



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İLERİ BABA YAŞININ SPERM PARAMETRELERİ, OKSİDATİF
STRES, DNA FRAGMENTASYONU, KROMATİN YAPI VE
mTOR EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

CAN ATAMBAY

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi SEDA KARABULUT

İSTANBUL – 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi: Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Tez Sahibi : Can ATAMBAY
Tez Başlığı : İleri Baba Yaşının Sperm Parametreleri, Oksidatif Stres, DNA
Fragmantasyonu, Kromatin Yapı ve mTOR Ekspresyonuna
Etkilerinin İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 25.07.2022

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

Danışman

Kurumu

İmza

Dr.Öğr.Üyesi Seda KARABULUT

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Doç.Dr. İlknur KESKİN

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç.Dr. Zeynep Birsu ÇİNÇİN

Nişantaşı Üniversitesi

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. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi 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.

Can ATAMBAY

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde, bana desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Seda Karabulut'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecimde destek ve katkılarıyla bu çalışmayı mümkün kılan anabilim dalı başkanımız sayın Doç. Dr. İlknur Keskin'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Desteklerinden ötürü Emb. Pelin Kutlu'ya teşekkür ederim.

Desteklerinden ötürü değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Bircan Kolbaşı'na teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerinden ötürü değerli arkadaşlarım, Arife Ahsen Kaplan, Ceren Erdem Altun, Berna Yıldırım, Talat Yasin Acar, Selva Ően, Őeyda dürmeli, Melek Usta'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tüm destekleri için değerli babam Hüseyin Atambay'a teşekkürlerimi sunarım.

Can ATAMBAY

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. İnfertilite	7
4.2. Yaşlanma	8
4.2.1. Yaşlanmanın erkek üreme sistemi üzerine etkileri.....	8
4.3. Oksidatif Stres	14
4.4. DNA ve Kromatin Hasarı	20
4.5. Hücre İçi Sinyal Yolakları.....	27
4.5.1. mTOR Yolağı	30
5. MATERYAL VE METOD.....	41
5.1. Çalışma Dizaynı	41
5.2. Spermiogram	41
5.3. Sperm Kromatin Yapısının Gösterilmesi	42
5.3.1. Solüsyon Hazırlığı	43
5.4. Oksidatif Stres Analizi	44
5.5. İmmünohistokimya Analizi	45
5.5.1. Kimyasal hazırlığı	47
5.6. DNA Fragmantasyon Analizi.....	48
5.7. İstatistiksel Analiz	49
6. BULGULAR	51

6.1. Demografik Bilgiler	51
6.2. Sperm Parametreleri	51
6.3. Kromatin Yapısı Analizi	57
6.4. DNA Fragmantasyonu Oranı.....	61
6.5. Oksidatif Stres Parametreleri:	66
6.6. mTOR Yolağı Parametreleri:	68
7. TARTIŞMA	73
8. SONUÇ.....	79
9. KAYNAKLAR	80
10. ETİK KURUL ONAYI.....	97
11. ÖZGEÇMİŞ.....	100

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABP: Androjen bağlayıcı protein

BKİ: Beden kitle indeksi

BPH: İyi huylu prostat hiperplazisi

DAB: Diaminobenzidin

DEPTOR: DEP alanı içeren mTOR etkileşimli protein

DNA: Deoksiribo nükleik asit

ERK1: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2

FoxO1: Kutu proteini O1

FSH: Folikül uyarıcı hormon

G6PD: Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz

GDNF: Glial hücre türevli nötrofik faktör

GH: Germ hüceleri

GPx: Glutasyon peroksidaz

GR: Glutasyon redüktaz

GSK3: Glikojen sentaz kinaz 3

H₂O₂: Hidrojen peroksit

IRS1: İnsülin reseptörü substratı 1

JAK/STAT: Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü

KTB: Kan testis bariyeri

LH: Leydig hücreleri

MDA: Melenoaldehit

mLST8: Memeli öldürücü Sec13 protein 8

mSIN1: Moleküler stres ile aktive olan protein kinaz etkileşimli protein

mTOR: Rapamisin memeli hedefi

mTORC1: mTOR kompleksi 1

mTORC2: mTOR kompleksi 2

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz

NO: Azot oksit

O₂⁻: Süperoksit radikali

O₂: Oksijen

OS: Oksidatif stres

OTUB1: OTU alanı içeren Ubikuitin aldehit bağlayıcı protein 1

OTUD7B: OTU deubiquitinaz 7B

PA: Fosfatidik asit

PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu

PDK1: Fosfoinositide bağımlı kinaz 1

PI3K: 3 Fosfoinositid 3-kinaz

PKB: Protein kinaz B

PKCa: Protein kinaz Ca

PLD1: Fosfolipaz D1

PPP1: fosfoprotein fosfataz 1

PRAS40: Prolince zengin 40 kDa AKT substrat

PROTOR-1: Rictor-1 ile olduğu belirlenen protein

PS: Fosfatidilserin

PTH: Peritübüler miyoid hücreler

PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

PZ: Plazma zarı

RAPTOR: mTOR'u düzenleme ile ilgili protein

RİCTOR: mTOR'un rapamisine etkileşimi olmayan parçası

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif Oksijen Türevleri

ROT: Reaktif oksijen türleri

RSK1: Ribozomal S6 kinaz 1

SGK1: Protein kinaz 1

SH: Sertoli hücreleri

SKH: Spermatogonial kök hücrelerin

SKYD: Sperm kromatin yapı deneyi

SOD: Süperoksit dismutaz

ST: Seminifer tübül

T: Testosteron

TRAF2: TNF Reseptörü ile ilişkili faktör 2

UPD: Eşleştirilmemiş ligand



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 6.2.1: Olguların semen parametreleri ortalama ve standart sapma değerleri..	52
Tablo 6.3.1: Olguların kromatin hasarı ortalama ve standart sapma değerleri.....	60
Tablo 6.4.1: Olguların DNA fragmentasyonu ortalama ve standart sapma değerleri	62
Tablo 6.5.1: Oksidatif stress parametreleri ortalama ve standart sapma değerleri.....	67
Tablo 6.6.1: Olguların mTOR proteini ekspresyonlarının ortalama ve standart sapma değerleri.....	69



RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.3.1: Toluidin blue basamakları.....	43
Resim 5.4.1: Oksidatif stres ölçüm kitleri.....	45
Resim 5.5.1: İmmünohistokimyasal analiz basamakları.....	47
Resim 6.3.1: İnsan sperm hücrelerindeki kromatin yapı analizi örneği: Ok işareti kromatin yapısı sağlam spermilerin baş kısmındaki açık mavi boyanmayı göstermek tedir. Ok başı kromatin hasarı olan spermilerin baş kısmındaki koyu mavi boyanmayı göstermektedir.....	57
Resim 6.3.2: Toluidin Mavisi boyama tekniği ile açık mavi renge boyanan TB (-) sperm hücresi (ışık mikroskopik görüntü X100)	58
Resim 6.3.3: Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100	59
Resim 6.4.1: Olgularda sperm Chromatine Structure Assay yöntemi ile DNA fragmentasyonunun gösterilmesi: Ok normal halo yapısına sahip sperm başını, ok başı halo yapısı gözlenmeyen DNA fragmentasyonu hasarlı spermi göstermek tedir.....	63
Resim 6.4.2: Olguların DNA fragmentasyonunu analizi örneği: Ok normal halo yapısına sahip sperm başını, ok başı halo yapısı gözlenmeyen DNA fragmentasyonu hasarlı spermi göstermektedir.....	64
Resim 6.4.3: FITCH ile boyanan sperm erken apoptozu göstermektedir. LSM800 konfokal mikroskopta 20X’te çekilmiştir.....	64
Resim 6.4.4: FITCH ile PI birlikte gözlenmiş ileri evre apoptoz örneği LSM800 konfokal mikroskop 20X’te çekilmiştir.....	65
Resim 6.6.1: Olguların mTOR ekspresyonu analizi örnekleri.....	70
Resim 6.6.2: mTOR proteinin immünohistokimyasal analizi oklar baş ve boyun bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir.....	71
Resim 6.6.3: mTOR proteinin immünohistokimyasal analizi, kuyruk ve boyun bölgesinin gösterimi.....	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.3.1: ROT'un sperme fizyolojik ve patolojik etkisi.....	18
Şekil 4.4.1: Kromatin paketlenmesi.....	22
Şekil 4.4.2: Fosfatidilserinin eksternalizasyonu ve apoptoz	24
Şekil 4.5.1: Çeşitli ligandlar tarafından aktive edilen ve SKH'lerin farklılaşmasını düzenleyen önemli sinyal yolları.....	29
Şekil 4.5.2: Epididimide sperm motilitesi edinimi için gerekli sinyal olaylarının şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.5.1.1: mTORC1 ve mTORC2 kompleksleri.....	33
Şekil 4.5.1.2: MLST8 ubiquitinasyonun moleküler mekanizması.....	34
Şekil 4.5.1.3: mTORC1 ve mTORC2'nin düzenlediği önemli mekanizmalar.....	40
Şekil 6.2.1: Olguların semen hacmi değerleri grafiği.....	53
Şekil 6.2.2: Olguların sperm konsantrasyonu değerleri grafiği.....	53
Şekil 6.2.3: Olguların toplam sperm sayısı değerleri grafiği.....	54
Şekil 6.2.4: Olguların toplam ileri hareketli sperm oranı değerleri grafiği	54
Şekil 6.2.5: Olguların toplam yerinde hareketli sperm oranı değerleri grafiği.....	55
Şekil 6.2.6: Olguların toplam hareketsiz sperm oranı değerleri grafiği	55
Şekil 6.2.7: Olguların toplam motilite oranı değerleri grafiği	56
Şekil 6.2.8: Olguların normal morfolojiye sahip sperm oranı değerleri grafiği	56
Şekil 6.3.1: Olguların kromatin hasarı oranı grafiği.....	61
Şekil 6.4.1: Olguların DNA fragmantasyonu grafiği	62
Şekil 6.5.1: Olguların oksidatif stres indexi grafiği.....	67
Şekil 6.6.1: Olguların mTOR protein ekspresyonu değerleri grafiği	69

1.ÖZET

İLERİ BABA YAŞININ SPERM PARAMETRELERİ, OKSİDATİF STRES, DNA FRAGMENTASYONU, KROMATİN YAPI VE mTOR EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Çocuk sahibi olmanın getireceği maddi yükümlülükler nedeniyle günümüzde çoğu birey aile kurma ve çocuk sahibi olma planlarını daha ileri yaşa ertelemektedir. Bu çalışmada ileri baba yaşının sperm kalitesine ve fertiliteye olası etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada 40 yaş ve üzeri (n=20), 40 yaş altı (n=20) olmak üzere sağlıklı bireylerden alınan toplam 40 adet semen örneği incelenmiştir. Alınan örneklerde gruplar arasında semen parametreleri, kromatin yapı bütünlüğü, DNA fragmentasyonu, oksidatif stres indeksi ve mTOR protein ekspresyonu seviyeleri karşılaştırılmıştır. İleri baba yaşındaki bireylerde toplam motilite ve ileri hareketli sperm oranları istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük, kromatin hasarı ve DNA fragmentasyonunun ise istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı ve hareketsiz sperm oranları, oksidatif stres indeksi ve mTOR proteini ekspresyonu değerleri ise ileri baba yaşındaki bireylerde daha yüksek olmasına rağmen, bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde bulunmamıştır. Araştırmanın sonucunda ileri baba yaşının DNA hasarına neden olduğu ve kromatin bütünlüğüne zarar verdiği ancak oksidatif stres ve mTOR sinyal yolağında anlamlı bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Baba yaşı, DNA fragmentasyonu , mTOR sinyal yolağı, oksidatif stres, sperm parametreleri.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ADVANCED PATERNAL AGE ON SPERM PARAMETERS, OXIDATIVE STRESS, DNA FRAGMENTATION, CHROMATIN STRUCTURE AND MTOR EXPRESSION

Due to the responsibilities of having children, many people postpone their plans to start a family and have children later in their lives. In this study, it is aimed to reveal the possible effects of advanced paternal age on sperm quality and fertility. A total of 40 semen samples from healthy individuals aged 40 years and older (n=20) and younger than 40 years (n=20) were analyzed in the study. Semen parameters, chromatin structure integrity and DNA fragmentation, oxidative stress index, mTOR protein expression levels were compared between two groups. Total motility and progressive motile sperm rates were statistically significantly lower in individuals of advanced paternal age, while the rate of chromatin damage was statistically significantly higher. Also DNA fragmentation rates were higher in individuals of advanced paternal age. Sperm concentration, total sperm count and immobile sperm ratio, oxidative stress index and mTOR protein expression values were higher in individuals with advanced paternal age, but these differences were not statistically significant. As a result of the research, advanced paternal age damages DNA and chromatin integrity, but does not affect oxidative stress and mTOR signaling pathway.

Keywords: DNA fragmentation, mTOR signal pathway, paternal age, oxidative stress, sperm parameters.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, 1 yıllık korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamama durumu olarak tanımlamakta olup, çiftlerin yaklaşık %15'ini etkilemektedir (1). İnfertilite sorunu kadın, erkek veya her iki partner kaynaklı nedenlerden ortaya çıkabilmektedir. Bu çiftlerde infertilite yaklaşık %50 oranında erkek partnerden kaynaklı problemlerden ortaya çıktığından çiftlerin değerlendirilmesinde erkek partnere öncelik verilmiştir. Erkeklerde infertilite prevalansı yaklaşık %7 olarak bildirilmiştir. Erkek infertilitesi, testislerde spermatozoanın tamamen yokluğundan sperm kalitesinde belirgin değişikliklere kadar oldukça farklı spektrumda, heterojen fenotipik durumlar şeklinde görülmektedir (2).

Erkek infertilitesinin sebepleri arasında spermatogenik kantitatif kusurlar, varikosel, duktal tıkanma veya işlev bozuklukları, hormonal veya hipotalamik-hipofiz aks problemleri sayılmaktadır. Bunların yanında mesleki faaliyetler, artan obezite oranları, hareketsiz yaşam tarzı ve üreme çağındaki erkeklerin alkol ve nikotin tüketimi, stres, fazla kafein, çeşitli gıda katkı maddeleri ve ileri yaş gibi birçok faktör de etken olabilmektedir (3).

Çocuk sahibi olmak pek çok kişi için sevinç ve ayrıcalık olmakla birlikte pek çok zorluk ve maddi yükümlülük getirmektedir. Özellikle çocuk sahibi olmanın getireceği maddi yükümlülükler nedeniyle günümüzde çoğu birey aile kurma ve çocuk sahibi olma planlarını daha ileri yaşa ertelemektedir (4).

Literatürde bazı araştırmacılar erkeklerde yaşın ilerlemesi ile birlikte spermelerin konsantrasyon, canlılık ve hareketliliklerinde azalma, yapı ve morfolojisinde bozulmaların yanı sıra genetik materyalde hasar oluşabileceğini bildirmiştir. Yapılan çalışmalar özellikle 34 yaşından sonra temel seminal parametrelerin azalmaya başladığını göstermiştir (5).

İleri yaş, seminal sıvı, sperm miktar ve morfolojik yapısının yanı sıra sperm moleküler yapısı üzerinde de çeşitli değişikliklere neden olabilmektedir. Spermde moleküler mekanizmaları düzenleyen, sperme hareketlilik, hiperaktivasyon, kapasitasyon, morfoloji, dölleme kabiliyeti gibi birçok işlevin yerine getirilmesini

sağlayan çeşitli sinyal yolları tanımlanmıştır. Spermin oositi başarılı bir şekilde döllenmesinde rolü olan başlıca sinyal yolları arasında sperm başı şekillenmesinin ve kontrasepsiyonunun temel bir düzenleyicisi olan HIPK4 (homeo domaininteracting protein kinaz 4), gen transkripsiyonunu ve protein sentezini düzenlemekten sorumlu mTOR (rapamisin memeli hedefi), motilite, kapasite, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonunu düzenleyen AC (adenil siklaz)-cAMP (siklik adenozin monofosfat), pozitif yüklü kalsiyum iyonlarının sperm hücrelerine girişini kontrol ederek sperm hiperaktivasyonu ve fertilizasyonunda görev alan spermin katyon kanalı (CatSper) ve Zn^{2+} 'in G proteinine bağlı reseptör (GPCR'ler) ile etkileşimi sonucu flagella hareketinin oluşumuna etki eden yollar örnek olarak gösterilmiştir (6-8).

