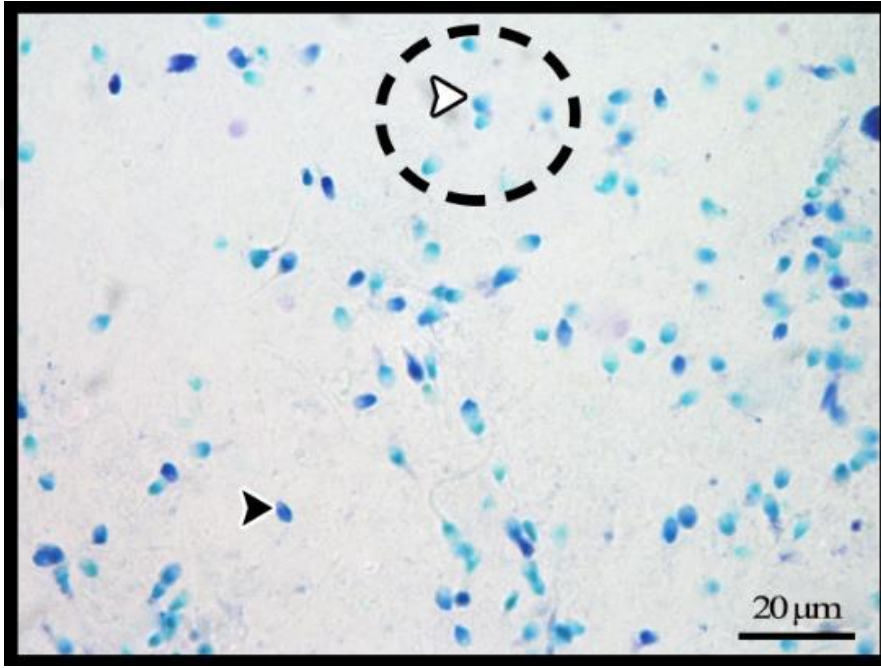
B

Şekil 6.1.2. Diff-quick boyama

Diff-quick boyası ile boyanan OAS grubuna ait çift kuyruk anomalisine sahip sperm hücreleri (beyaz ok başı) ve yuvarlak baş anomalisine sahip sperm hücreleri (yıldız) gösterilmiştir (Şekil 6.1.3. A). NS grubuna ait sperm hücreleri (beyaz ok başı) gösterilmiştir (Şekil 6.1.3. B). **Bar=50 µm.**

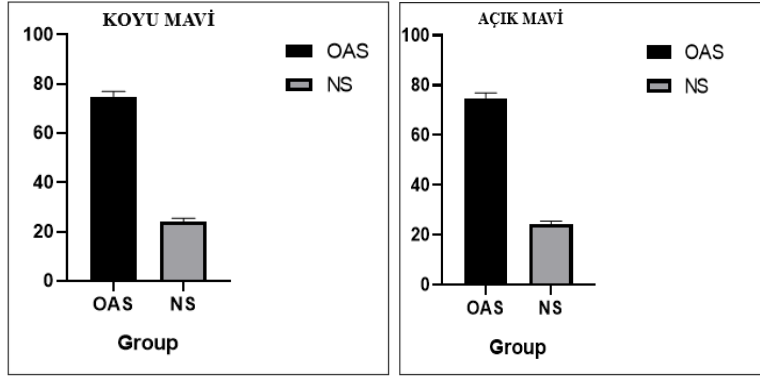
6.2. Sperm Kromatin Yapısının Belirlenmesi

Sperm kromatin yapısının belirlenmesi için toluidin blue boyama yapılmıştır (6.2.1). NS ve OAS hastaların kromatin yapısındaki bütünlüğün bozulması kıyaslandığında OAS grubunun sperm başı daha koyu boyanmış ve istatistiksel olarak NS grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 6.2.1.1-A).



Şekil 6.2.1. NS ve OAS gruplarının kromatin bütünlüğü analizi

Anormal kromatin bütünlüğüne sahip olanlar koyu mavi olarak boyanmış ve TB (+) (siyah ok başı) olarak belirtilmiştir. Normal kromatin yapısına sahip sperm hücreleri açık mavi renge boyanmış ve TB (-) (beyaz ok başı) olarak belirtilmiştir. **Bar:20 µm**



A

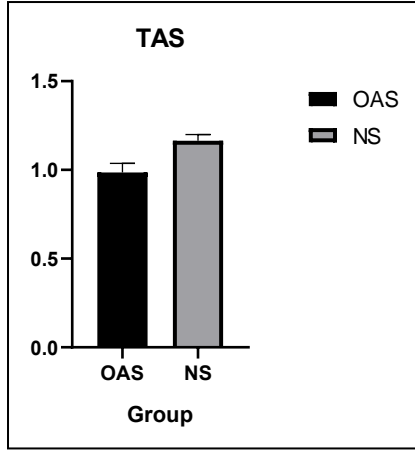
B

| Grup | | Mean±Std. Deviation |
|--------------------|-----|---------------------|
| Toluidin Blue Acik | OAS | 25,11 ± 10,41 |
| | NS | 75,83 ± 7,70 |
| Toluidin Blue Koyu | OAS | 74,88±10,41 |
| | NS | 24,16±7,70 |