İleri yaşlı erkeklerde gözlenen seminal parametrelerdeki bozulmaların arka planında bu sinyal yollarının mekanizmalarında değişimlerin etken olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle ileri baba yaşının fertilité üzerine etkisini bu sinyal yolları üzerinden inceleyen yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (9).

mTOR (rapamisin memeli hedefi), protein sentezi, hücre içi biyokütle birikimi, hücre aktin iskelet yapısının düzenlenmesi, enerji üretimi gibi birçok biyolojik süreci düzenlemektedir. Merkezi sinyal düzenleyici rolü sebebi ile birçok farklı sinyal yolağı ile etkileşime girmektedir. TOR molekölü çeşitli proteinlerden, iki farklı yapısal ve fonksiyonel kompleksten oluşmaktadır ve yaklaşık 290 kDa ağırlığındadır. Bu iki kompleks mTORC1 (mTOR kompleks 1) ve mTORC2 (mTOR kompleks 2) olarak bilinmektedir. Her iki kompleksin farklı TOR inhibitörlerine karşı duyarlılıkları olduğu kanıtlanmış ve farklı çevresel etkilerle, farklı hücrel olayları düzenlemektedir. Ancak sinyal yolağının düzgün çalışması için aralarında bağlantı bulunmaktadır (10-13).

Normal gelişim ve büyüme için mTOR proteini gerekmektedir. Farelerde yapılan deneylerde, homozigot mTOR^{-/-} embriyolarında, implantasyondan kısa bir süre sonra, aminoasit sentezinde meydana gelen problemler nedeniyle ölümlerin gerçekleştiğı gözlenmiştir (14-16). Mevcut araştırmalar, mTOR'un, amino asit sentezi, glikoz metabolizması, hücre iskeleti organizasyonu ve diğér birçok işlev gibi çeşitli süreçleri kontrol ederek hücrel homeostaz ve metabolizmanın çok önemli bir

düzenleyicisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu sebeplerden ötürü spermatogenez için çok önemlidir ve erkeklerde kısırlığa etki eden önemli faktörlerden olmaktadır (17, 18).

Reaktif oksijen türleri (ROS) biyolojik sistemler tarafından metabolik yan ürünleri olarak üretilen süperoksit radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH) ve singlet oksijen (O_2) gibi moleküller olmuştur (19). Protein fosforilasyonu, çeşitli transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu, apoptoz, bağışıklık ve farklılaşma gibi süreçlerin tümünün dengesi hücrede uygun seviyede ROS bulunmasına bağlı olmaktadır. Ancak ROS üretiminin aşırı artışı proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi önemli hücresel yapılar üzerinde zararlı etkiler gösterebilmektedir. Bu durum oksidatif stres (OS) olarak tanımlanmaktadır. Çok sayıda kanıt, oksidatif stresin çeşitli hastalıkların (yani kanser, diyabet, metabolik bozukluklar, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklar) başlangıcından ve/veya ilerlemesinden farklı derecelerde sorumlu olabileceğini göstermektedir (20).

Yaşlanma oksidatif strese artış ile ilişkilidir. Erkek yaşlanması, sperm parametreleri, üreme hormonu seviyeleri, testis işlevi, kromozomal yapı ve sperm DNA bütünlüğü ile negatif olarak ilişkilidir ve bunların tümü infertiliteye ve yavru üzerinde zararlı etkilere neden olabilmektedir. Oksidatif stresten kaynaklanan hasar, yaşlanan erkeklerde spermin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünü bozan ana faktörlerden biri olarak kabul edildiğinden, bu faktörlerin yaşlı erkeklerde spermelere etkisinin incelenmesi önem kazanmaktadır (21).

Sperm hücresinin gelişimi sırasında uğradığı yapısal değişiklikler sonucunda genetik özellikleri muhafaza eden DNA son derece kompakt bir yapı haline gelmiştir. Ancak bu olgunlaşma sürecinde meydana gelebilecek olumsuzluklar DNA yapısında kırıklara neden olabilmektedir. DNA yapısında oluşan bu hasarlara DNA fragmentasyonu adı verilmektedir. Literatürde DNA fragmentasyonu ile anormal semen parametreleri arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (22, 23). Ayrıca DNA yapısındaki bozulmalar gelecek nesillere aktarılacak genin kalitesini olumsuz etkileyebileceğinden genetik hastalıkların oluşumunu arttırabilmektedir (24).

Bu çalışmada ileri baba yaşının infertilite ile ilişkili olduğunu ortaya koymak için semen parametrelerindeki değişimler, sperm moleküler mekanizmalarından mTOR sinyal yolağı, DNA fragmantasyonu, oksidatif stres ve kromatin bütünlüğü seviyelerinin baba yaşı ile etkileşiminin incelenmesi amaçlanmaktadır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfertilite

İnfertilite bir yıl korunmasız cinsel ilişki sonucunda halen çocuk sahibi olamamak olarak tanımlanmaktadır (25). İnfertilite insidansı %15 olup, infertilitenin altta yatan nedeni %50 oranında erkek partnerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle bu çiftlerin değerlendirilmesinde öncelikli olarak erkek partnerin değerlendirilmesi önerilmektedir (26).

Erkek infertilitesi nedenleri arasında varikosel, kardiyovasküler hastalıklar, kanserler, kronik veya otoimmün rahatsızlıklar sayılmaktadır. Medikal sebepler dışında beden kitle indeksi (BKİ) artışı, psikolojik stres, alkol ve sigara kullanımı gibi yaşam şekli ile ilişkili faktörlerin de erkeklerde fertilitiyi etkileyebileceği bildirilmiştir (27).

Ayrıca fertilitenin sağlık durumu ile ilişkili olduğu da belirtilmektedir. İnfertil kişilerde komorbidite oranlarının yüksek olduğu, testis hacminin daha az, folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyelerinin ise yüksek olduğu saptanmıştır (28). Buna karşın sağlıklı yaşam biçimine sahip kişilerde ise androjen hormon seviyesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (29). Son olarak kronik hastalıklar ile infertilite arasındaki ilişkiden dolayı bazı araştırmacılar infertilite ile mortalite arasında ilişki bulunduğunu, semen kalitesinin ve erkek üreme sistemi genel sağlığının komorbidite ve mortalite için biyobelirteçler olabileceğini öne sürmektedir (27).

Yaşla birlikte cinsel aktivitede azalma meydana gelmesi de fertilitiyi etkileyebilmektedir (30). Kadın doğurganlığı menopozun etkisiyle doğal bir sınıra ulaşmaktadır. Erkeklerde ise durum biraz daha farklıdır, üreme sisteminde yaşa bağlı bazı değişiklikler meydana gelmekle birlikte, fertilitenin yaşam boyu sürdürülebileceği varsayılmaktadır. Buna karşın, erkeklerde ilerleyen yaş ile bağlantılı olarak, hormonlarının seviyesi, cinsel işlev, semen parametreleri, fertilitite oranlarında azalmalar ve yavrularda bazı doğum kusurları ve hastalıkların görülme sıklığında artış bildirilmektedir (31).

4.2. Yaşlanma

Yaşlanma, zamana bağlı olarak hücresel ve fizyolojik fonksiyonlarda azalma olarak tanımlanmaktadır. Yaşlanmanın ayırt edici özellikleri arasında kan basıncı, hareketlilikte ve solunum kapasitesinde azalama gibi değişiklikler sayılmaktadır. Yaşlanma sürecini ve nedenlerini anlamak için telomer teorisi, immünolojik teori ve serbest radikal teorisi gibi farklı teoriler öne sürülmüştür (32). Sonuç olarak yaşlanma, çeşitli içsel ve dışsal faktörlerle karakterize edilen çok faktörlü bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır.

4.2.1. Yaşlanmanın erkek üreme sistemi üzerine etkileri

İlerleyen yaşla birlikte erkeklerde fertilitiyi etkileyebilecek faktörlerden birisi testis dokusunda ortaya çıkabilecek değişikliklerdir. Erişkin bir insan testisinin ortalama hacmi 30 mL'dir ve parankimi tunika albugineadan kaynaklanan bölmelerle 200-300 lobüle bölünmüştür. Bu lobüllerin her biri, 70-80 cm uzunluğunda olup, testis başına toplamda 250 metre uzunluğuna ulaşır. Her bir lobül içerisinde bir ila üç adet seminifer tübül (ST) bulunmaktadır (33).

Spermatogenez ST'lerde meydana gelen olgun erkek gamet oluşumu ile sonuçlanan karmaşık bir süreç olarak tanımlanmıştır. Spermatogenez, spermatogoniyaların farklılaşması, spermatogoniyaların spermatozoidlere farklılaşması, spermatozoidlerden mayoz bölünme sonucu spermatidlerin oluşması, yuvarlak görümlü spermatidlerin olgunlaşarak sperm halini alması ve testis tübülünden lümenine salınması olmak üzere çeşitli aşamalardan meydana gelmektedir (33).

ST'lerin bazal membranında sertoli hücreleri (SH) ve farklı olgunlaşma aşamalarındaki germ hücreleri (GH) bulunmaktadır. Peritübüler miyoid hücrelerin (PTH'ler) oluşturduğu peritübüler bir doku ST'yi çevrelemektedir. Bu doku miyoid hücre katmanları, fibrosit benzeri adventisyal hücreleri ve kollajen matrisinden oluşmaktadır. SH'ler ile birlikte bu peritübüler doku kan testis bariyerini (KTB) oluşturmaktadır. PTH'ler ayrıca SH'lerinin işlevlerinin parakrin düzenlenmesinde de yer almaktadır. PTH'den salgılan PModS (peritübüler, sertoli'yi değiştiren) sayesinde SH'lerinde hücre içi sinyal yolları uyarılır ve SH'ler tarafından transferrin, inhibin ve androjen bağlayıcı proteinin salgılanması kontrol edilmektedir (34).

SH'leri spermatogenez için çok önemli bir yönetici olmuştur. Şekilleri düzensiz ve çekirdekleri belirgin ve koyu renkli olmaktadır. ST'lerin membranında dağınık vaziyette bulunurlar ve yetişkin bir erkekte ST epitelinin %17-20'sini kaplamaktadırlar (35). Morfolojileri hücreden hücreye değişiklik göstermektedir. SH'lerinde GH'lerinin spermatogenez sırasında tübül lümenine doğru göçlerine yardımcı olan ağaç dallarına benzeyen geniş sitoplazmik dallanmalar bulunmaktadır. Tek bir SH, farklı gelişme aşamalarında 30-50 GH'sini destekleyebilmektedir (36). SH'leri birçok salgı ürününün salgılanmasından da sorumlu olmaktadır. Bunlar içerisinde testis gelişimini destekleyen anti-müller hormon, spermatogenez ve sperm olgunlaşmasını kontrol eden androjen bağlayıcı protein (ABP), FSH üretimini ve salgılanmasını düzenleyen inhibinin salgılanmasından sorumlu olmaktadır (37). Ayrıca makrofajlar gibi davranarak fagositoz yoluyla herhangi bir dejenere GH'yi veya spermatidlerden kalan cisimleri temizlemektedirler. Bu kritik bir işlemdir, çünkü GH'lerinin önemli bir kısmı spermatogenez sırasında atılır ve bu ölü hücrelerin ST lümeninde bulunması, sperm üretimini olumsuz etkileyen zararlı içeriklerin salınmasına neden olabilmektedir (38).

Testislerde yer alan sperm gelişimine destek olan bir diğer hücre tipi leydig hücreleridir (LH). LH'leri, genellikle kan damarları ve ST'lerin arasında kümeler halinde bulunmaktadır. Şekil olarak poligonaldirler ve erkeklerde birincil testosteron(T) kaynağı olarak görev almaktadırlar. Leydig hücreleri cinsiyet belirleyici gen sinyal olan SRY'yi aktive ederek gebeliğin 8-18. haftaları arasında erkek cinsiyet faktörünün oluşmasını sağlamaktadır (39).

Tüm bu destek hücrelerinin etkisi ile GH'leri olgunlaşarak gelişmeye başlamaktadır. GH'ler olgunlaşma sırasına göre bazal membrandan lümenine doğru; koyu tip A spermatogonia, koyu tip B spermatogonia, tip B spermatogonia, primer ve sekonder spermatosit ve spermatidler olarak isimlendirilmektedir. GH'leri sperme farklılaşarak genetik ve epigenetik bilgileri nesiller boyu aktarmaktadır. GH'leri insanlarda mayoz bölünme yapabilen tek hücre tipi olarak tanımlanmıştır. GH'leri, bazal membranda ST'ler içinde yer almaktadırlar. Bazal membrandan olgunlaştıkça lümenine doğru ilerleyip farklılaşarak sperm hücrelerini oluşturmaktadırlar. Sperm hücrelerinin sinyal yollarında ve gelişiminde destekleyici hücreler çok önemli

olmaktadır. Bu hücreler spermin gelişip farklılaşmasında ve erkek genital kanalı boyunca ilerlemesinde görev almaktadır. Dolayısıyla ilerleyen yaşla birlikte testis yapısı, fonksiyonelliği ve destek hücrelerinin yapısında meydana gelen değişikliklerin sperm kalitesini etkilemesi muhtemel olmaktadır. İnsan spermatogenik döngüsü yaklaşık 72 gün sürdüğünden, yaşlanma germ hücrelerinin farklılaşma sürecini muhtemelen etkilememektedir. Ancak uzun ömürlü SH'lerinin ve spermatogonyal kök hücre popülasyonunun yaşlanma sürecinden olumsuz etkilenmesi muhtemel olmaktadır (40). İlerleyen yaşla birlikte testis morfolojisinde tübüler membranın fibrozu ve divertikül oluşumu; A tipi spermatogonia sayısında azalma ve spermatid sayısında artış gibi değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Yaşlı bireylerde SH'lerinin lipit içeriğinde artış olduğu ve vakuolik dejenerasyonlar ortaya çıktığı gözlenmiştir (41).

David ve ark. 1056 kişinin otopsi raporları ve testis morfolojisi arasındaki ilişkiyi değerlendirmiş, ilerleyen yaşla birlikte vücut ağırlığının azalması ve bazı hastalıkların testis atrofisi ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Ayrıca bu çalışmada herhangi bir hastalığı olmayan bireylerde de (kilo kaybı ve hastalıklar dışlandığında) 70 yaşından sonra testis hacminde anlamlı azalma olduğunu bildirmiştir (29). Mahmoud ve ark. 75 yaş üzerindeki erkeklerde testis hacminin 18-40 yaş arasındaki erkeklere göre %31 oranında azaldığını bildirmiş, bu durumun serum gonadotropin seviyelerinde yükselme ve testosteron seviyesinde artışla ilişkili olduğunu saptanmıştır (42).

Semen içeriğine katkıda bulunan seminal vesikül, epididimis ve prostat bezindeki değişiklikler de semen yapısı ve özelliklerini etkileyebilmektedir. Seminal vesikül ve/veya prostat atrofisi, bu bezlerin salgılarındaki su ve protein gibi moleküllerin azalması, semen hacmi ve kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir (43).

Prostat bezi fertilité için hayati derecede önemli olan semendeki spermleri besleyen ve koruyan çeşitli salgılar üretmektedir. Salgı bezi olması nedeniyle hipotalamik-hipofiz-testis aksının hedef organlarından biridir ve fonksiyonu akstaki değişimlerden etkilenebilmektedir (44). İyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) ve prostat kanseri erkeklerde yaşın ilerlemesi ile ortaya çıkan en yaygın rahatsızlıklardan olduğu tanımlanmıştır. Ancak insanlarda bu prostat

anormalliklerinin neden olduğu enflamasyonun, sperm ve seminal plazma bileşenlerinde immünolojik infertiliteye neden olabilecek bir etki oluşturmadığı gözlenmiştir (45).

Epididimis sperm olgunlaşması ve hareketlilik kazanmasında rol oynamaktadır. Sperm epididimis kanalları boyunca seyri sırasında epididimis epitel hücreleri tarafından salgılanan sıvının etkisiyle değişime uğramaktadır. Epididimisin işlevi androjenlerin varlığına büyük ölçüde bağımlı olmaktadır (46). Sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada yaşlanma ile birlikte epididimis epiteli ve bazal membranında histopatolojik değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yaşlı sıçanlarda spermatogenezin aktif olmasına rağmen epididimisin kauda kısmında sperm motiltesi ile ilgili parametrelerin azaldığı gözlenmiştir (47). Bu durumun, ilerleyen yaşla birlikte epididimide oluşan dejenerasyondan mı kaynaklandığı yoksa testis içindeki gelişimi sırasında meydana gelen değişikliklerden mi kaynaklandığı henüz çözülememiştir (46).

Kadınlardaki menopoza benzer şekilde, erkeklerdeki gonadotropin ve androjen hormonlarının seviyesindeki dalgalanmalar testiküler disfonksiyon veya yetersiz spermiyogenezle ilişkili olabilmektedir (44). Gray ve ark. 39-70 yaş arasındaki erkeklerin hormon seviyelerini incelemiş, serbest testosteron seviyesinin yılda %1.2, albümine bağlı testosteron seviyesinin yılda %1.0 oranında azaldığını bildirmiştir (48). Bir başka çalışmada hem serbest hem de albümine bağlı testosteron seviyesinde yılda %2 oranında azalma, hipofizal gonadotropin hormonlarının seviyesinde (FSH ve lüteinleştirici hormon) yaşla birlikte artış gösterilmiştir. Toplam testosteron seviyesinin de 40 yaşından sonra azaldığı bildirilmektedir (49). Neaves ve ark. 40 yaş altı ve 50 yaş üstü erkeklerin testis otopsi örnekleri karşılaştırıldığında yaşlı erkeklerde %44 oranında Leydig hücre sayısında azalma gözlemlenmiştir. Bu çalışmada erkeklerde testis yapısı ve işlevindeki değişimlerin altında yatan en önemli faktörün yaşlanma olduğu ileri sürülmüştür (50). İlerleyen yaş ile birlikte testosteron seviyesinde görülen azalma spermatogenezini olumsuz etkilerken, prostat kanseri riskini azaltmaktadır (51).

Testosteron seviyesindeki azalmanın testis hücrelerinin sayı ve fonksiyonunda azalmanın yanı sıra hipotalamus-hipofiz ilişkisi duyarsızlığı, reseptör

sayısında azalma gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (49). Serum testosteron seviyesinin azalması hipotalamik-hipofiz aksını FSH ve LH salınımını artırma yönünde uyarılmaktadır. Artan FSH seviyesinin sertoli hücrelerinde azalmaya yol açarak testis atrofisine neden olduğu düşünülmektedir (52). Johnson ve ark. genç ve yaşlı bireylerin testis dokusunu incelediği çalışmasında iki grup arasında spermiyogenez sırasında önemli bir dejenerasyon gözlemlenmezken, mayozun profaz sonrası aşamalarında, yaşlı erkeklerde daha fazla germ hücre dejenerasyonu saptanmıştır. Bu durumun günlük sperm üretimi ile negatif korelasyon gösterdiğini, artan serum FSH konsantrasyonları ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (52).

Erkeklerde ileri yaşlarda görülen ve libidoda azalmaya yol açan andropoz sonucunda da hipotalamik-hipofiz-testis ilişkisindeki bozulmaya bağlı olarak spermatogenez ve sperm motilitesinde azalma gözlenmektedir (53). Yaşlı erkeklerde cinsel işlev bozukluğu genellikle “normal yaşlanmanın” kaçınılmaz bir sonucu olarak kabul edilecek derecede yaygınlaşmıştır. Erkeklerde ileri yaş, erektil disfonksiyon için major belirleyici faktör olarak bildirilmiştir. İtalyan toplumunda yapılan bir çalışmada erektil disfonksiyon görülme sıklığının 25 yaşın altındaki erkeklerde %4,6'iken 74 yaşın üzerindekielerde %37,6'ya kadar arttığı bildirilmiştir (54). Türk toplumunda 40 yaş üstü erkeklerde erektil disfonksiyon bozukluğu insidansı %33 olarak bildirilmiştir (55). Yaşlı erkeklerde görülen erektil disfonksiyon ve cinsel işlev bozukluklarının yaşlanmaktan ziyade kardiyovasküler hastalıklar, diyabet gibi diğer hastalıklarla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (54,56). Erkeklerde ileri yaşlarda görülen cinsel işlev bozukluğu infertiliteye neden olabilmekte ya da tam tersi infertilitenin getirdiği psikolojik etkilerden kaynaklanabilmektedir.

Çevresel kimyasalların spermatogenez veya germ hücrelerinin deoksiribonükleik asit (DNA)'leri üzerinde doğrudan bir etkisi olabileceği belirtilmiştir. Toksik veya yüksek sıcaklıklara maruziyetin olduğu meslekleri yapan kişilerde infertilite oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir (57). Endüstriyel ürünlerde kullanılan bazı kimyasalların da semen kalitesini olumsuz etkilediği saptanmıştır (58).

Belirli yıkıcı kimyasallara erken kısa süreli maruziyetler yalnızca belirli yaş gruplarında meydana gelirken, kronik maruziyet veya toksinlerin yıllar içinde birikiminin yalnızca yaşlı erkeklerde infertilite için önemli bir etken olabileceği düşünülmektedir. İlerleyen yaşta toksit maddelerin insan semen parametrelerinin bozulmasına katkısı halk tarafından kolaylıkla kabul edilse de literatürde somut kanıtların mevcut olmadığı bildirilmiştir (31).

Üretilen sperm sayısı ve morfolojisine ek olarak spermin içerdiği genetik materyelin kalitesi de fertilitate açısından önemli olmaktadır. Artan baba yaşı ile X kromozomu geçişli genetik hastalıkların görülme sıklığının artması, yaşlanmanın genetik materyelde de dejenerasyona neden olduğunu işaret etmektedir. Ancak genetik hastalıklarda çevresel etkenler ve yaşam şekli gibi faktörler de önemli rol oynadığı için baba yaşının direkt etkisini saptamak zorlaşmıştır (31,43).

Günümüzde yardımcı üreme teknikleri sayesinde ileri yaşta olan çiftlerin de çocuk sahibi olabileme şansı artmıştır (43). Çok sayıda çift ileri yaşlarda çocuk sahibi olmak için infertilite kliniklerine başvurduğu için ileri baba yaşının azalmış semen kalitesi ve daha yüksek infertilite riski ile ilişkili olup olmadığını bilmek önem kazanmıştır (59). Yaşlı erkeklerde genç erkeklere göre daha az sayıda spermatid bulunmaktadır (60). Ayrıca açık renkli A tipi spermatogonia hücrelerinde 6. dekatta, koyu renkli A tipi spermatogonia hücrelerinde 8. dekatta azalma olduğu bildirilmiştir (61).

Literatürde yaşlanmanın semen parametreleri üzerindeki etkileri hakkında farklı sonuçlar bildirilmiştir. Brahem ve ark. infertil kişilerde yaşla birlikte semen hacmi ve sperm canlılığında azalma, sperm konsantrasyonunda ise artış gözlemlenmiş ancak fertil kişilerde semen parametreleri ile yaş arasında ilişki saptanamamıştır (30).

Hossain ve ark. 22-55 yaşları arasında 1121 infertil çifti incelemiş semen hacminin, sperm motilitesinin ve ilerlemiş durumdaki motilitenin artan yaşla birlikte önemli ölçüde azaldığını bildirmektedir (59). Ghaidl ve ark. da ilerleyen yaşla birlikte sperm motilite ve konsantrasyonunda azalma gözlerken, sperm morfolojisinde değişim olmadığını bildirmiştir (62).

Literatürdeki çalışmaların sonuçlarında, artan erkek yaşı ile gebelik oranında azalma ve gebe kalma süresinde artışlara neden olduğu sonucuna varılmaktadır. Ancak bu konuda kadın yaşı da yapılan araştırmaların sonuçlarını etkilemektedir (63). Erkek partnerin 40 yaşından büyük, kadın partnerin en az 35 yaşında olduğu çiftlerde hamilelik oranlarının daha düşük olduğu, ilerleyen baba yaşı ile düşük ve ölü doğum riski arasında kesin bir ilişki bulunduğu bildirilmiştir (31). Gebe kalma süresinde 30 yaş altı erkekler ile 50 yaş üstü erkekler arasında %20'ye varan fark saptanmıştır (63).

Dünya sağlık örgütü 2010 yılında yayınladığı infertilite kılavuzunda 50 yaşın üzerindeki bireyler için normal semen parametresi referans değerlerini yenileyerek önceki kılavuzlarda bildirilenlerden önemli ölçüde daha düşük olan referans aralıkları ve sınırları dahil etmiştir. Yaşlanma ile semen parametrelerindeki değişim ile ilgili bir diğer soru da bahsi geçen değişimler için eşik değer olarak hangi yaşın kabul edilmesi gerektiği olmuştur. Literatürde farklı semen parametreleri için farklı yaş aralıkları bildirilmiştir. Bu sonuçların farklılık göstermesi, seçilen yaş grupları, örneklem büyüklüğü, etnik ve biyolojik farklılık gibi birçok faktörden kaynaklanabilmektedir. Ayrıca son çalışmalar semen parametrelerinin erkek fertilitate potansiyeli için zayıf bir belirteç olduğunu öne sürmektedir (64).

Eskenazi ve ark. semen hacmi ve motilitenin 22 yaşından itibaren sürekli azalma gösterdiğini, 80 yaşındaki kişilerin %80'ninde semen hacminde anomali olduğunu bildirmiştir (65). Çin toplumunda yapılan bir araştırmada normal sperm oranının 30 yaş ve sperm hareketliliğinin 40 yaşından itibaren azalmaya başladığı bildirilmiştir (66). Başka bir çalışmada en iyi sperm parametrelerinin 30-35 yaş arasında görüldüğü, en fazla azalmanın 55 yaşından sonra meydana geldiği bulunmuştur (67).

4.3. Oksidatif Stres

Oksijen hücrelerin yaşamın sürdürülebilmesi için hayati bir element olarak bilinmektedir. Oksijen metabolizması sonucu kararsız yapıda, son yörüngesinde eşlenmemiş elektrona sahip reaktif oksijen türleri (ROT) ortaya çıkmaktadır. ROT, oksijen türevlerini içeren, radikal (hidroksil iyonu, süperoksit radikali (O_2^-), azot

oksit (NO), peroksil vb.) ve radikal olmayan (ozon, hidrojen peroksit (H₂O₂), oksijen, lipid peroksit) moleküller ve reaktif nitrojen türlerini (nitroz oksit, peroksinitrit, nitroksil iyon vb) kapsamaktadır (68). Bu moleküller elektron sayılarını tamamlamak için, diğer moleküllerle kolayca reaksiyona (oksidasyon) girerek bir dizi kimyasal reaksiyonlara neden olmuştur. Aslında bazı yapıların sentezi, çeşitli transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu, apoptoz ve farklılaşma gibi süreçler için hücre içerisinde fizyolojik seviyede ROT bulunmaktadır. Ayrıca bir dizi kinazı ve fosfatazı modüle ederek pek çok hücre içi sinyal yolağında da yer almıştır (69). Ancak ROT'un fizyolojik sınırlarda tutulması gerekir, aksi takdirde hücre fonksiyonu ve yaşamına karşı zararlı etkiler ortaya çıkabilmektedir. Sağlıklı bir metabolizmada ROT'un hücreye olumsuz etkileri çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidana dayalı stratejilerle dengelenmektedir (70). Enzimatik koruma sistemlerini süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz ile oluşturulmuştur. Non-enzimatik antioksidanların başlıcaları ise ürik asit, E ve C vitaminleri ile albümin olarak bilinmektedir (71).

Oksidatif stres (OS), hücreler ve dokularda ROT birikimi ile biyolojik bir sistemin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir durum olmuştur. OS'in pek çok kronik, enflamatuvar veya otoimmün hastalığın ortaya çıkmasında rol aldığı bildirilmektedir. İnfertilitenin pek çok sebebi arasından, OS'in doğurganlığı etkilediği fikri son zamanlarda ön plana çıkmıştır (68).

Reaktif oksijen türlerinin sperm fonksiyonları üzerinde hem yararlı hem de yıkıcı etkileri olabilir ve bu etkiler ROT düzeyine bağlı olmaktadır. Fizyolojik fonksiyonları sağlamak için reaktif oksijen ve nitrojen türleri uygun seviyelerde düzenlenmelidir. Az miktarda ROT, kök hücreler, sperm ve yumurtadaki normal metabolizmanın bir ürünüdür ve bu reaktif türler kapasitasyon, akrozomal reaksiyon ve hiperaktivasyon gibi önemli üreme süreçlerini düzenlemektedir (72).

Ejakulatta bulunan sperm ve lökositler ejakulat içerisinde ROT'un başlıca kaynağı olarak kabul edilmiştir (73). Sperm tarafından ROT üretiminin plazma membranı düzeyinde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve mitokondriyal düzeyde NADPH'ye bağlı oksidoredüktaz (diaforaz) sistemi ile oluşturulduğu düşünülmektedir (74).

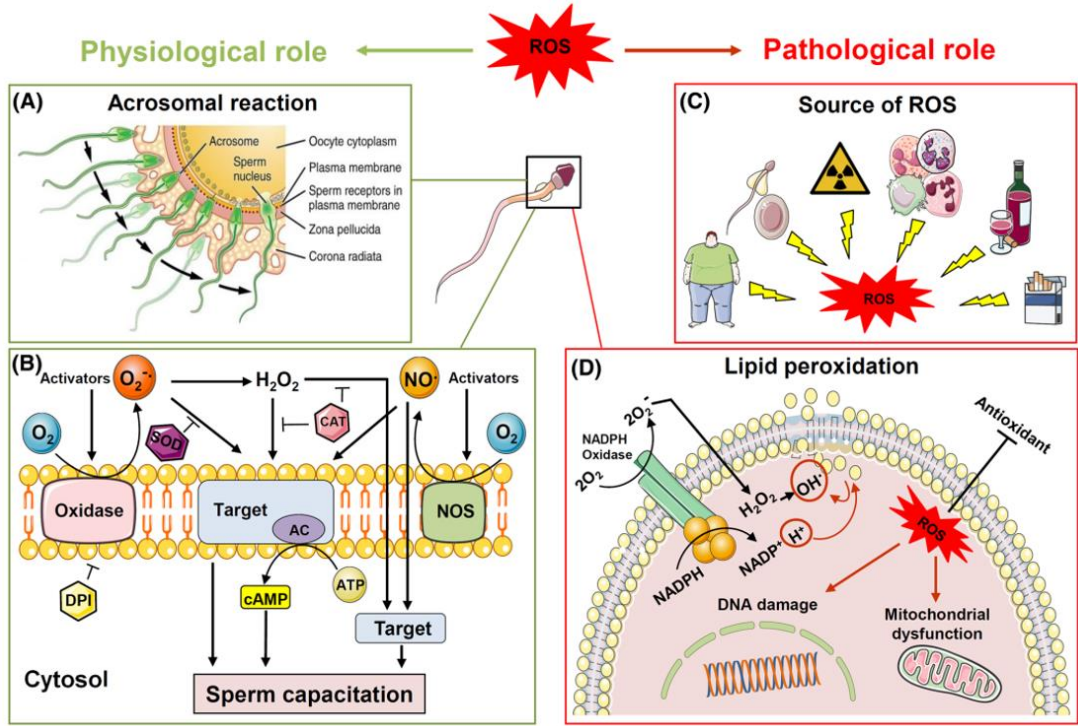
Oksijen metabolizması sonucu ortaya çıkan en yaygın ROT türleri olan H₂O₂ ve nitrik oksidin (NO) kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit birleşmesini sağladığı gösterilmiştir (68). ROT akrozomal reaksiyonu, 70-105 kDa sperm proteinlerinin tirozin ile fosforilasyonu yoluyla sağlanmaktadır. NO, ST, LH, epididimisin epitel hücreleri ve vas deferens'te bulunmaktadır. Bunlara ek olarak NO, spermdeki proteinlerin tirozin fosforilasyonunu modüle ederek sperm kapasitasyonu üzerine de etki etmiştir. Kapasitasyona hidrojen peroksit ve NO'nun yanı sıra süperoksit ve süperoksit anyon radikali katkıda bulunmaktadır. NADH ve NADPH, p81 ve p105'in fosforilasyonunu ve sperm kapasitasyonunu aktive etmektedir. Kapasitasyon sırasında, 105 ve 81 kDa proteinlerinin treonin-glutamin-tirozin motifinde (P-Thr-GluTyr-P) çift fosforilasyon meydana gelmektedir. Bu fosforilasyon, özellikle NO tarafından düzenlenmektedir. H₂O₂ ve oksijenin (O₂) hem p81 ve p105'in tirozin fosforilasyonunun hem de sperm kapasitasyonunun ortadan kaldırılmasında rolü olmuştur. ADPH oksidaz inhibitörleri hem p81 ve p105'in tirozin fosforilasyonunu hem de sperm kapasitasyonunu azaltabilirken hidrojen peroksit bu iki prosedürü indüklemektedir (72).

Kodama ve ark. fare spermlerinde düşük seviyede hidrojen peroksit ve lipid peroksit üretimine neden olan demir sülfat ve askorbik asit ile indüklendiğinde spermin zona pelusida'ya bağlanma yeteneğini artırarak fertilizasyon kapasitesinde %50 artış ortaya çıktığını gözlemlemiştir (75). Ancak Griveau ve ark. aşırı hidrojen peroksit üretiminin insan spermlerinde zamanla ilerleyici şekilde sperm motilitesini ve akrozom reaksiyonunu azalttığını gözlemlemiştir (76).

Lökosit sayısının semen ml'sinde 1 milyondan fazla olması lökositospermi olarak tanımlanmıştır. Yadav ve ark. lökositospermik kişilerde özellikle NO artışı bildirmiştir. Aşırı NO sperm membranı bütünlüğünü bozarak sperm motilitesinde azalmaya yol açabilmektedir. Bu çalışmada ayrıca ROT artışı ile birlikte antioksidan seviyesinde azalma da gözlenmiştir. Enflamasyon veya enfeksiyon durumlarında aktifleşen lökositler normalden 100 kat daha fazla ROT üretimine neden olarak, OS'i arttırıcı bir etki ortaya çıkarabilmektedir (77).

Sperm plazma zarında çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) şeklinde bulunan lipitler, ROT'a en duyarlı makromoleküller olarak kabul edilmiştir. ROT'un, hücre zarındaki PUFA'yı etkilemesi lipid peroksidasyonu adı verilen bir dizi kimyasal reaksiyona yol açmaktadır. Bu reaksiyonun yan ürünü olan malondialdehit (MDA), peroksidatif hasarın derecesini saptamakta kullanılmaktadır (68).