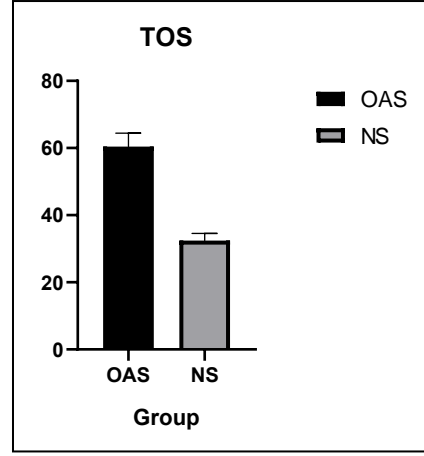
Şekil 6.2.1.1. NS ve OAS gruplarının kromatin bütünlüğü analizi

6.3. Sperm Örneklerinden Oksidan ve Antioksidan Miktarlarının Belirlenmesi

TOS ve TAS oranları gruplar arasında karşılaştırıldığında; OAS grubundaki oksidan düzeyi NS grubuna göre daha yüksek olarak bulunmuştur ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 6.4.1-B), Gruplar total antioksidan düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında ise NS grubunda OAS grubuna göre daha yüksek antioksidan seviyesi belirlenmiş ($p < 0.05$) (Şekil 6.4.1-A). Yine OAS grubunda oksidatif stres NS grubundaki değere oranla anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 6.4.2). Oksidatif stres (OS) $TOS/TAS \times 10$ formülü ile hesaplanarak bulunmuştur.

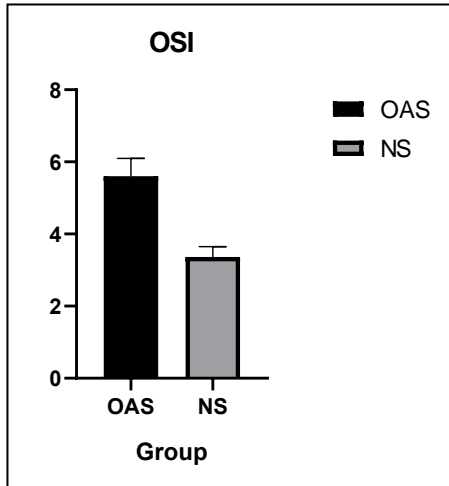


A



B

Şekil 6.4.1. NS ve OAS hasta grupları arasında total antioksidan ve total oksidan seviyelerinin değerlendirilmesi



| Grup | | Mean±Std. Deviation |
|------|-----|---------------------|
| TAK | OAS | 0,98 ± 0,26 |
| | NS | 1,16 ± 0,19 |
| TOS | OAS | 60,43 ± 20,53 |
| | NS | 32,45 ± 11,59 |
| OSI | OAS | 5,60 ± 2,49 |
| | NS | 3,36 ± 1,57 |

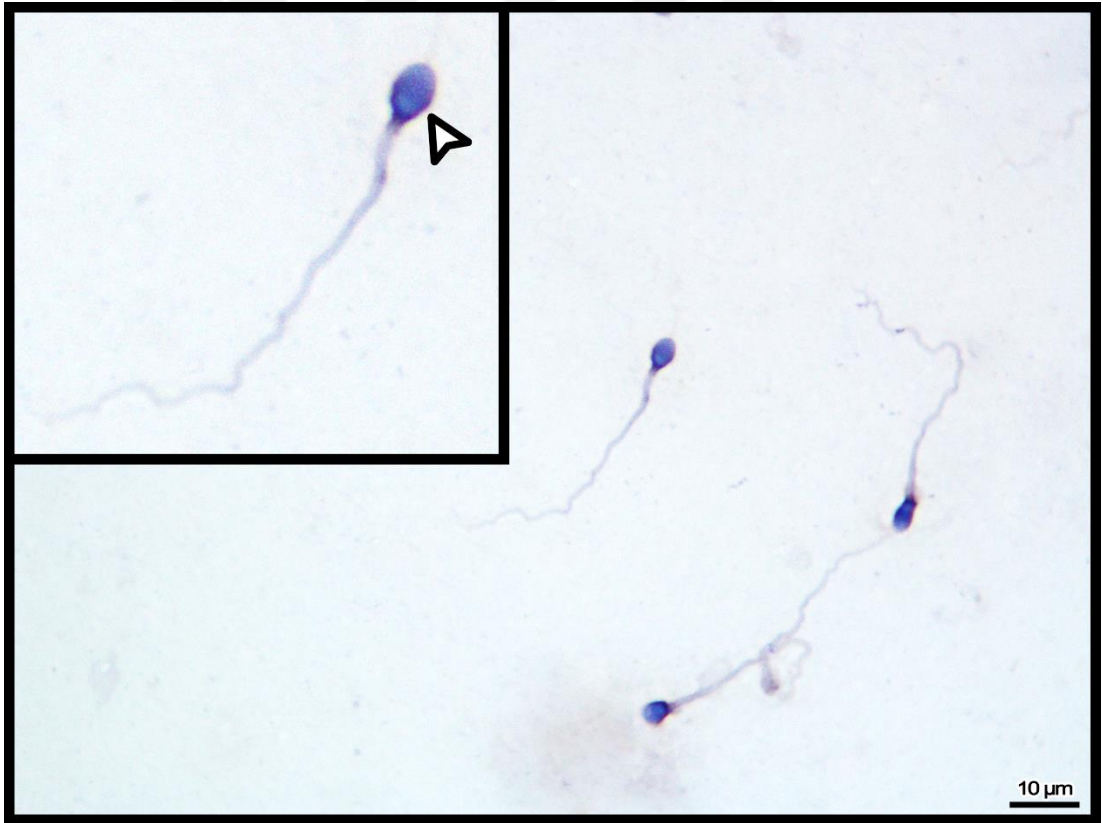
Şekil 6.4.2. NS ve OAS hasta grupları arasında oksitativ stres değerlendirilmesi

OAS hastalarda oksidatif stres istatiksels olarak NS hastalara göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$).