Spermatogenez sırasında fazla sitoplazmanın atılması, ROT seviyesinin fizyolojik sınırlarda tutulmasını sağlamaktadır. Ancak anormal morfolojideki spermelerde fazla olan sitoplazmanın atılamaması sonucu bir sitoplazmik droplet meydana gelebilmektedir. Bu spermeler immature ve işlevsizdirler. Sitoplazmik droplet hücre içi β - NADPH üretimini kontrol eden glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimini içermektedir. NADPH, sperm membranında bulunan NADPH oksidaz yoluyla ROT üretimini sağlamaktadır (72). Aşırı H_2O_2 'in, hücre membranından diffüze olup 6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimini inhibe ederek NADPH'ın hücre içi kullanımını etkilemesi sonucu sperm motilitesini azalttığı düşünülmektedir (78). Diğer bir hipotez de ROT'un aksonemal proteinleri etkileyecek bir dizi zincir reaksiyonu tetikleyerek motiliteyi etkilediği olmuştur (79) (Şekil-4.3.1).



Şekil 4.3.1: ROT'un sperme fizyolojik ve patolojik etkisi. A) ROT'un akrozom reaksiyonunda zona pelusida penetrasyonunda rolünü göstermektedir. B) sperm kapasitasyonu sürecinin başlangıcında ROT üretilmiştir. Hücre zarında oksidaz ürünü O_2^- hücre zarında sperm kapasitasyonuna yardım etmektedir. H_2O_2 ve NO kapasitasyona direkt etkili olmuştur. C) Obezite, alkol, sigara gibi etkenlerin ROT'lerine etkisi gösterilmektedir. D) NADPH oksidaz sperm lipid membranında süperoksit radikali oluşturmaktadır. O_2^- , H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluşturmaktadır (OH). Bu durum lipid peroksidasyonunu ve ROT üretimini arttırmaktadır (72).

Sperme hareketliliği sırasında enerji sağlamakla görevli mitokondriler de oksidatif stres kaynağı olabilmektedir. Mitokondriyal solunum mekanizmasında rol alan diaforaz enzimi indirgenmiş ve oksitlenmiş NADH formlarının oranını kontrol etmektedir. Mitokondriyal disfonksiyon olan spermelerde ROT seviyesi fizyolojik sınırların üzerine çıkabilmektedir. Artan ROT mitokondriyal membrana zarar vererek oksidatif stresin daha fazla artmasına neden olmaktadır (72).

Sperm DNA bütünlüğünün infertilite için semen parametrelerindeki değişimlerden daha fazla belirleyici olduğu düşünülmektedir. İnfertil erkeklerde daha fazla DNA hasarlı sperm olduğu gösterilmiştir (20). ROT, DNA zincirinde

kırılmalar, kromozomal değişimler ve gen mutasyonlarına neden olabilmektedir (68). Literatürde infertil erkeklerde anormal DNA metilasyonunun daha sık görüldüğü bildirilmiştir (80). Tunc ve ark. infertilite şikâyeti olan erkeklerden alınan semen örneklerinde ROT seviyesi ile DNA metilasyonu arasında negatif ilişki bulunduğunu, antioksidan tedavinin DNA hasarını azalttığını bildirmiştir (81). Bir başka çalışmada oksidatif stresin spermelerde DNA'nın tamir yeteneğini azalttığı gözlenmiştir (82). Wang ve ark. endüstriyel ürünlerde kullanılan gümüş nanopartiküllerinin oksidatif strese neden olarak sperm canlılığı ve motilitesinin yanı sıra DNA yapısını da olumsuz etkilediğini bildirmiştir (83). Normal spermlerde melenoaldehit (MDA) seviyelerinin yüksek olduğu, sperm sayısında hem azalma hem de DNA yapısında hasar olan astenozoospermik (sperm hareketliliğinin az olması) bireylerde ise antioksidan seviyelerinin de azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular oksidatif stersin DNA hasarına yol açtığı ve semen parametrelerini etkileyerek infertiliteye neden olabileceğini düşündürmektedir (84). Bu bulguları destekler nitelikte Jannatifar ve ark. infertilite şikâyeti olan astenozoospermi hastalarında lipid peroksidasyonu ve ROT artışının sperm parametrelerinde bozulma, DNA fragmantasyonu ve protamin eksikliği meydana getirdiğini saptamış, antioksidan etkiye sahip N-asetil-sistein tedavisinin bu zararları geri almada faydalı olduğunu bildirmiştir (85).

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, erkek üreme sisteminde hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasında dengeyi sağlar ve anormal yapıda bulunan spermatozoları eleyerek hasarlı genetik materyalin bir sonraki nesle aktarılmasına engel olmuştur. Yüksek seviyelerde ROT, iç ve dış mitokondriyal zarları bozar, sitokrom-c proteininin salınımını artırır ve apoptoz kaspazlarını aktive eder. İdiopatik infertil hastalardan alınan semen örneklerinde yüksek seviyede ROT ile apoptozda rol alan sitokrom c ve kaspaz 9 ve 3 seviyeleri arasında ilişki bulunmuştur (86).

Yaşlanmanın ve hücresel işlevdeki yaşa bağlı düşüşün, serbest radikallerin neden olduğu DNA, protein ve lipid hasarının birikmesinden kaynaklandığını düşünülmektedir (87). Aynı zamanda ileri yaşlarda ortaya çıkan Alzheimer hastalığı, diyabet ve kardiyovasküler problemler gibi hastalıkların oksidatif stres ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (88). Yaşlı dokularda ROT seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Bu

artışın, yaşla birlikte antioksidan savunmada sisteminde azalma, ROT üretiminde bir artış veya her ikisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (89).

Kadınlara nazaran erkeklerde fertilite ömür boyu devam etmesine rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalar erkeklerde fertilitenin bazı unsurlarının ilerleyen yaşla birlikte etkilendiği bildirilmiştir (87). Yıllar içerisinde çevresel ve endokrin etkenlere maruziyetin oksidatif stres ve metilasyon miktarını artırarak infertiliteye neden olduğu düşünülmektedir (90). Zubkova ve ark. yaşlı sıçanlar ile genç sıçanların sperm örneklerini karşılaştırdığı çalışmasında, yaşlanmanın kromatin paketlenmesini ve bütünlüğünü değiştirdiğini ve kauda epididimiste depolanan spermilerin oksidatif tehdiye karşı daha duyarlı olduğunu bildirmiştir (87). Oksidatif stresin sperm kromatin kalitesini nasıl etkilediğine dair daha kapsamlı bir değerlendirme elde etmek için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

4.4. DNA ve Kromatin Hasarı

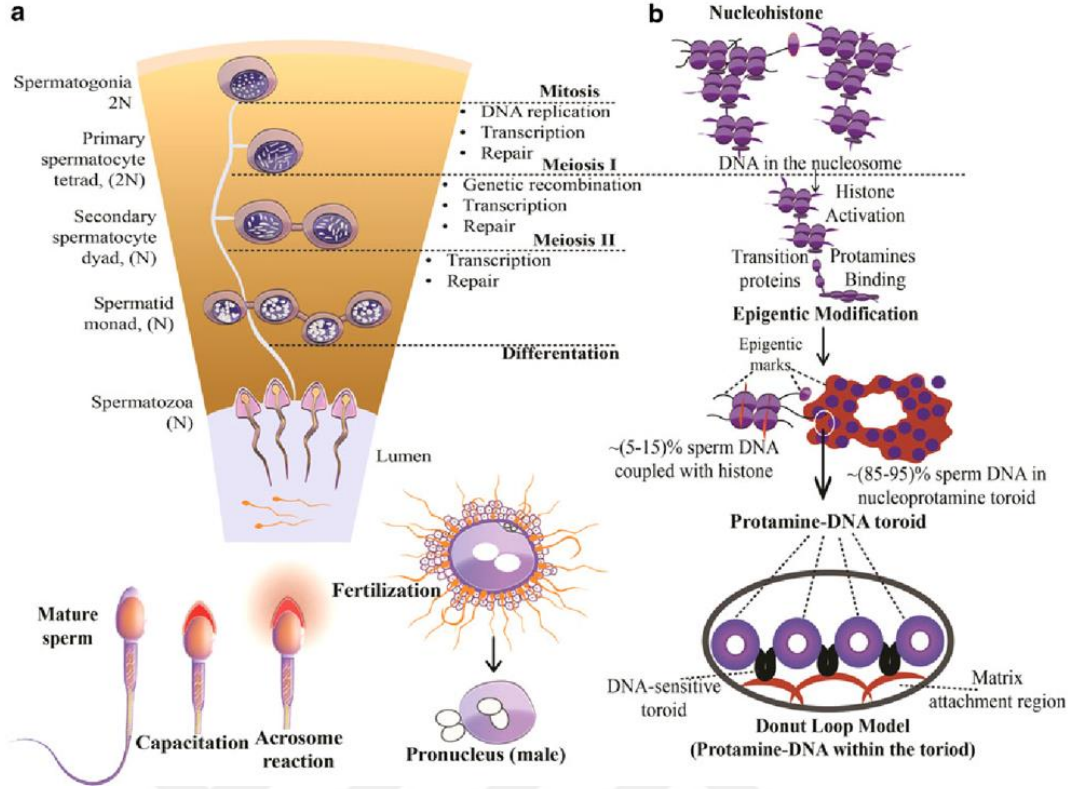
DNA, iki polinükleotid zincirinden oluşan bir moleküldür. Her nükleotid bir deoksiriboz (5 karbonlu şeker) fosfat grubu ve dört farklı tipteki azotlu bazlardan oluşmaktadır. Nükleotidler fosfatlı şeker grupları arasındaki fosfodiester bağlarıyla birbirine bağlıdır. Purin (adenin ve guanin) veya pirimidin (sitozin ve timin, ribonükleik asit (RNA)'de urasil) yapısındaki bazlarsa birbirine doğru karşılıklı uzanmakta ve aralarındaki hidrojen bağlarıyla sabitlenerek çift sarmal yapıyı oluşturmaktadır. Gen, genetik bilginin aktarımından sorumlu DNA segmenti olarak tanımlanmaktadır.

İnfertil erkeklerin sperm DNA'larında hasar olduğuna dair kanıtlar mevcuttur ve bu durumun fertiliteyi olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Son yıllarda DNA bütünlüğünün incelenmesinin infertilite için semen parametrelerinden daha güvenilir bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Litretürde DNA hasarı ile semen kalitesine azalma (sperm sayısı, motilitesi ve normal morfoloji) arasında ilişki olduğu bildirilmektedir, ancak normal semen parametrelerine sahip kişilerin %8'inde de sperm DNA hasarına rastlanabilmektedir. Literatürde spermde DNA hasarının ortaya çıkmasında kromatin yapısının bozulması, oksidatif stres ve abortif apoptoz olmak üzere üç ana mekanizma tartışılmaktadır (20).

Genetik bilgiyi taşıyan DNA, hücre çekirdeğine sığabilmek için bükülüp yoğunlaşmış kromatin yapısını meydana getirmektedir. Kromatinin yapısında bulunan histon proteinleri gen bölgelerinin aktivasyonu ya da inhibisyonundan sorumlu olmuştur. Kromatin içerisinde dört çift histon proteininin bir araya gelip oluşturduğu yapı nükleozom olarak adlandırılmıştır. DNA ise nükleozomların etrafını dolanarak sarmaktadır. Gen ekspresyonu, DNA onarımı ve replikasyonu gibi olaylarda DNA ve nükleozom arasındaki bağlar çözülerek proteinlerin DNA'ya ulaşması sağlanmaktadır (91).

Spermin kromatininin organize ve sıkıştırılmış yoğun yapısı, spermin erkek ve dişi üreme yolları boyunca geçişi sırasında baba genomunun korunmasını ve yumurtaya iyi durumda aktarılmasını sağlamaktadır. Kromatin hasarları DNA zincirlerinin bütünlüğünün bozulması, kusurlu histon-protamin sıkıştırılması ve anormal yapıda kromatin oluşumu şeklinde ortaya çıkabilmektedir (20).

Sperm DNA'sı çekirdekte daha ufak bir hacime sığdırılmak amacıyla somatik hücrelerden çok daha farklı ve değişik bir sıkıştırılma (paketlenme) sürecine gitmektedir (20). Spermiyogenez sırasında, histonlar hiperasetillenerek DNA zinciri arasındaki bağlantıları gevşetilmektedir. Sonra histonlar önce geçiş proteinleri, daha sonra protaminlerle yer değiştirmektedir (protaminasyon). Spermiyogenez sırasında spermin protaminasyonu, nihai DNA kalitesinin düzenlenmesinde büyük bir rol oynamaktadır (20,87). Protaminler sperm DNA'sının yoğunlaştırılmasının yanı sıra genetik mesajın korunması, DNA'nın bütünlüğünü ve onarımını sağlayan süreçlere katılım ve genetik materyalin aktarılmasında görev alan moleküller olmuştur (92). DNA iplikçiklerinin bu protaminler tarafından yüksek oranda yoğunlaştırılmasıyla sperm kromatininin temel paketleme birimi olan toroid oluşmaktadır (20) (Şekil-4.4.1).



Şekil 4.4.1. Kromatin paketlenmesi (93)

Protaminler, diğer protaminlerle disülfid bağları oluşturabilen serbest tiyoller içerir, böylece zaten kompakt olan sperm kromatinini stabilize edebilmektedirler. Tiyollerin oksitlenerek disülfid bağlarının oluşması spermin epididimisten geçişi sırasında gerçekleşmektedir. Arızalı protaminasyonun spermlerin kalitesini azalttığını ve infertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnfertil erkeklerin sperm kromatinlerinde histon/protamin seviyesi azalırken histon seviyesinin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca disülfid bağı içeren P2 tipindeki protamin seviyesindeki değişimlerin de infertilite ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (92).

DNA'nın açılması sırasında sarmal yapıdan kaynaklanan burulma stresini hafifletmek için DNA topoizomeraz 2 enzimi sperm DNA iplikçiklerinde geçici kırılmalar oluşturmaktadır (94). Bu geçici kırılmalar daha sonra, spermiyogenez ve ejakülasyonun tamamlanmasından önce aynı enzim olan topoizomeraz II tarafından onarılmaktadır. Ancak bu çentiklerin tamir edilememesi ejakülatta DNA hasarlı sperm oluşumuyla sonuçlanmaktadır (95).

Literatürdeki bazı çalışmalar DNA hasarı ile oksidatif stress arasında ilişki bulunduğunu ve sperm DNA hasarının esas kaynağının oksidatif stress olabileceğini belirtmiştir (32). DNA bazları ve fosfodiester omurgaları oksidatif stress'e karşı hassastır ve bu yapıların peroksidasyonu DNA'nın zincir kopmalarına ve çapraz bağlanmasına neden olabilmektedir. Bu durum transkripsiyon, translasyon ve DNA replikasyonunun bozulmasıyla sonuçlanabilmektedir.

DNA'nın yapısında bulunan guanin, ROT potansiyeli yüksek olması nedeniyle oksidatif stress kaynaklı hasara oldukça açık olmaktadır. İnfertil hastalarda, oksidatif DNA hasarının bir biyolojik belirteci olan 8-hidroksideoksi guanozin miktarında artış gösterilmiştir. Ayrıca DNA kırıkları ile ROT seviyesi arasında pozitif korelasyon bildirilmiştir (96).

DNA hasarının, ROT seviyesini arttıran lökospermi veya sitoplazmik retansiyonlu olgunlaşmamış anormal spermlerden kaynaklanan oksidatif stress nedeniyle gelişebileceği de düşünülmektedir (20).

Spermelerde mitokondri bütünlüğü iç membrandaki sitokrom c'nin varlığı ile kurulmaktadır. İnfertil erkeklerde oksidatif stress nedeniyle seminal plazmada sitokrom c seviyelerinin artışı mitokondrial hasara neden olabilmektedir. Hasarlanan mitokondriden salınan proteinler apoptoz sürecini hızlandırıp DNA hasarına yol açabilmektedir (86).

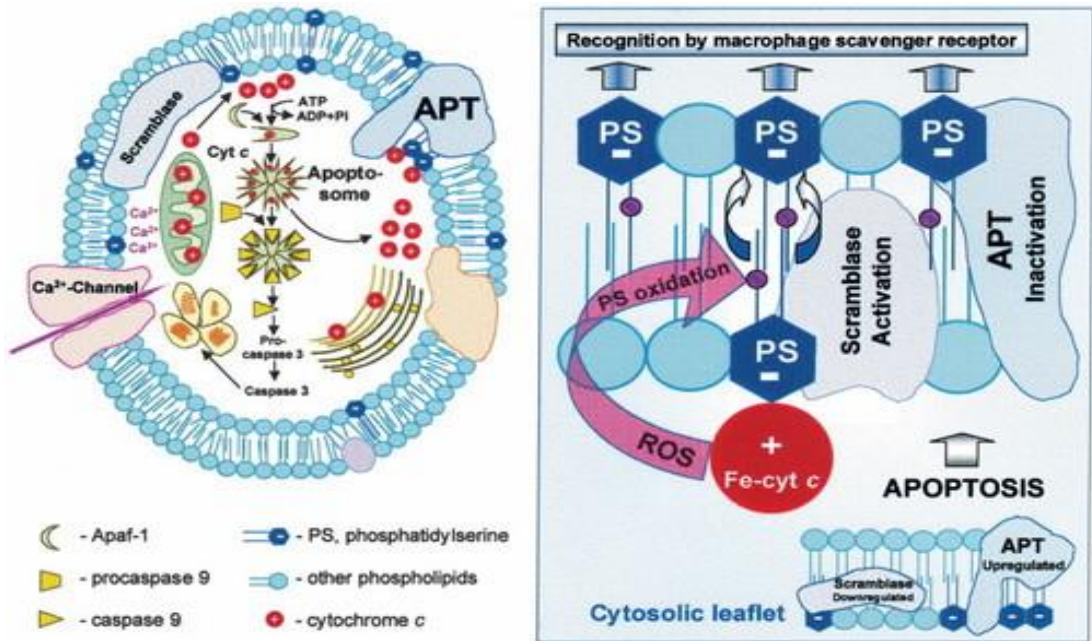
Sperm DNA hasarı ile ilgili bir başka teori, abortif apoptoz oluşumu olmuştur. Apoptoz vücudun birçok organında görülen fizyolojik olarak programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılmıştır. Testislerde germ hücrelerinin normalden fazla sayıda üretimi ve hasarlı hücrelerin seçilerek yok edilmesini sağlamaktadır.

Spermdeki apoptoz somatik hücrelerde görülen apoptozdan farklı olmaktadır. Plazma düzeyinde FAS reseptörü (apoptotik reseptör) varlığı, çekirdekte Bax genin yukarı doğru regülasyonu ve Bcl-2 ekspresyonunun aşağı doğru regülasyonunu kapsayan p53'ün varlığı, sitoplazmada Bax aktivasyonu ve sitozolde sitokrom c ve kaspaz kaskadı salınımı yollarıyla düzenlenmektedir (97).

Spermlerde mitokondri, çekirdek zarı, kromatin ve plazma membranında bozulma ve apoptotik cisimler, DNA fragmantasyonu, fosfatidilserin kalıntılarının externalizasyonu gibi apoptozun karakteristik özellikleri gözlenebilmektedir (43).

Bazı hücrelerde apoptoz sürecinin başladığı ancak daha sonra apoptoz yolaklarında gelişen bir aksaklıktan dolayı hücrenin bu süreci tamamlayamadığı düşünülmektedir. Bu fenomene “abortif apoptoz” denir. Bu süreçteki aksaklıkların bir şekilde DNA da hasar oluşturduğu, ayrıca sitoplazmik artıklar ve zayıf kromatin paketlenmesi olan anormal sperm oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir (20,43).

Apoptozun kritik bir aşaması, ölmekte olan hücre tarafından bu hücrelerin fagositler tarafından tanınması ve fagosite edilmesi ile sonuçlanan yüzey değişikliklerinin kazanılmasını içermektedir. Normalde neredeyse tamamen plazma zarının (PZ) iç katmanında (leaflet) yer alan fosfatidilserinin (FS) dış kısma translokasyonu (eksternalizasyon) apoptik hücrelerin makrofajlar için işaretlenmesini sağlamaktadır. Bu olay, FS'nin asimetrik dağılımını koruyan aminofosfolipid translokazın inaktivasyonu yoluyla sağlanmaktadır. Oksidatif stres mitokondriden sitokin-c salınımı yoluyla apoptoz yolağındaki kapsazları aktive edebilmektedir (98) (Şekil-4.4.2).



Şekil 4.4.2: Fosfatidilserinin eksternalizasyonu ve apoptoz (98).

Annexin V proteini FS'e bağlanabilme özelliğinden dolayı apoptotik hücreleri saptamada bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (99). Barrosa ve ark. infertil erkeklerde sperm membranında FS'in translokasyonun oksidatif stress ile ilişkili olarak arttığını, bu durumun DNA fragmentasyonunda artış ve sperm motilitesinde azalmaya neden olduğunu saptanmıştır (100).

Sakkaz ve ark. ise apoptoz belirteçleri olan p53, bcl-x ve FAS ekspresyonları ile DNA fragmentasyonu arasındaki zayıf bir ilişki olduğunu gözlemlemiş, DNA hasarının varlığının, spermelerde meydana gelen apoptotik süreçten ziyade nükleer ve sitoplazmik yeniden şekillenmedeki kusurlarla bağlantılı olabileceğini belirtmiştir (99). Buna karşın bir başka çalışmada apoptoza aracılık eden kaspaz-3 ile sperm motilitesi ve DNA fragmentasyonu arasında ilişki saptanmış, kapsaz yolkalarına bağlı apoptotik mekanizmaların FS'nin translokasyonu ve DNA fragmentasyonunda rol alabileceği belirtilmiştir (86).

Yaşlanmanın dış kaynaklardan (radyasyon, toksik maddeler) veya endojen faktörler (ROT, enflamasyon vb) tarafından oluşturulan DNA hasarının birikmesi nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir (101).

İleri yaşın olumsuzluklarından biri çoklu mitotik bölünmedir. Yaş ilerledikçe maruz kalınan kök hücre bölünme sayısındaki artış, giderek artan DNA replikasyon hatalarının birikmesine neden olur ve mutasyonlar ile sonuçlanabilir. Örneğin, 20 yaşındaki bir erkekte sperm üretimi tahmini olarak 190 hücre bölünmesi sonrası oluşmaktadır. Bu sayı, 40 yaşına gelindiğinde yaklaşık olarak 650 hücre bölünmesine çıkmaktadır (102).

İleri baba yaşında DNA replikasyon hataları sonucu çıkan mutasyonların bir sonraki nesilde ortaya çıkan kalıtsal hastalıklar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Otizm, şizofreni, akondroplazi, Apert sendromu gibi hastalıkların patofizyolojisinde babadan gelen genetik koddaki mutasyonların rolü olduğu düşünülmektedir. İleri yaşta baba kaynaklı bir sonraki nesilde görülen bu hastalıklar "paternal age effect (PAE) disorders" olarak tanımlanmaktadır (43). DNA

fragmentasyonu ve metilasyonun da bu hastalıkların oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (101).

Yetişkin kök hücreler, yaşamları boyunca doku homeostazına ve rejenerasyonuna aracılık etmektedirler. Germ hücrelerine benzer şekilde bu hücrelerde de yaşa bağlı DNA hasarı birikimi söz konusu olmuştur. Birikmiş DNA hasarı, hücre fonksiyonellikte düşüşe neden olur ve gen ekspresyonunun düzensizliği, bozulmuş transkripsiyon, hücre döngüsü durması ve apoptoz yoluyla hücre kayıplarına yol açmaktadır. Ek olarak, kök hücrelerin tükenmesi, doku homeostazının bozulmasına ve rejeneratif kapasitenin kaybolmasına neden olmaktadır (103).

İnsan testislerinde yaşlanmanın inaktif olan A koyu tip spermatogonia'ların yeniden aktivasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının etkisizleşmesi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Bu durum germinal hücre sıralamasında, dolayısıyla da spermde, DNA hasarını arttırabilmektedir (101).

DNA hasarı, hücre yaşlanmanın ayırt edici özelliklerinden biri olan genomik kararsızlık ile yakından ilişkilidir. Zamanla, genom bütünlüğünü koruyan mekanizmalar hatalı hale gelir ve genomik anormalliklerde ve DNA kırılmalarında bir artışa yol açmıştır. Sperm DNA hasarı veya parçalanması, semen örneğinin kalitesini değerlendirmek için kullanılan yaygın bir parametre olduğundan, spermde genomik instabilite infertilite açısından önem arz etmektedir (101).

Günümüzde DNA bütünlüğü, kromatin veya DNA zincir yapısını inceleyen çeşitli birçok metodların incelenmesi ile analiz edilebilmektedir. Toluidin mavi boyası kromatin yoğunlaşmasının azalması sonucu ortaya çıkan DNA fosfatlarının boyanması yoluyla kromatin bütünlüğü hakkında bilgi vermektedir. Sperm kromatin yapı deneyleri (SKYD) ile direkt olarak DNA zincir kırıklarının saptanması sağlanmaktadır (20).

Yaşlı bireylerde yapılan çalışmalarda DNA fragmentasyonu hakkında farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar ileri yaşta DNA fragmentasyonunu arttığını bildirirken, bazıları yaşla DNA fragmentasyonu arasında bir ilişki

saptayamamıştır. Bu durum DNA fragmentasyonunu belirlemede kullanılan farklı teknikler ya da çalışma popülasyonlarının farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Yaşın tek başına DNA fragmentasyonunu etkileyip etkilemediğini anlayabilmek için normal sperm parametrelili erkeklerin üzerinde yapılan araştırmaların sonuçları önem kazanmaktadır. Genel olarak bu çalışmalarda DNA fragmanasyonunun arttığı bildirilmiştir (101).

Sperm DNA fragmentasyonundaki artış yaşam boyu doğrusal bir artış şeklinde görünmemektedir, ancak anormal şekilde parçalanmış sperm DNA'sının prevalansında ileri yaşla birlikte bir hızlanma gözlenmektedir. Sağlıklı erkeklerde 40 yaşından sonra DNA fragmentasyonunun daha hızlı şekilde arttığı bildirilmiştir. Ancak normal sperm parametrelerine sahip genç erkeklerin gametlerinde de aşırı DNA fragmentasyonuna rastlanabilmektedir (101). Yaşlanmada GH'lerinin yanı sıra testis dokusu ve SH'lerinin dejenerasyonunda da artış bildirilmiştir (104).

4.5. Hücre İçi Sinyal Yolakları

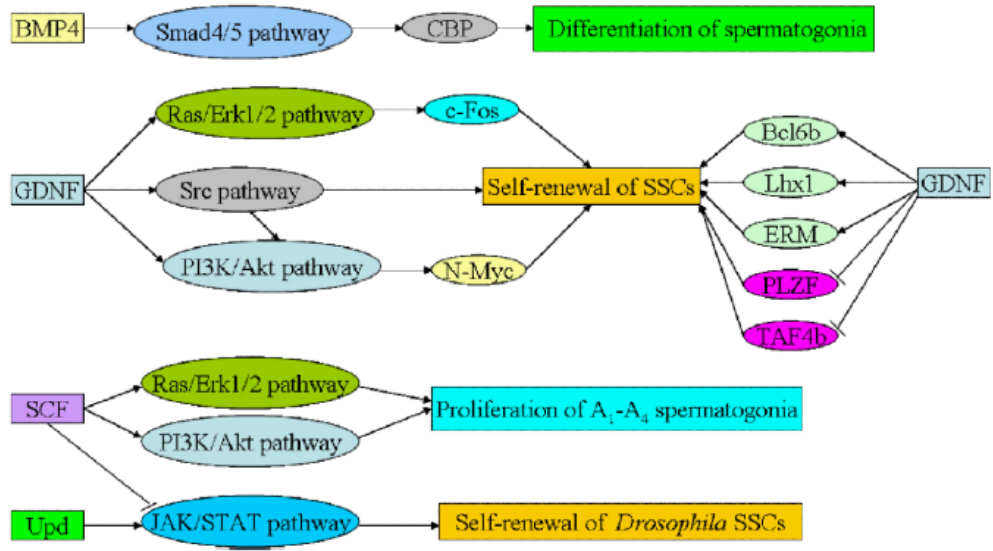
Sperm hücrelerinin iç denge denilen homeostazisi, hücrelerin büyümesi, çoğalması ve ölümü arasındaki dengeye bağlıdır ve bu süreçler, büyüme faktörleri, hormonlar, besinler, moleküler mekanizmalar dahil çeşitli faktörler tarafından hücre içi ve hücre dışı sinyal yolaklarının etkisi ile koordine edilerek düzenlenmektedir. Bu süreçler arasında en önemlilerinden olan hücre sinyal yolakları hakkında birçok çalışma gerçekleştirilmiş ancak sperm kalitesinin yaşa bağlı düşüşüne neden olan moleküler mekanizmalar tam anlamı ile aydınlatılamamıştır (105,106).

Sperm hücresinin sinyal yolaklarında ve gelişiminde destekleyici hücreler çok önemli olmuştur. Bu hücreler spermin gelişip farklılaşmasında ve erkek genital kanalı boyunca ilerlemesinde görev almaktadır. Sinyal molekülleri ve yolları spermatogonial kök hücrelerin (SKH) kendini yenilemeleri, farklılaşmaları ve spermatogenezin düzenlenmesi ve spermatogenez sürecinin kontrolü için gerekmektedir. Sinyal moleküllerinde ve hücre içi sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler, erkek kısırlığına ve testis kanserine yol açabilmektedir. Bu nedenle erkeklerde meydana gelen kısırlığın nedenleri arasında sinyal yolakları önemli

araştırma konuları arasında olmaktadır (107). Bu yollar arasında Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) sinyali yolu, Src sinyali yolu, 3 Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) /Akt yolu, Ras/Erk1/2 sinyali yolu, Smad sinyali yolu, mTOR sinyali yolu en önemlileri olmaktadır. JAK/STAT sinyali yolunda SKH'lerin kendilerini yenilemeleri ve hücre sel onarımı sağlayan uyarıcıların aktivasyonu için eşleştirilmemiş ligand (UPD) tarafından JAK/STAT sinyali yolu aktive edildiği tespit edilmiştir. UPD eksik mutantlarda SKH'lerin hızla tükendiği gözlenmiştir. UPD'nin aşırı ekspresyonunun SKH'lerin aşırı birikmesine neden olarak kök hücrelerin farklılaşmasını engellediği tespit edilmiştir. JAK/STAT sinyali yolunun etkinleştirildiği bu durum SKH'lerin kendini yenilemesini sağlamaktadır (108). JAK-STAT sinyalinin kaldırılması, germ hattı kök hücrelerinin spermatogonial kist kümelerine farklılaşmasına neden olmuştur (109). Src sinyali yolunda sertoli hücreleri tarafından üretilen glial hücre türevli nötrofik faktör (GDNF) fare SKH'lerinin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını parakrin yolu ile miktara bağlı bir şekilde düzenleyen ilk tanımlanmış moleküldür. GDNF'nin aşırı ekspresyonu, farklılaşmamış spermatogoniaların birikimine neden olmaktadır. Genetik mühendisliği ile GDNF geninin susturulması spermatogoniaların tükenmesi ile sonuçlanmış bu durum GDNF'nin spermatogoniaların kendini yenilemesi için gerekli olduğunu düşündürmüştür (110).

GDNF'nin Src kinaz ailesini RET reseptöründen bağımsız bir şekilde aktive ettiği tespit edilmiştir (111). Src kinaz ailesinin, SKH'lerin GDNF aracılığıyla farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. GDNF, Src kinaz ailesini aktive eder bu da PI3K/Akt yolunun daha fazla uyarılmasını sağlayarak ve N-Myc ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu sürecin sonunda SKH'lerin farklılaşması sağlanmaktadır (112). PI3K/Akt yolağında PI3K ligandları, reseptörleri ve GDNF'leri uyararak SKH'lerin kendini yenilemesini ve çoğalmasını sağlamaktadır (113). PI3K'nin spesifik inhibitörü olan LY294002 tarafından inhibisyonu, SKH'lerin çoğalmasını bloke etmektedir. Ayrıca SKH'lerde AKT'yi aktive ederek 4-hidroksi tamoksifen aracılığı ile SKH'lerin kendilerini yenilemelerini uyararak apoptozu engellemektedir. PI3K'nin spermiyasyon aşamasında etkisi gözlenmemiş ancak spermatogenez sürecine geçişte önemli olduğu tespit edilmiştir (114).