6.5. İmmünohistokimya Bulguları

NS ve OAS hastalarına ait sperm hücrelerindeki hasta Nox5 protein lokalizasyonu immünohistokimya ile belirlenmiştir. OAS grubunda sperm plazma membranında ve kuyrukta boyanma gözlemlenirken (şekil 6.5.2), NS grupta boyanma gözlemlenmemiştir (şekil 6.5.1).

NS grubu ile OAS grubunun boyanma oranlarının istatiksels değerlendirmesinde spermin plazma membranı (P.M.) ($p<0.001$), kuyruk ($p<0.001$) ve plazma membranı+kuyruk (P.M.+kuyruk) ($p<0.001$) bölümlerinde Nox5 proteinin anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.001$) (TABLO 6.6).



şekil 6.5.1. NS Hastalarında Nox5'in immünohistokimya boyaması

Nox5 işaretleme yapılan sperm hücresi (beyaz ok başı). NS grupta boyanma gözlemlenmemiştir. **Bar=10 µm**



Şekil 6.5.2. OAS hastalarda Nox5'in immünohistokimya boyaması

OAS grubundaki hasta örneklerinde IHC boyama sonucunda NOX5 proteininin plazma membranında (beyaz ok başı) ve kuyruk (siyah ok başı) bölgesinde eksprese olduğu gözlemlenmiştir. **Bar=10 µm**

Tablo 6.6. OAS ve NS Gruplarındaki NOX5 Proteininin İmmünohistokimyasal Skorlama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

| GRUP | | Mean ± Std. Deviation | <i>p</i> |
|-------------------------|-----|-----------------------|-----------------|
| Plazma Membranı | OAS | 61,96 ± 17,92 | <i>p</i> <0,001 |
| | NS | 14,17 ± 9,31 | |
| KUYRUK | OAS | 45,30 ± 17,57 | <i>p</i> <0,001 |
| | NS | 9,47 ± 7,66 | |
| Plazma Membranı +KUYRUK | OAS | 32,04±16,25 | <i>p</i> <0,001 |
| | NS | 7,63±6,45 | |

Tablo 6.7. NOX5 Protein Ekspresyonunun Kromatin Yapısı, Oksitatif Stres ve Motilite ile Korelasyonu. (P.M: Plazma Membranı; OS: Oksitatif Stres)

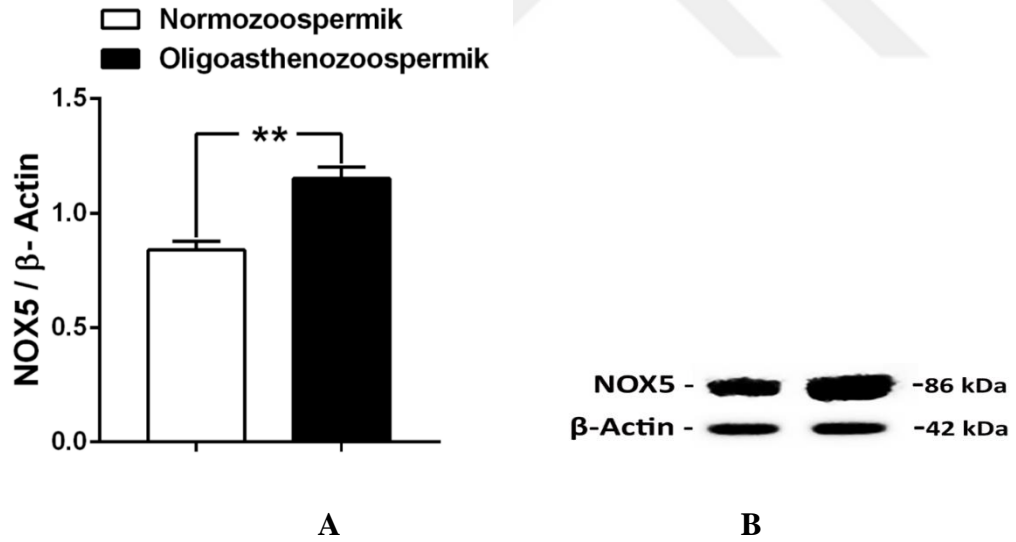
| Değişkenler | Plazma Membranı | Kuyruk | P.M + Kuyruk | OS | Kromatin Yapı | Motilite |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Plazma Membranı | | R=0.94 <i>p</i> <0.01 | R=0.90 <i>p</i> <0.01 | R=0.58 <i>p</i> <0.01 | R=0.84 <i>p</i> <0.01 | R=-0.64 <i>p</i> <0.01 |
| Kuyruk | R=0.94 <i>p</i> <0.01 | | R=0.95 <i>p</i> <0.01 | R=0.47 <i>p</i> <0.01 | R=0.82 <i>p</i> <0.01 | R=-0.62 <i>p</i> <0.01 |
| P.M + Kuyruk | R= 0.90 <i>p</i> <0.01 | R=0.95 <i>p</i> <0.01 | | R=0.47 <i>p</i> <0.01 | R=0.74 <i>p</i> <0.01 | R=-0.54 <i>p</i> <0.01 |
| OS | R=0.5 <i>p</i> <0.01 | R=0.47 <i>p</i> <0.01 | R=0.47 <i>p</i> <0.01 | | R=0.47 <i>p</i> <0.01 | R=-0.27 <i>p</i> <0.05 |
| Kromatin Yapı | R=0.84 <i>p</i> <0.01 | R=0.82 <i>p</i> <0.01 | R=0.74 <i>p</i> <0.01 | R=0.47 <i>p</i> <0.01 | | R=-0.73 <i>p</i> <0.01 |
| Motilite | R=-0.64 <i>p</i> <0.01 | R=-0.62 <i>p</i> <0.01 | R=-0.54 <i>p</i> <0.01 | R=-0.27 <i>p</i> <0.05 | R=-0.72 <i>p</i> <0.01 | |