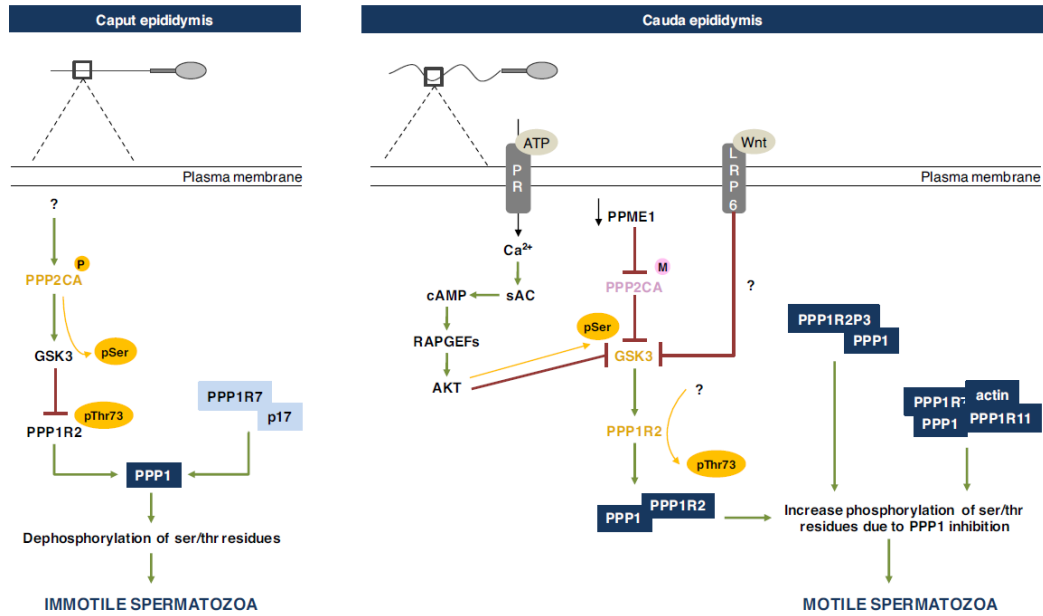
Ras, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK) ve mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) çeşitli hücre fonksiyonlarının ayarlanması, hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve hücre döngüsünün gerçekleşmesinde görev almaktadırlar (115,116). MAPK/ERK yolunun MEK'e özgü inhibitör PD098059 tarafından bloke edilmesi, yenidoğan farelerde erkek germ hattı kök hücrelerinin çoğalmasında küçük miktarda azalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir. GDNF sinyallerinin SKH'lerde Ras/ERK1/2 yolunun aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. GDNF, ret tirozin kinaz ve kenetlenme proteini shc'yi fosforile ederek, Grb2 adaptör proteininin aktivitesini, Ras/ERK1/2 yolunun hızlı aktivasyonunu, CREB/ATF transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu uyarmaktadır. Bu durum c-Fos geninin transkripsiyonunu sağlayarak siklin A ve CDK2'nin ifadesini sağlamaktadır. Bu, SKH'lerde S-faz girişini hızlandırarak DNA sentezini ve SKH proliferasyonunu desteklemektedir (117). Siklin A ve CDK2'nin ifadesinin, smad sinyal yolu aracılığıyla insan embriyonik kök hücrelerinin onarımları ve pluripotensileri ile ilişkilendirilmiştir (118,119). BMP4'ün uyarılması, Smad4/5 kompleksi oluşturmak için Smad4 ve Smad5'in hızlıca hareketine neden olmaktadır. Smad4/5 birleşmesi ile CBP ve p300 gibi transkripsiyon faktörleri aktive olur bu aktivasyon SKH'lerin farklılaşmasında etkin rol oynamaktadır (120) (Şekil-4.5.1).



Şekil 4.5.1 Çeşitli ligandlar tarafından aktive edilen ve SKH'lerin farklılaşmasını düzenleyen önemli sinyal yolları (107).

Spermlerin epididimis içindeki motilite kazanımı fosfoprotein fosfataz 1 (PPP1, aynı zamanda PP1olarak da bilinen) molekül aktivitesinin kontrolünde olmaktadır. PPP1 izoformu kamçı, orta parça ve başın arka bölgesi boyunca dağılmıştır, hareketlilik ve akrozom reaksiyonunda bir rolü olduğu düşünülmektedir (121). Smith ve ark. 1996 yılında, PPP1 aktivitesi ile sperm motilitesi arasındaki ilişkiyi ilk kez tanımlamıştır. Epididimisin kaput kısmında spermlerin PPP1 aktivitesi yüksektir ve spermler bu sebeple hareketsiz olmaktadır (122,123). Bunun aksine, epididimisin kaudal kısmında spermlerde PPP1 aktif değildir ve sperm hareketlidir. PPP1 düzenleyici alt birim 2, PPP1R2 (İnhibitör-2 olarak da bilinir), bir PPP1 inhibitörüdür, spermlerin motilitesinin kontrolünü sağlamaktadır (124,125).

Treonin 73'te fosforile edildiğinde, insan PPP1R2, PPP1'e bağlanamaz ve onu aktif hale getirmektedir (126). Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), PPP1R2 fosforilasyonundan sorumlu kinazdır. GSK3alpha nakavt olduğunda, sperm motilitesinde ve metabolizmasında bir azalma olmaktadır (Şeki- 4.5.2).



Şekil 4.5.2: Epididimide sperm motilitesi edinimi için gerekli sinyallerin şematik gösterimi (127).

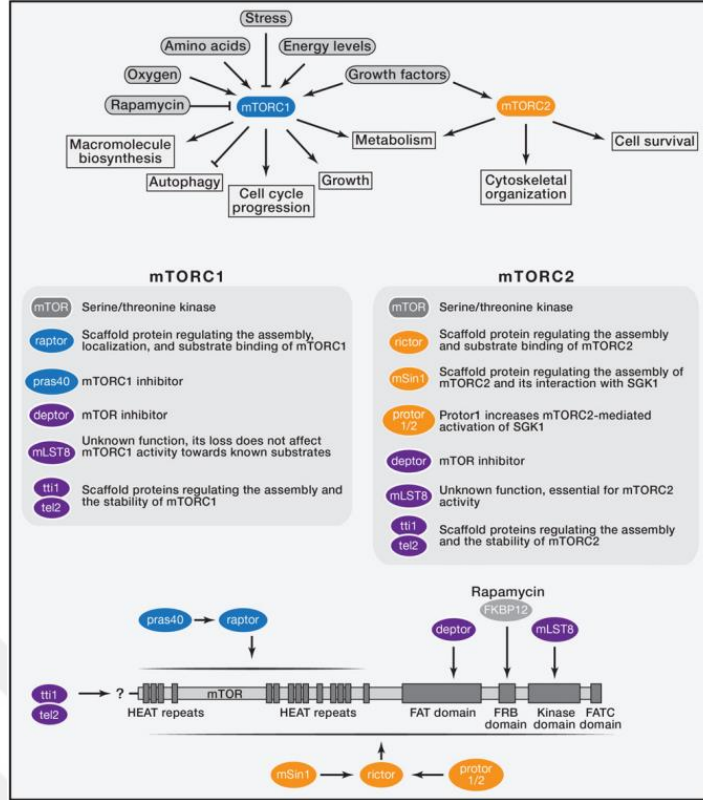
4.5.1. mTOR Yolağı

Hücre içi sinyalleri yolları arasında, rapamisin memeli hedefi (mTOR) kinaz ağı, merkezi bir düzenleyici olarak öne çıkan çok önemli bir yol olmaktadır. mTOR

hücre içi ve hücre dışı sinyalleri birleştirilmesini sağlar ve hücrenin hayatta kalması, gelişmesi, farklılaşması ve hücre metabolizmasının düzenlenmesi gibi birçok faktörde kilit bir rol oynamaktadır (128). Bunların yanında mTOR, enerji kaynağı ve protein sentezine aracılık eden sinyal yolunu, biyokütle birikimi ve aktin hücre iskeleti organizasyonu ile ilgili diğer birçok olayı düzenlemektedir. Anabolik ve katabolik reaksiyonların arasındaki geçişte görev almaktadır (10). Son 10 yılda yapılan çalışmalarda, mTOR yolağının insanlarda anjiyogenez, tümör oluşumu, insülin direnci, adipogenez ve T-lenfosit aktivasyonu gibi hastalıklarda etkisini kaybettiği tespit edilmiştir (11).

mTOR proteini, PI3K ile ilişkili kinaz ailesine ait olan ve evrim boyunca korunan 289-kDa'lık bir serin-treonin kinaz olarak bilinmektedir. mTOR, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) olmak üzere en az iki farklı çoklu protein kompleksini içermektedir (129). mTORC1'in altı bileşeni vardır. Bunlar kompleksin katalitik öneme sahip alt birimi mTOR, mTOR'u düzenleme ile ilgili protein (raptor), memeli öldürücü Sec13 protein 8 (mLST8, GβL olarak da bilinir), prolince zengin 40 kDa AKT substrat (PRAS40), DEP alanı içeren mTOR etkileşimli protein (DEPTOR) ve Tti1/Tel2 kompleksi olarak keşfedilmiştir (130). Raptor, rheb ve RagA gibi yukarı yönde akış (Up-stream) düzenleyicileri, S6K ve 4EBP1 gibi aşağı yönde akış (Down-stream) düzenleyicilerinin alt katmanları ile etkileşime girerek mTORC1 işlevini kontrol etmektedir. Son çalışmalar, raptor fonksiyonunun yukarı yönde akış sinyallerine bir yanıt olarak meydana gelen fosforilasyon tarafından da düzenlendiğini göstermiştir (131). Bu fosforilasyonun gerçekleşmesi AMPK'nın (AMP-aktif protein kinaz) etkinleştirilmesi ile ilişkili olmaktadır. Aktif AMPK, raptorda bulunan genetik olarak korunmuş iki bölgede (Ser722, Ser792) raptoru doğrudan fosforile edebilmektedir. Bu fosforilasyon 14-3-3 bağlanma bölgeleri meydana getirmektedir. Bu sayede mTORC1'in fosforilasyon ile aktivitesinin düzenlenmesi sağlanmaktadır (132). mLST8, hem mTORC1 hem de mTORC2'nin ortak bir alt birimidir ve mTOR kinazın aktivasyonu için gerekli olmaktadır. mLST8'in mTOR'un aktif bölgesine bağlanarak onun etkinliğini artırdığı ortaya çıkarılmış, mLST8'in mTOR kinaz aktivitesinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (133). PRAS40 ve DEPTOR, mTORC1'in farklı negatif düzenleyicileri olarak karakterize edilmiştir (134,135).

mTORC1'in aktivitesi azaldığında PRAS40 ve DEPTOR, mTORC1 kompleksinin inhibisyonuna etki eden komplekse dahil olmaktadır. PRAS40'in, substrat bağlanma aşamasının direkt bir inhibitörü olarak işlev göerek mTORC1 kinazın aktivitesini düzenlediği öne sürülmüştür. mTORC1 kinazın aktifleşmesi ile mTORC1, PRAS40 ve DEPTOR'u doğrudan fosforile eder, bu da mTORC1 ile PRAS40 ve DEPTOR'un fiziksel etkileşimini azaltarak mTORC1 sinyalinin daha aktif hale getirmektedir (136). mTORC2 bir çoğu mTORC1 ve mTORC2 için ortak olan yedi farklı protein içermektedir. Bunlar: mTOR, mTOR'un rapamisine etkileşimi olmayan parçası (Rictor); memelilerde moleküler stres ile aktive olan protein kinaz etkileşimli protein (mSIN1); Rictor-1 ile olduğu belirlenen protein (Protor-1 ve Protor-2); mLST8; ve DEPTOR'dur (137,138). Rictor ve mSIN1'in birbirini stabilize edebildiğini ve mTORC2'nin yapısal temelini oluşturduğuna dair bazı kanıtlar bulunmuştur (125). DEPTOR, mTORC1'deki rolüne benzer şekilde, mTORC2 aktivitesini negatif olarak düzenlemektedir. DEPTOR, mTORC2'nin şu ana kadar tespit edilmiş tek endojen inhibitörü olarak bilinmektedir. DEPTOR burada DEPt olarak bilinen bir DEP (Dishevelled, Egl-10, ve Pleckstrin) N-terminal bölgesi ve PDZ (postsinaptik yoğunluk 95, diskslarge, zonula okludens-1) adı verilen bir c terminal bölgesi içeren 46kDa 'luk bir protein olarak bilinmektedir. PDZ alanının mTOR ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (135). DEP bölgesinin ise DEPt fosfatidik asit (PA) bağlanmasına aracılık ettiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (139). DEPt ve PDZ alanını bağlayan ortak bir fosforilasyon bölgesi ortaya çıkarılmıştır. mTOR bu bölgeyi fosforile eder, bu durum SCF β TrCP E3 Ubiquitin ligaz tarafından DEPTOR'un fosforilasyonu ve Ubikitinasyonu (Ubikutin ekleyerek proteinin yapısını değiştirme) yoluyla degradasyonuna neden olmaktadır (140,141). DEPTOR bozulması sırayla, mTORC1'in aktivasyonuna ve mTOR'un negatif geri besleme mekanizması ile mTORC2'nin inaktivasyonuna neden olmuştur. OTU alanı içeren Ubikuitin aldehit bağlayıcı protein 1(OTUB1), DEPTOR'u deubikitinasyon (Ubikitinasyon yönteminin zıttı) yöntemiyle bu sürece karşı koymuştur (142) (Şekil-4.5.1.1).

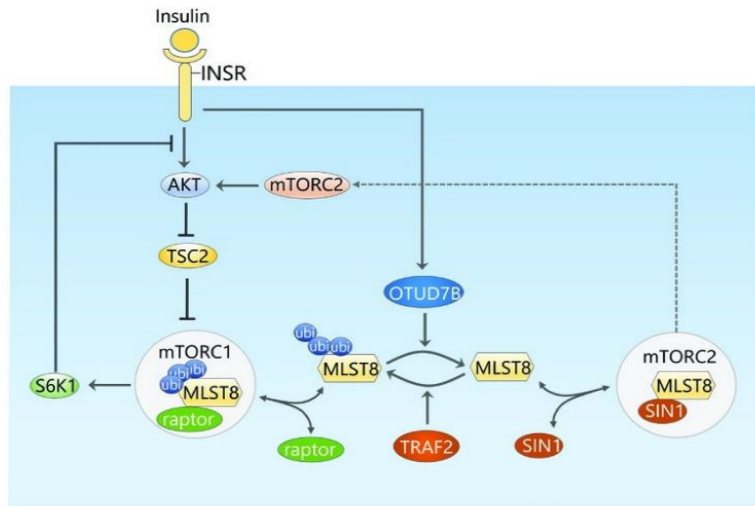


Şekil 4.5.1.1: mTORC1 ve mTORC2 kompleksleri, mTORC1, amino asitlere, strese, oksijene, enerjiye, büyüme faktörlerine ve rapamisine duyarlı olmuştur. Anabolik ve katabolik süreçleri indükleyerek ve inhibe ederek hücre büyümesini destekler ayrıca hücre döngüsünün ilerlemesini sağlamıştır. mTORC2, büyüme faktörlerine yanıt vermektedir. Hücre hayatta kalmasını, metabolizmasını ve hücre iskeletini düzenlemektedir (128).

mTOR aktivitesinin düzenlenmesinin altında yatan moleküler mekanizmalardan bir diğeri GbetaL olarak da bilinen SEC13 protein 8 (mLST8) ile mTOR arasındaki ilişki olmuştur. mLST8, hem mTORC1 hem de mTORC2'nin ortak bir alt birimidir ve mTOR kinazın aktivasyonu için gerekli olmuştur (143). Bu aktivasyon mTOR–mLST8 kompleksinin yapısı ile ilgili olup, mLST8 mTOR'un aktif bölgesini doğrudan stabilize ederek aktivasyonu sağlamaktadır. mLST8 nakavt fare embriyoları üzerinde yapılan çalışmalarda mLST8 eksikliğinde mTORC2'nin yapısal ve fonksiyonel etkinliğinin azaldığı tespit edilmiştir (144). Ayrıca, mLST8, S6K tarafından fosforile edilen pirimidin sentezinde yer alan çok işlevli bir protein olan CAD gibi diğer hücresel proteinlerle birleşebilmektedir (145).

mLST8 etkisi daha detaylı incelendiğinde TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) E3 ubiquitin ligaz, lizin63'de (k63) MLST8 ubikuitinasyonuna sebep olarak mTORC2 için gerekli olan SIN1 komponentinin etkileşimini bozmaktadır. Ubikuitinasyona uğramış MLST8'i eski hali olan deUbikuitinasyon formuna döndürme işlemi OTU deubiquitinaz 7B (OTUD7B) tarafından gerçekleştirilmiştir. MLST8'in deUbikuitinasyonu sonucu SIN1 ile bağlanma sağlanır bu durum mTORC2 yapısının oluşmasını kolaylaştırırken mTORC1 yapısının oluşumunu azaltmaktadır (146).

MLST8'in çıkarılmasının mTORC1'in aktivitesini etkilemediği ana sübstrat S6K1'in fosforilasyon seviyesi ölçülerek tespit edilmiştir (144). Diğer taraftan MLST8'in raptor-mTOR etkileşimini güçlendirerek mTORC1/2'nin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (143) (Şekil-4.5.1.2).



Şekil 4.5.1.2: MLST8 ubikuitinasyonunun moleküler mekanizması (147).

mTORC1, hücre metabolizması ve büyümesinde merkezi bir düzenleyici olmuştur. mTORC1'in aktivitesi AKT'yi aktive etmektedir. Bu durum lipogenezin aktivitesini sağladığı gösterilmiştir. SREBP1'in olgun formu hücrede birikince SREBP genlerinin ekspresyonu mTORC1'in inhibitörü rapamisin tarafından bloke edildiği gösterilmiştir. SREBP'nin susturulması mTORC1'i susturmakta, bu durum Akt'ye bağlı lipogenezin bloke etmektedir. Bunun sonucunda hücre boyutundaki artışın azaldığı da gözlenmiştir (115).

mTORC1, hücre büyümesinin desteklenmesinde yer alan birçok süreci düzenlemek için dört ana sinyali (büyüme faktörleri, enerji durumu, oksijen ve amino asitler) birleştirmektedir. mTORC1 aktivitesinin düzenlenmesinde yer alan en önemli sensörlerden biri, TSC1 (hamartin olarak da bilinir) ve TSC2'yi (tuberin olarak da bilinir) içeren bir heterodimer olan tuberoskleroz kompleksi (TSC) olarak bilinmektedir.

TSC1/2, küçük ras ilişkili GTPaz rheb (beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu) için bir GTPaz aktive edici protein (GAP) olarak işlev görmektedir. Rheb in GTP-bağlı aktif formu, mTORC1 ile direkt bir etkileşime girerek mTORC1'in aktivitesini harekete geçirmektedir (134). Rheb'e özgü bir GAP olan TSC1/2, rheb'i etkin olmayan GDP'ye bağlı durumuna dönüştürerek mTORC1 sinyalini negatif olarak düzenlemektedir (132). Büyüme faktörleri, kanonik insülin ve Ras sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla mTORC1'i uyarır. Bu yolların aktivasyonu, TSC2'nin protein kinaz B, (PKB, AKT olarak da bilinir) hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1) ve p90 ribozomal S6 kinaz 1 (RSK1) tarafından fosforilasyonuna neden olmaktadır (148). Bu durum TSC1/2'nin inaktivasyonuna bu sayede mTORC1'in aktivasyonuna yol açmaktadır. Bunlara ek olarak AKT'yi aktive eden büyüme faktörleri, PRAS40'ın mTORC1'den ayrılmasını ve mTORC1'in TSC1/2'den bağımsız fosforilasyonunu teşvik ederek mTORC1'i aktive edebilmektedir (134). İnsülinin yüzey reseptörlerine bağlanması tirozin kinaz aktivitesini, insülin reseptörü substratı 1'in (IRS1) aktivasyonunu ve fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat üretimine neden olmaktadır. Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat'ın üretimi PI3K'yi aktive eder ve AKT'nin aktivasyonunu sağlamaktadır. Aktif olan AKT, PI3K ile birleşerek PI3K-AKT kompleksini oluşturmaktadır. mTORC1'in aktivasyonu PI3K-AKT birleşimini engelleyerek kompleksin aktivasyonunu inhibe etmektedir. mTORC1'in S6K1'i aktive etmesi IRS1'in fosforilasyonunu sağlamaktadır. Fosforile olan IRS1'in kararlılığı azalmıştır (149). S6K1'e bağlı negatif geri besleme döngüsü olarak nitelendirilen bu oto-düzenleyici yolun, hem metabolik hastalıklar hem de tümörögenez için derin etkileri olduğu gösterilmiştir (150). Mitokondriyal metabolizma ve biyogenez, mTORC1 tarafından düzenlenmektedir. mTORC1'in rapamisin tarafından inhibisyonu, mitokondriyal membran potansiyelini, oksijen tüketimini ve hücre ATP seviyelerini düşürür ve mitokondriyal fosfoproteomunu değiştirmektedir (151). Yapılan çalışmalarda mitokondriyal DNA kopya sayısının ve

protein kodlayan birçok genin ifadesinin rapamisin tarafından baskılandığı gözlenmiştir. Rapamisinin baskılanması mTORC1'in aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu aktivasyon mitokondri metabolizmasında rapamisinin yaptığı etkiyi tersine çevirmektedir (152). Ek olarak, fare iskelet kasındaki raptor'un koşullu olarak baskılanması, mitokondriyal biyogenezde yer alan genlerin ekspresyonunu azaltmaktadır (153). Cunningham ve ark., mTORC1'in, mitokondriyal biyogenez ve oksidatif metabolizmada önemli bir rol oynayan bir nükleer kofaktör olan PPAR γ koaktivatör 1'in (PGC1- α) transkripsiyonel aktivitesinin, fiziksel etkileşimini başka bir transkripsiyon faktörü, yani yin-yang 1 (YY1) ile doğrudan değiştirerek kontrol ettiğini göstermiştir (154). Hücre içi enerji durumunun ana sensörü olan AMP, aktive olan protein kinaz (AMPK) aracılığıyla mTORC1'e iletilmiştir (155). Enerji tükenmesine yanıt olarak (düşük ATP:ADP oranı), AMPK aktive olur ve TSC2'nin GAP aktivitesini rheb yoluyla artırarak fosforile eder bu sayede mTORC1'in aktivasyonunu azaltmış olmaktadır (156). Ayrıca enerji tükenmesine yanıt olarak, AMPK, raptor'u doğrudan fosforile ederek mTORC1 aktivitesini azaltabilmektedir (157). Oksijen seviyeleri, mTORC1 aktivitesini birden fazla yoldan etkilemektedir (158). Az seviyede oksijen eksikliği olduğunda, ATP seviyelerindeki azalma, önceki bölümde açıklandığı gibi TSC1/2 aktivasyonunu sağlar ve mTORC1'i inaktive eden AMPK'yi aktive etmiştir (159,160). Oksijen eksikliği ayrıca DNA hasar yanıtı 1'in (REDD1) transkripsiyonel regülasyonu yoluyla TSC1/2'yi aktive edebilmektedir (161,162). REDD1 ile büyüme faktörleri arasında bir ilişki keşfedilmiştir. REDD1'in, büyüme faktörleri ile 14-3-3 proteinleri arasındaki ilişkisi sonucu TSC2'nin serbest kalması sonucu mTORC1 sinyali bloke olmaktadır (163).

REDD1'in TSC2 ve 14-3-3 etkileşimini bozarak mTORC1 sinyalini azaltma yeteneğinin, oksijenin yetersizliğinde enerji tüketen süreçleri sınırlamak için evrimleştiği düşünülmektedir. Ek olarak, promyelositik lösemi (PML) ve BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa protein etkileşimli protein 3 (BNIP3), mTOR ile pozitif düzenleyicisi rheb arasındaki etkileşimi bozarak hipoksi sırasında mTORC1 sinyalini azaltmaktadır (164,165). Amino asitler, mTORC1'i pozitif olarak düzenleyen güçlü bir sinyal meydana getirmektedir. mTORC1'in amino asitler tarafından aktivasyonunun, TSC1/2'den bağımsız olduğu bilinmektedir, çünkü mTORC1 yolu, TSC1 veya TSC2'den yoksun hücrelerde amino asit yoksunluğuna duyarlı olduğu gösterilmiştir. Dört küçük GTPaz ailesi olan Rag proteinlerinin,

mTORC1 ile amino aside duyarlı bir şekilde etkileşime girdiği ve mTORC1 yolunun amino asitler tarafından aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Amino asitlerin mevcudiyetinde, Rag proteinleri Raptor'a bağlanır ve mTORC1'in sitoplazmada aktivatörü rheb'i içeren bir perinükleer bölgeye yeniden lokalizasyonunu teşvik etmiştir (166). Ortamda amino asit eksikliği ile mTORC1 ve rheb'in fiziksel ayrışması gerçekleşir. Bu ayrılma hücre büyüme faktörleri olan rheb aktivatörlerinin, amino asitlerin yokluğunda mTORC1 sinyalini neden uyaramadığını açıklamaktadır. Yukarıda açıklanan anahtar sinyallere ek olarak, genotoksik stres, inflamasyon, Wnt ligandı ve PA gibi diğer hücrel durum ve sinyallerin hepsinin mTORC1 sinyalini düzenlediği gösterilmiştir. Genotoksik stres, birçok mekanizma yoluyla mTORC1 aktivitesini azaltmaktadır. DNA hasarına yanıt olarak p53'ün aktivasyonu, AMPK'yi bilinmeyen bir süreç yoluyla hızla aktive eder, AMPK fosforile olur ve böylece TSC2'yi aktive etmektedir. Ek olarak P53 geni mTORC1'i, PTEN ve TSC2'nin transkripsiyonunu artırarak negatif kontrol etmektedir (167).

İnflamatuvar araçlar ayrıca TSC1/2 kompleksi aracılığıyla mTORC1'e sinyal vermektedir. TNF α gibi proinflamatuvar sitokinler, TSC1 ile fiziksel olarak etkileşime giren ve onu inaktive eden IK kinaz- β 'yi (IKK β) aktive ederek mTORC1 aktivasyonuna yol açmaktadır (168). Wnt sinyali TSC1/2'nin inaktivasyonu yoluyla mTORC1 aktivitesini arttırmıştır. Wnt yolunun uyarılması, TSC2'yi doğrudan fosforile ederek TSC1/2 aktivitesini destekleyen bir kinaz olan GSK3'ü inhibe etmiştir (169). Son olarak, PA, mTORC1'in başka bir aktivatörü olarak tanımlanmıştır. Birçok grup, eksojen PA veya fosfolipaz D1 (PLD1) ve PLD2 gibi PA üreten enzimlerin aşırı ekspresyonunun mTORC1 sinyalini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir (170). Yakın tarihli bir çalışma, PA'nın mTOR komplekslerinin birleşmesini kolaylaştırarak veya kompleksleri stabilize ederek mTOR sinyalini etkilediğini göstermektedir (171). Hücrenin hayatta kalması, metabolizması ve proliferasyonu, çeşitli efektörlerin fosforilasyonu yoluyla bu süreçleri pozitif olarak düzenleyen AKT'nin aktivasyon durumuna büyük ölçüde bağlı olmuştur. AKT'nin tam aktivasyonu, iki bölgede fosforilasyonunu gerektirir: fosfoinositide bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından Ser308 ve yıllarca tanımlanamayan bir kinaz tarafından Ser473, ancak 2005 yılında arafından mTORC2'de olduğu gösterilmiştir (172). Daha sonra yapılan çalışmalarda mTORC2 komponentlerinin yapıdan çıkarılması Ser473'te AKT'nin fosforilasyonunu AKT substratlarının

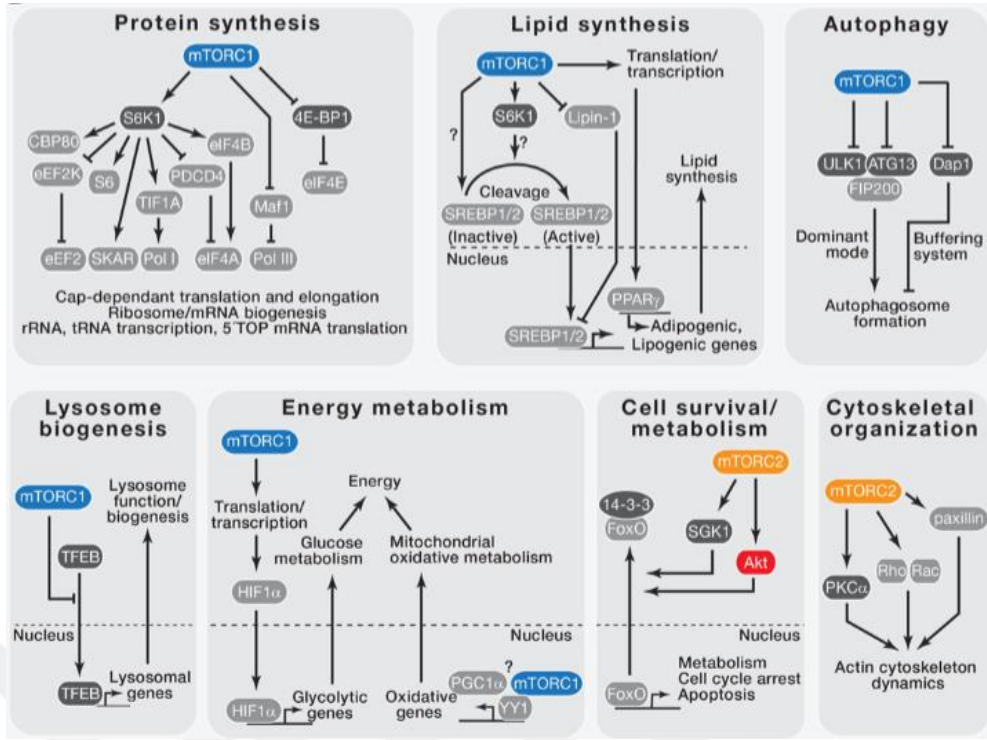
tümünün olmasa da bazılarının aşağı akış fosforilasyonunu spesifik olarak bloke ettiğini gözlemlemiştir (138,144). AKT mTORC2'nin tükenmesinin ardından inhibisyona uğramıştır. Bu durum stres direnci, metabolizma, hücre döngüsünün durması ve apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyonunu kontrol eden çatal başlı kutu proteini O1 (FoxO1) ve FoxO3a transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu azaltarak bu proteinleri aktive etmiştir (173). Bu durumun aksine, TSC2 ve GSK3'ün fosforilasyon durumu, mTORC2 inaktivasyonundan etkilenmez. Son zamanlarda, AKT ile homolojiyi paylaşan serum ve glukokortikoid kaynaklı protein kinaz 1'in de (SGK1) mTORC2 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (174).

mTORC2 inhibe edildiğinde bir bazal aktiviteyi koruyan AKT'nin aksine, SGK1 aktivitesi bu koşullar altında tamamen iptal edilmiştir. SGK1 ve AKT, FoxO1 ve FoxO3a'yı birlikte fosforile ettiğinden, mTORC2 eksikliği olan hücrelerde SGK1 aktivitesinin olmamasının, FoxO1 ve FoxO3a'nın fosforilasyonunun inhibisyonundan sorumlu olduğu gözlenmektedir. mTORC2 hücre iskeleti organizasyonunu düzenlemektedir. Birçok araştırmacı, mTORC2 bileşenlerinin yıkılmasının aktin polimerizasyonunu etkilediğini ve hücre morfolojisini bozduğunu gözlemlemiştir. Bu çalışmalar, mTORC2'nin protein kinaz Ca (PKCa) fosforilasyonunu, paxillinin fosforilasyonunu ve fokal adezyonlara yeniden yerleşmesini sağlamaktadır. Bu yerleşme ile RhoA ve Rac1'in GTP yüklemesini teşvik ederek mTORC2'nin aktin hücre iskeletini kontrol ettiği düşünülmektedir (175).

mTORC2'nin bu süreçleri düzenlediği moleküler mekanizma henüz belirlenmemiştir. mTORC2 aktivasyonuna yol açan sinyal yolları iyi tanımlanmamıştır. Büyüme faktörleri, Ser473'te mTORC2 kinaz aktivitesini ve AKT fosforilasyonunu arttırdığından, bu yolu düzenlemek için makul bir sinyal olarak kabul edilmektedir (129). Büyüme faktörlerinin etkisi ile AKT, PtdIns (3,4,5) P3'ün pleckstrin homoloji (PH) bölgesine bağlanması yoluyla hücre zarında fosforile edilmektedir. Bu koşullar altında, PDK1 ayrıca PH alanı aracılığıyla membrana alınır ve AKT'yi Ser308'de fosforile etmektedir (176). İlginç bir şekilde, mTORC2 bileşeni mSIN1, C-terminalinde bir PH alanına sahiptir, bu da mSIN1'in mTORC2'nin membrana translokasyonunu ve AKT'nin Ser473'te fosforilasyonunu destekleyebileceğini düşündürmektedir. Bu modeli desteklemek ve mTORC2'nin

düzenlenmesinde rol oynayan diğer hücrel sinyalleri belirlemek için ek çalışmalara ihtiyaç olmaktadır.

Yaşlanma, yaşa bağlı olarak ortaya çıkan fonksiyonel azalma olarak tanımlanabilmektedir. Artan yaş ile birlikte nörodejeneratif hastalıklar (örn. Parkinson hastalığı [PD] ve Alzheimer hastalığı [AD]), kanser ve T2DM gibi birçok hastalık ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıkların bazılarında mTOR hiperfonksiyonu gözlenmiştir (177). mTOR çeşitli mekanizmaları aktif ya da inaktif ederek bu hastalıkların ilerlemesine neden olmaktadır. Bu mekanizmalar proteaz kaybı, insülin/PI3K/Akt sinyal yolu, büyüme faktörlerine ve besinlere yanıtlarda düzensizleşme, mitokondriyal disfonksiyon, hücrel yaşlanma ve kök hücrelerin tükenmesi gibi mekanizmalardır. Proteostaz terimi, hücre içinde uygun proteomu koruyan çeşitli hücrel süreçleri tanımlamaktadır. Proteostaz, olgunlaşmamış proteinlerin ilk sentezini, olgun proteinlerin doğru katlanmasını, taşınmasını, salgılanmasını ve hasarlı proteinlerin parçalanmasını içermektedir. mTORC1 baskılanması proteostaz etkisini artırarak yaşlanmayı yavaşlatmaktadır. mTOR, mitokondriyal fonksiyonları ve mitokondriyal biyogenezi düzenleyerek hücrel enerji metabolizmasının kontrolün de yer almaktadır. Yaşlanma ile mTOR'un hiperaktivasyonu başlar bu durum mitokondri sayısını arttırdığı gibi mitokondriyal fonksiyonlarında bozulmalar meydana getirmektedir. Yaşlanma ile vücudun kalori yakımında azalma olur bu durum kalori kısıtlamasına gidilmesine neden olmaktadır. Kalori kısıtlamasının mTORC1 aktivitesini düşürmesi ve bugüne kadar araştırılan tüm ökaryotlarda yaşam süresini ve sağlığı geliştirmesi şaşırtıcı olmamaktadır. Yaşlanma ile mTORC1 sinyalinde meydana gelen değişimler ile otofajinin azalmasına bu sebeple hücre içi atık maddelerin birikimine ve çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (178) (Şekil-4.5.1.3). Bu çalışmada İleri baba yaşının infertilite üzerine etkisinin moleküler mekanizmalardan önemli bir sinyal yolağı olan mTOR ile ilişkisi incelenmiştir.