Nox5 protein ekspresyonu kromatin yapısındaki bozukluklar ve oksitatif stres ile pozitif korelasyon göstermiştir (*p* <0.01). Aynı zamanda Nox5 protein ekspresyonu pozitif yönde arttıkça motilite oranı azalarak negatif korelasyon göstermiştir (*p* <0.01).

6.8. Western Blot Bulguları

NS ve OAS hasta grupları karşılaştırıldığında; OAS grubundaki Nox5 protein ekspresyonu NS grubundaki Nox5 protein ekspresyonuna göre daha yüksektir. ($p < 0.0022$)

| | <i>Mean ± Std. Deviation</i> | <i>P value</i> |
|-----------------------|------------------------------|----------------|
| Normozoospermik | 0,8394 ± 0,03803 | 0,0022 |
| Oligoastenozoospermik | 1,151 ± 0,05101 | |



Şekil 6.8.1. Nox5'in protein ekspresyonu

7.TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, erkek infertilitesinde ROT'a bağlı Nox5 proteinin; sperm kromatin yapısı, oksidatif stres ve sperm motilitesi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Nox5 özellikle testis, uterus, dalak, lenf nodülleri ve endotelial hücrelerde eksprese edilmektedir[75]. Ek olarak, yeni yapılan çalışmalarda Nox5'in insan spermelerinde de etkili olduğu saptanmıştır [75]. Nox ailesi başlıca ROT ilişkili hücre içi sinyalinde kullanılan transmembran proteinleri içermektedir. Bu ailenin bir üyesi olan Nox5' e, insanlara ve atlara ait pakiten ve round spermatidlerinin aktif redoks sisteminde rastlanmıştır [10]. İmmünofloresan yöntemi ile Nox5 proteininin insan spermatozoasının plazma membranı ve kuyruk bölgelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir [75]. Daha önceki çalışmalara benzer olarak yaptığımız çalışma kapsamında da IHC yöntemi ile incelediğimiz Nox5 proteinin sperm hücrelerinin membranı ve kuyruk bölgelerinde eksprese edildiği gözlemlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada Nox5 aktivasyonunun H₂O₂'ye bağlı O₂⁻ üretimini tetiklediği ve bunun da sperm motilitesini azalttığı saptanmıştır. Çünkü Nox5 ekspresyonu arttığında ROT seviyesinde de artış olur ve bu da sperm motilitesini azaltmaktadır [12]. Çalışmamızda da Nox5 miktarına bağlı olarak ROT miktarı artma göstermiş ve bu artma oksidatif strese neden olmuştur. Öte yandan sperm motilitesinde de azalma olduğu saptanmıştır.

Yapılan bir diğer çalışmada da western blot sonuçlarına göre NS ve astenozoospermik grupları arasında Nox5 protein ekspresyonunun astenozoospermik hasta grubunda anlamlı bir artış gösterdiği ortaya konulmuştur [12]. Çalışmamızda Nox5 protein ekspresyonuna Western Blot ve IHC yöntemleriyle bakılmıştır. Nox5 protein ekspresyonu NS ile OAS grupları arasında bakılmış ve OAS grubun Nox5 protein ekspresyonunda, NS gruba kıyasla anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır.

Yapılan bir başka çalışmada ise Nox5 protein ekspresyonunun artması sonucunda, kromatin yapısında bozulmalar olduğu belirtilmiştir [12]. Yaptığımız çalışmada da Nox5 protein ekspresyonu arttığında kromatin yapısının değiştiği

gözlemlenmiştir. Sperm kromatin yapısı toluidin blue ile belirlenmiştir. Bu yapı NS ve OAS grupları arasında değerlendirilmiş ve araştırılan diğer parametrelerle (Nox5 protein ekspresyonu, oksitativ stres ve motilite) ilişkisi analiz edilmiştir.

Katyonik bir boya olan toluidin blue boyaması sperm DNA'sında bulunan fosfat gruplarına bağlanır ve sperm kromatin yapısındaki bozulmaları ortaya çıkarır[76]. Bu boyama yöntemi sperm kromatin bütünlüğündeki ve paketlenmesindeki bozuklukları tespit etmek için kullanılır. Kromatin yapısı gevşek bir şekilde paketlenmiş olan sperm çekirdeğindeki fosfat grupları, toluidin mavisi gibi bazik boya ile bağlanırlar. Öte yandan koyu boyanan ya da diğer bir deyişle metakromatik boyanan hücrelerde zayıf bir kromatin bütünlüğünün olduğu kabul edilir[77]. Yapılan bir çalışmada NS grubu ile OAS grubu karşılaştırıldığında; OAS grubunda daha fazla kromatin anomalisi olduğu ve motilite ile arasında negatif korelasyon olduğu gözlemlenmiştir[78]. Diğer bir çalışmada ise astenozoospermik hastalarda artan OS söz konusu iken, yükselen ROT miktarı antioksidan savunma mekanizmasını baskılamış, plazma membran ve DNA hasarına sebep olarak sperm işlevini olumsuz etkilemiştir. Buna ek olarak, artan OS miktarı motilitenin bozulmasına yol açmıştır[76,77]. Çalışmamız kapsamında OAS grubunda kromatin yapısında anomali ve OS miktarı ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir.

Serbest radikallerin ilk tanımlanışının üzerinden bir asırdan daha uzun bir dönem geçmiştir ve organik molekülleri kapsayan oksidasyon-redüksiyon tepkimeleri ilk kez ele alınmıştır [36]. Serbest radikaller kısa-ömürlü kimyasal ara maddelerdir ve bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron çiftleri barındırırlar. Aynı zamanda, hormonlar da, çeşitli metabolik yolları düzenleyebilirler [81]. Biyolojik tepkimeler çerçevesinde, ROT'ların zararlı olmasının yanı sıra faydalı olduğu durumlar da vardır. Örneğin belli bir miktar ROT, sperm maturasyonu, kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom tepkimesi, zona pellusida bağlanma özelliği ve sperm-oosit etkileşimleri için gereklidir [82]. OS'te hücre hasara ve temel metabolik işlemlerde zarara yol açan ROT'ların aşırı miktarda artması sonucunda antioksidanlar devreye girer, ancak antioksidan moleküllerinin aşırı miktardaki ROT'ları ortamdaki uzaklaştıramaması sonucu antioksidan moleküller ve reaktif oksijen türevleri arasındaki denge bozulur [83]. Buna bağlı olarak OS hasarlı spermatogenezis için potansiyel risk faktörü olarak

ele alınmaktadır [84]. Bizim çalışmamızda da OAS grubunun NS grubuna kıyasla oksidatif stresten etkilendiği gözlemlenmiştir. Artan ROT miktarının erkek üreme işlevleri üzerindeki etkisi iki mekanizma üzerinden açıklanmaktadır: ilk olarak sperm membran yapısına zarar verebilir, motilitesini [85] ve dölleme potansiyelini etkileyebilir. İkincisi ise germ hücre DNA'sında yol açtığı hasara bağlı olarak apoptozu arttırabilir ve apoptoz artışı ise embriyo üzerinde paternal genomik katkının bozulmasına yol açabilir [86]. Bu sebepten dolayı, özellikle idiyopatik infertil, erkek hastalarda erkek infertilite etiyojisine etki eden birincil faktördür [87]. Semen plazmasında ROT artmasına karşılık antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalışı, üreme problemlerinin temelini oluşturmaktadır. Spermatozoonlarda artan ROT miktarı ise DNA hasarı ve azalan motilite ile bağlantılıdır ve artan ROT seviyesi sperm motilitesini azaltmaktadır [88]. Bizim çalışmamızda da artan ROT miktarı sonucu oluşan OS'in arttığı ve motiliteyle arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında; OAS grubundaki Nox5 protein ekspresyonu artışının, NS grubundaki artışa oranla daha anlamlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Nox5 proteinin ekspresyonu artışı oksidatif stres ve kromatin yapısı ile pozitif korelasyon, motiliteyle ise negatif korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur.

Bu sonuçlar doğrultusunda Nox5 proteininin erkek infertilitesinde önemli bir etkisinin olduğu gözlenmiştir. Nox5 protein ekspresyonu oksidatif stres ve kromatin anomalisi ile pozitif korelasyon gösterirken bir diğer taraftan motilite ile negatif korelasyon gösterdiği göz önüne alınarak, IVF (In-Vitro Fertilizasyon) laboratuvarında kullanılabilir bir biyomarker olarak düşünmekteyiz. Bu etkiyi ayrıntılarıyla açıklayabilmek için ileriye yönelik daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Thoma ME, McLain AC, Louis JF, et al. Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertil Steril.* 99(5):1324-1331.e1, 2013.
2. Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol.* 17(2):87-97, 2019.
3. Ferramosca A, Pinto Provenzano S, Montagna DD, Coppola L, Zara V. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology.* 82(1):78-83, 2013.
4. Pignol B, Auvin S, Carré D, Marin JG, Chabrier PE. Calpain inhibitors and antioxidants act synergistically to prevent cell necrosis: Effects of the novel dual inhibitors (cysteine protease inhibitor and antioxidant) BN 82204 and its pro-drug BN 82270. *J Neurochem.* 98(4):1217-1228, 2006.
5. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem.* 97(6):1634-1658, 2006.
6. Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction.* 146(5), 2013.
7. Homa ST, Vassiliou AM, Stone J, et al. A comparison between two assays for measuring seminal oxidative stress and their relationship with sperm DNA fragmentation and semen parameters. *Genes (Basel).* 10(3):6-9, 2019.
8. Agarwal A, Selvam MKP, Baskaran S, Cho CL. Sperm DNA damage and its impact on male reproductive health: A critical review for clinicians, reproductive professionals and researchers. *Expert Rev Mol Diagn.* 19(6):443-457, 2019.
9. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *J Androl.* 23(6):737-752, 2002.

10. Sabeur K, Ball BA. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction*. 134(2):263-270, 2007.
11. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 49(10):1-9, 2017.
12. Vatannejad A, Tavilani H, Sadeghi MR, et al. Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men. *J Endocrinol Invest*. 42(10):1181-1189, 2019.
13. Infertility definitions and terminology.
14. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril*. 99(4):998-1007, 2013.
15. Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: Relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod*. 21(4):986-993, 2006.
16. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 13(1):1-9, 2015.
17. Jeng HAC, Lin WY, Chao MR, Pan CH. Semen quality and sperm DNA damage associated with oxidative stress in relation to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng*. 53(14):1221-1228, 2018.
18. Michael H. Ross WP. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas.*; 2014.
19. Anthony L. Mescher. *Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas.*; 2019.
20. Kierszenbaum, A., *Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş.*; 2006.
21. Reece, J B. *Campbell biology*. In: Pearson Boston; 2014:984.
22. Ross, H. M., & JL, P. (2014). *Histoloji konu anlatımı ve atlas*. Çev. Ed: Baykal

B, 6 792-796. *No Title*.

23. Sueoka T, Koyama K, Hayashi G, Okamoto A. Chemistry-Driven Epigenetic Investigation of Histone and DNA Modifications. *Chem Rec.* 18(12):1727-1744, 2018.
24. Ni K, Spiess AN, Schuppe HC, Steger K. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology.* 4(5):789-799, 2016.
25. Li Y, Lalancette C, Miller D, Krawetz SA. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl.* 10(4):535-541, 2008.
26. Chan PJ, Orzylowska EM, Corselli JU, Jacobson JD, Wei AK. A simple sperm DNA toroid integrity test and risk of miscarriage. *Biomed Res Int.* 2015, 2015.
27. Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch Androl.* 53(3):135-140, 2007.
28. Hamad M, Shelko N, Montenarh M, Hammadeh ME. The impact of cigarette smoking on protamines 1 and 2 transcripts in human spermatozoa. *Hum Fertil.* 22(2):104-110, 2019.
29. Jannatifar R, Parivar K, Roodbari NH, Nasr-Esfahani MH. Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol.* 17(1):1-9, 2019.
30. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health.* 32(1):1, 2014.
31. Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl.* 19(1):5-14, 2017.
32. Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev.* 84(10):1039-1052, 2017.
33. O'Flaherty C. Peroxiredoxins: Hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa. *Basic Clin Androl.* 24(1):1-10, 2014.

34. Lee D, Moawad AR, Morielli T, Fernandez MC, O'Flaherty C. Peroxiredoxins prevent oxidative stress during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod.* 23(2):106-115, 2017.
35. de Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 1784(1):106-115, 2008.
36. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 14(8):470-485, 2017.
37. Shi H, Liu J, Zhu P, et al. Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H₂O₂-induced damage to spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol.* 56(3):141-150, 2018.
38. Plante M, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril.* 62(2):387-393, 1994.
39. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Physiology and pathology. *Int J Androl.* 20(2):61-69, 1997.
40. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(8):3199-3207, 2008.
41. Agarwal A, Rana M, Qiu E, AlBunni H, Bui AD, Henkel R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia.* 50(11):1-13, 2018.
42. Redmon JB, Drobnis EZ, Sparks A, Wang C, Swan SH. Semen and reproductive hormone parameters in fertile men with and without varicocele. *Andrologia.* 51(10):1-7, 2019.
43. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: Dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl.* 13(1):43-52, 2011.
44. Luo L, Chen H, Trush MA, Show MD, Anway MD, Zirkin BR. Aging and the

- brown norway rat leydig cell antioxidant defense system. *J Androl.* 27(2):240-247, 2006.
45. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. *BJU Int.* 95(4):503-507, 2005.
 46. Maghzal GJ, Krause KH, Stocker R, Jaquet V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 53(10):1903-1918, 2012.
 47. Lamb FS, Moreland JG, Miller FJ. Electrophysiology of reactive oxygen production in signaling endosomes. *Antioxidants Redox Signal.* 11(6):1335-1347, 2009.
 48. Touyz RM, Anagnostopoulou A, Rios F, Montezano AC, Camargo LL. NOX5: Molecular biology and pathophysiology. *Exp Physiol.* 104(5):605-616, 2019.
 49. Sedeek M, Montezano AC, Hebert RL, et al. Oxidative stress, nox isoforms and complications of diabetes-potential targets for novel therapies. *J Cardiovasc Transl Res.* 5(4):509-518, 2012.
 50. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 110(10):1364-1390, 2012.
 51. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* 269(1-2):131-140, 2001.
 52. Bedard K, Jaquet V, Krause KH. NOX5: From basic biology to signaling and disease. *Free Radic Biol Med.* 52(4):725-734, 2012.
 53. Chen F, Yu Y, Haigh S, et al. Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS One.* 9(2):21-23, 2014.
 54. Chen F, Haigh S, Yu Y, et al. Nox5 stability and superoxide production is regulated by C-terminal binding of Hsp90 and CO-chaperones. *Free Radic Biol Med.* 89:793-805, 2015.

55. Bánfi B, Molnár G, Maturana A, et al. A Ca²⁺-activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes. *J Biol Chem*. 276(40):37594-37601, 2001.
56. Tirone F, Radu L, Craescu CT, Cox JA. Identification of the binding site for the regulatory calcium-binding domain in the catalytic domain of NOX5. *Biochemistry*. 49(4):761-771, 2010.
57. Wei CC, Reynolds N, Palka C, et al. Characterization of the 1 and 2 NDF-hands of NADPH oxidase 5 by fluorescence, isothermal titration calorimetry, and circular dichroism. *Chem Cent J*. 6(1):1-11, 2012.
58. Jha JC, Watson AMD, Mathew G, de Vos LC, Jandeleit-Dahm K. The emerging role of NADPH oxidase NOX5 in vascular disease. *Clin Sci*. 131(10):981-990, 2017.
59. Jagnandan D, Church JE, Bánfi B, Stuehr DJ, Marrero MB, Fulton DJR. Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5: Calcium sensitization via phosphorylation. *J Biol Chem*. 282(9):6494-6507, 2007.
60. Holterman CE, Boisvert NC, Thibodeau JF, et al. Podocyte NADPH Oxidase 5 Promotes Renal Inflammation Regulated by the Toll-Like Receptor Pathway. *Antioxidants Redox Signal*. 30(15):1817-1830, 2019.
61. Pendyala S, Natarajan V. Redox regulation of Nox proteins. *Respir Physiol Neurobiol*. 174(3):265-271, 2010.
62. Petrushanko IY, Lobachev VM, Kononikhin AS, et al. Oxidation of Ca²⁺ - Binding Domain of NADPH Oxidase 5 (NOX5): Toward Understanding the Mechanism of Inactivation of NOX5 by ROS. *PLoS One*. 11(7):1-11, 2016.
63. Ahmarani L, Avedanian L, Al-Khoury J, Perreault C, Jacques D, Bkaily G. Whole-cell and nuclear NADPH oxidases levels and distribution in human endocardial endothelial, vascular smooth muscle, and vascular endothelial cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 91(1):71-79, 2013.
64. Montezano AC, Camargo LDL, Persson P, et al. NADPH Oxidase 5 Is a pro-contractile nox isoform and a point of cross-talk for calcium and redox

- signaling-implications in vascular function. *J Am Heart Assoc.* 7(12), 2018.
65. Kiyohara T, Miyano K, Kamakura S, et al. Differential cell surface recruitment of the superoxide-producing NADPH oxidases Nox1, Nox2 and Nox5: The role of the small GTPase Sar1. *Genes to Cells.* 23(6):480-493, 2018.
 66. D □, Inés Fernández-Ulibarri □ V, Vilella M, et al. Diacylglycerol Is Required for the Formation of COPI Vesicles in the Golgi-to-ER Transport Pathway. *Mol Biol Cell.* 18(October):3250-3263, 2007.
 67. Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, et al. NOX5 in human spermatozoa: Expression, function, and regulation. *J Biol Chem.* 287(12):9376-9388, 2012.
 68. Serrander L, Jaquet V, Bedard K, et al. NOX5 is expressed at the plasma membrane and generates superoxide in response to protein kinase C activation. *Biochimie.* 89(9):1159-1167, 2007.
 69. Fulton DJR. Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal.* 11(10):2443-2452, 2009.
 70. Manea SA, Todirita A, Raicu M, Manea A. C/EBP transcription factors regulate NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *J Cell Mol Med.* 18(7):1467-1477, 2014.
 71. Wang Y, Chen F, Le B, Stepp DW, Fulton DJR. Impact of Nox5 polymorphisms on basal and stimulus-dependent ROS generation. *PLoS One.* 9(7), 2014.
 72. No Title. *Results "de Luyk N, Pozzato G, Ricci G, Tamaro P, Manno M, Tomei F, Trombetta C Pre-treatment post-treatment Fertil young male patients Affect by Hodgkin non-Hodgkin lymphoma Arch Ital Urol Androl 2012 Sep;84(3)141-5 PMID 2321040.* Published online.
 73. SILEA C, CUCU I-A, ZARNESCU O, et al. Influence of age on sperm parameters in men with suspected infertility. *Rom Biotechnol Lett.* 24(1):82-90, 2019.
 74. No Title. *High or Low Body Fat Depos Presence a Norm Oral Sugar Test is Not Assoc With Postthaw Semen Parameters Stallions.* Published online.

75. Ghani E, Keshtgar S, Habibagahi M, Ghannadi A, Kazeroni M. Expression of NOX5 in human teratozoospermia compared to normozoospermia. *Andrologia*. 45(5):351-356, 2013.
76. Hamilton TRDS, Assumpção MEODÁ. Sperm DNA fragmentation: Causes and identification. *Zygote*. Published online, 2019.
77. Rahiminia T, Hosseini A, Anvari M, Ghasemi-Esmailabad S, Talebi AR. Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 56(4):472-476, 2017.
78. Pourmasumi S, Khoradmehr A, Rahiminia T, Sabeti P, Talebi AR, Talebi AR. Original Article Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. 20(5):95-101, 2019.
79. Vatannejad A, Tavilani H, Sadeghi MR, Amanpour S, Shapourizadeh S, Doosti M. Evaluation of ROS-TAC score and DNA damage in fertile normozoospermic and infertile asthenozoospermic males. *Urol J*. 14(1):2973-2978, 2017.
80. Condorelli RA, Calogero AE, Mongioi' L, et al. Varicocele and concomitant dilation of the periprostatic venous plexus: Effects on semen viscosity sperm parameters. *J Endocrinol Invest*. 39(5):543-547, 2016.
81. Takeshima T, Kuroda S, Yumura Y. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. *React Oxyg Species Living Cells*. Published online, 2018.
82. Mishra S, Kumar R, Malhotra N, Singh N, Dada R. Mild oxidative stress is beneficial for sperm telomere length maintenance. *World J Methodol*. 6(2):163, 2016.
83. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(1):44-84, 2007.
84. Aitken RJ. Age, the environment and our reproductive future: Bonking baby

- boomers and the future of sex. *Reproduction*. 147(2), 2014.
85. Montreal EVEF, Quebec LU, Royal G, Hospital V. and on Sperm. *Society*.
Published online:368-378, 1992.
 86. Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: From the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants Redox Signal*. 14(3):367-381, 2011.
 87. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 24(5):981-990, 2012.
 88. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TIS, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril*. 89(5):1183-1190, 2008.

9.ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-772.02-E.45298
Konu : Etik Kurulu Kararı

09/09/2020

Sayın Benay DAYLAN

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 21.05.2019 tarihli ve 10840098-604.01.01-E.16100 sayılı ile onay verilen "Erkek İnfertilitesinde Reaktif Oksijen Türevlerine Bağlı Nox5 ile Peroxiredoxin Ekspresyonları ve Sperm Motilitesi ile İlişkisi" isimli çalışmanızda aşağıda verilen değişikliklerin eklenmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Değişiklik isteği:

- Projenin adı "Erkek İnfertilitesinde Reaktif Oksijen Türevlerine Bağlı Nox5 ile Peroxiredoxin Ekspresyonları ve Sperm Motilitesi ile İlişkisi" yerine "Erkek İnfertilitesinde Reaktif Oksijen Türevlerine Bağlı Nox5'in Sperm Motilitesi ile İlişkisi" olarak değiştirilmesi.
- Peroxiredoxin6 primer antikoru çalışmadan çıkarılarak yerine İmmünohistokimya boyaması ve Sperm boyaması eklenmesi.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 09.09.2020 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden A744FC00X1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44

İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.16100
Konu : Etik Kurulu Kararı

21/05/2019

Sayın Benay DAYLAN

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Erkek İnfertilitesinde Reaktif Oksijen Türevlerine Bağlı Nox5 İle Peroxiredoxin6 Ekspresyonları Ve Sperm Motilitesi İle İlişkisi" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 21.05.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Eyağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 78911C38XF kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinçiler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

| | | | | | |
|--------------------------|---|--|--|---|--|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Erkek İnfertilitesinde Reaktif Oksijen Türevlerine Bağlı Nox5 İle Peroxiredoxin6 Ekspresyonları Ve Sperm Motilitesi İle İlişkisi | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/AD/SOYADI | Benay DAYLAN | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI | Histoloji ve Embriyoloji ABD/Yüksek Lisans Öğrencisi | | | |
| | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | İstanbul | | | |
| | DESTEKLEYİCİ | - | | | |
| | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> | ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/> | ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> | ULUSLARARASI <input type="checkbox"/> |

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

| Değerlendirilen Belgeler | Belge Adı | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili |
|-------------------------------------|---|--------------------------|---|--|
| | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI | | | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> |
| BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | | | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> | |
| Karar Bilgileri | Karar No: 411 | Tarih: 17/05/2019 | | |
| | Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası il belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştır etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir. | | | |

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

| Unvanı/Adı/Soyadı | Uzmanlık Alanı | Kurumu | Cinsiyet | | Araştırma ile İlişki | | Katılım * | |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK | Eczacılık | İstanbul Medipol Üniversitesi | E <input checked="" type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> |
| Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK | Farmakoloji | İstanbul Medipol Üniversitesi | E <input checked="" type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> |
| Doç. Dr. İlknur KESKİN | Histoloji ve Embriyoloji | İstanbul Medipol Üniversitesi | E <input type="checkbox"/> | K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> |
| Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI | Fizyoterapi ve Rehabilitasyon | İstanbul Medipol Üniversitesi | E <input checked="" type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |
| Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN | Psiko-onkoloji | İstanbul Medipol Üniversitesi | E <input type="checkbox"/> | K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> |
| Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet UÇIŞIK | Biyoteknoloji | İstanbul Medipol Üniversitesi | E <input checked="" type="checkbox"/> | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |
| Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY | Endodonti | İstanbul Medipol Üniversitesi | E <input type="checkbox"/> | K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> | H <input type="checkbox"/> |

* :Toplantıda Bulunma