Şekil 4.5.1.3: mTORC1 ve mTORC2'nin düzenlediği önemli mekanizmalar (128).

5. MATERYAL VE METOD

5.1. Çalışma Dizaynı

Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20/05/2021 tarihli 510 no'lu kararı ile onaylanmıştır. Çalışmada 40 yaş üstü 20 adet, 40 yaş altı 20 adet olmak üzere toplam 40 adet insan sperm örneği incelenmiştir (179-184).

Azospermi varlığı, sigara ve alkol kullanan hastalar, lökospermi bulguları (> 1 mil / mL lökosit), obezite (BMI >30 kg/m²), endokrin rahatsızlık, hormonal tedavi, üriner enfeksiyon, geçirilmiş ameliyatlar, scrotal ya da batın içi kan akımını etkileyebilecek kitleye sahip kişiler çalışmaya dahil edilmemiştir. Hasta anamnezinde ya da dosya kayıtlarına göre epididimit ya da epididimo-orşit, inmemiş testis öyküsü olan olgular çalışma dışı bırakılmıştır. Tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve yazılı onay formu alınmıştır. Hastaların semen örneklerinden elde edilen veriler gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

5.2. Spermogram

Genç ve ileri yaş hastaların her birinden 1ml semen örnekleri alınmıştır. Bu örnekler en az 2 günlük cinsel perhizden sonra mastürbasyon yoluyla steril bir kaba konulmuştur. Hastadan alınan semen örneğinin ilk olarak hacmi (ml) ve pH değeri ölçülmüştür. Yaklaşık 20 dk'lık likefaksiyon sürecinden sonra 30 dk içerisinde, deneyimli teknisyenler tarafından semen örneklerinde Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre aşağıdaki parametrelerin analizi gerçekleştirilmiştir:

a) Semen hacmi: Hastadan alınan semen örneğinin hacmi (ml) ölçülmüştür.

b) Sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı: Semen örneğinin sıvılaşmış homojenize olması olarak tanımlanan likefiye olmuş semen örneğinden Makler sayma kamarasına 10 µl koyulduktan sonra, faz kontrast mikroskopunda, 20x objektif altında 100 kare sayılarak sperm konsantrasyonu (milyon/ml) ve toplam sperm sayısı (milyon) belirlenmiştir.

c) **Sperm Motilitesi:** Likefiye olmuş semen örneğinden lam üzerine 10 µl koyulduktan sonra, lamel ile kapatılarak faz kontrast mikroskopunda, 40x objektifte ileri ve yerinde hareketli oranı (%) belirlenmiştir. Aşağıdaki formüllerle toplam motilite ve hareketsiz sperm oranları hesaplanmıştır.

"*Toplam motilite (%) = ileri hareketli sperm (%) + yerinde hareketli sperm (%)*"

"*Hareketsiz sperm (%) = 100 – toplam motilite*"

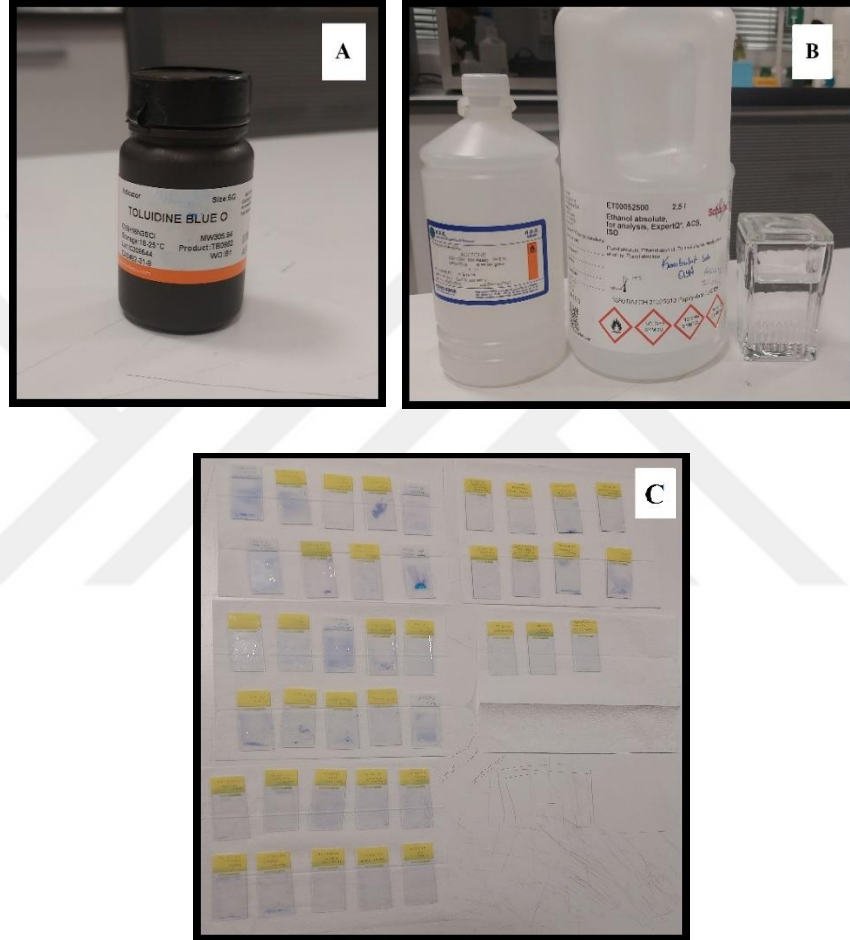
d) **Sperm Morfolojisi:** Likefiye olmuş semen örneğinden lam üzerine 10 µl koyulduktan sonra, lamel ile 45° açı ile yayma "smear" hazırlanmıştır. Havada kurutulan lam, Diff-3 boyama kitinin fiksatifinde 15 saniye bekletilerek fikse edildikten sonra Diff-3 boyama çözeltilerinde sırasıyla 10'ar saniye bekletilip preparat distile su ile yıkandı ve havada kurutulmuştur. 100x objektif altında immersiyon yağı kullanılarak en az 100 sperm sayıldı ve 'Kruger's strict criteria' kurallarına göre normal morfoloji oranı (%) belirlenmiştir.

e) **Semen Örneklerinin Hazırlığı:** Hastadan alınan semen örneğinin 1 ml'si sperm yıkama yapıldıktan sonra konsantrasyon, vitalite, morfoloji ve sperm dışı hücre analizi için her birinden 10'ar µL olacak şekilde ayrılmıştır. Geriye kalan semen örneği önce vortekslenip 30 µL'si sperm DNA fragmentasyonu analizi için eppendorf tüpe konulup -20°C'de muhafaza edilmiştir. Kalanı +4°C'de, 3500 rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Supernatant TAS-TOS analizi için ayrılmıştır ve -20°C'de muhafaza edilmiştir. Pelet, kalan süpernatantta çözüldü ve sperm kromatin yapı analizi (Toluidine Blue boyama), mTOR proteinin immünohisto kimyasal analizi için her lam üzerine 10 µL olacak şekilde sperm yayma işlemi yapılmıştır.

5.3. Sperm Kromatin Yapısının Gösterilmesi

Sperm kromatin yapısının gösterilmesinde toluidin blue boyası kullanılmıştır (Şekil 5.3.1.A). Toluidin blue boyası kromatin hasarı sonucu açığa çıkan DNA fosfat grupları ve kalıntılara yüksek afinite göstererek kromatin kondensasyon durumunu ve DNA fragmentasyonunu hakkında bilgi vermiştir. Hava ile kurutulmuş sperm yayma örnekleri 4 °C'de %96'lık etanol-aseton içerisinde 1 saat fikse edilmiştir

(Şekil 5.3.1.B). Preparatlar 0.1 N HCl içerisinde hidroliz edildikten sonra distile su ile yıkanmıştır. Ardından preparatlar 5 dk %0,05 Toluidin Blue boyası ile boyanmıştır. Işık mikroskobunda 40x objektif altında, soluk mavi sperm hücreleri boyanmamış, koyu mavi ya da mor spermler boyanmış olarak değerlendirilmiştir. Her preparatta en az 100 hücre sayılmış ve boyanan spermlerin yüzdesi kromatin hasarı oranı olarak sunulmuştur (Şekil 5.3.1.C).



Resim 5.3.1: Toluidin blue basamakları.

5.3.1. Solüsyon Hazırlığı

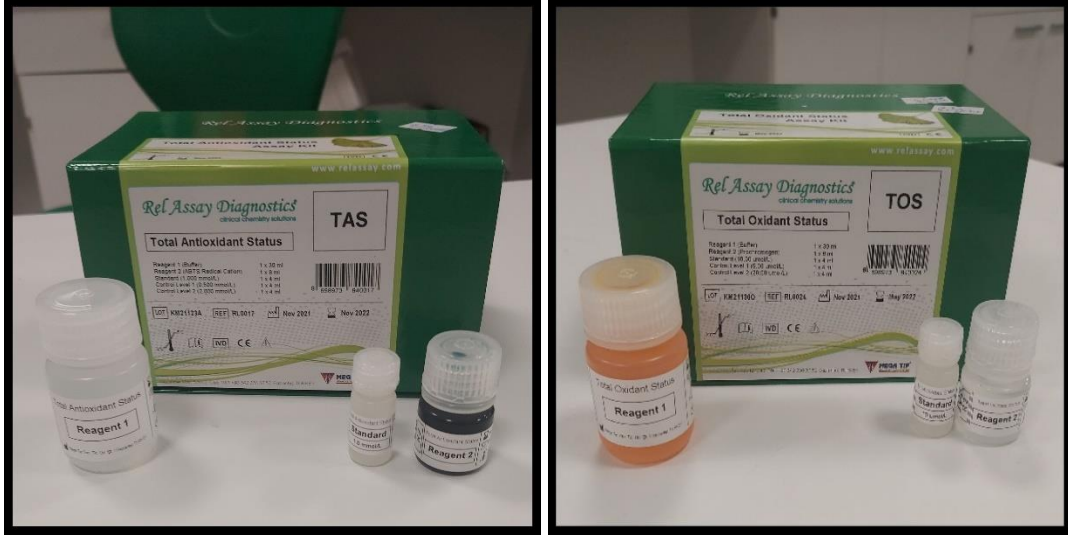
500 mL'lik yapılan hazırlıkta Çeker ocağın içinde 125 mL distile suyun üzerine %37'lik HCl'den 4,106 mL eklenmiştir. Karışım distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

5.4. Oksidatif Stres Analizi

Olguların total oksidan ve total antioksidan seviyeleri Rel Assay TOS-TAS Kit (Sigma-Aldrich) ile analiz edilmiş (Şekil 5.5.1). Oksidatif Stress İndeksi (OSi) = $TAS \div (TOS \times 10)$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

a) Total Oksidan Seviyesi (TOS): Analizlerde ticari olarak satılan “Rel Assay TOS Kit (Sigma-Aldrich)” kitinin protokolü takip edilmiş (Şekil 5.5.1). Semen örnekleri 2500 rpm’de 10 dk santrifüje edilmiş. Sonrasında 7,5 µl semen örnekleri üzerine 50 µl Assay Buffer (Reagent 1) solüsyonu eklenmiş. Standart 1 olarak 7,5 µl double distile su kullanılmıştır. Başlangıç absorbansı spektrofotometre (iMAX) ile 530 nm’de ölçülmüş. Daha sonra tüm örnekler ve standartlar üzerine 2,5 µl Prochromogen Solution (Reagent 2) solüsyonu eklenmiş. Örnekler inkübasyon için 37° C etüvde 10 dk bekletildikten sonra, spektrofotometrede 530 nm’de ikinci absorbans değeri ölçülmüştür.

b) Total Antioksidan Seviyesi (TAS): Analizlerde ticari olarak satılan “Rel Assay TAS Kit (Sigma-Aldrich)” kitinin protokolü takip edilmiştir (Şekil 5.5.1). 2500 rpm’de 10 dk santrifüje edilen semen örneklerinden 3 µl kullanılmış, üzerine 50 µl Assay Buffer (Reagent 1) solüsyonu eklenmiş. Standart 1 olarak 3 µl double distile su, Standart 2 olarak 3 µl 1.0 mmol Trolox Equiv/L kullanıldı. Spektrofotometre (iMAX) ile 660 nm’de başlangıç absorbansı ölçülmüştür. İlk ölçüm sonrasında tüm örnekler ve standartlar üzerine 7,5 µl Colored ABST Radical solüsyonu eklenerek, 37° C etüvde 10 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında spektrofotometrede 660 nm’de ikinci absorbans değeri ölçülmüştür.

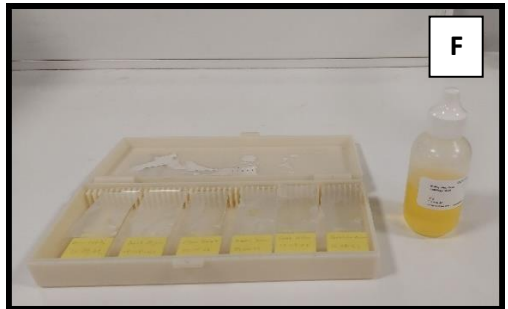
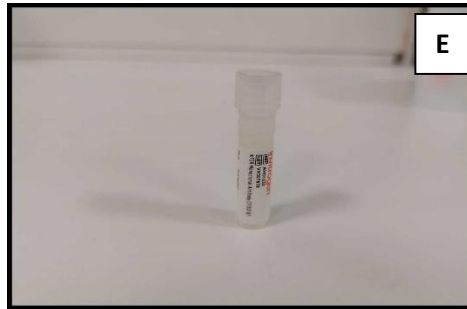
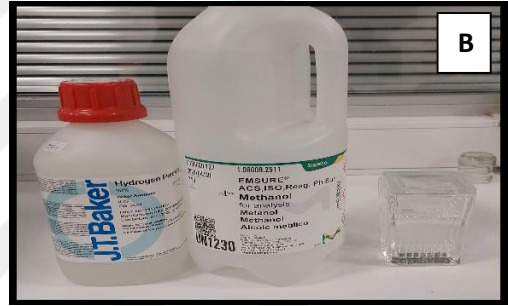


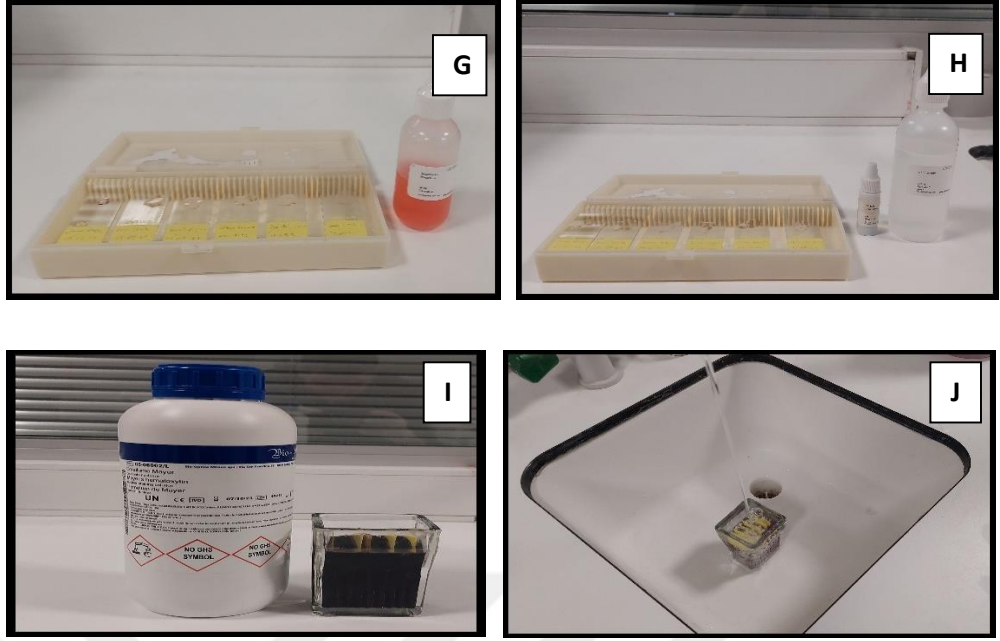
Resim 5.4.1: Oksidatif stres ölçüm kitleri.

5.5. İmmünohistokimya analizi

Hava ile kurutulmuş sperm yayma örnekleri %4'lük paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığında 30 dk fikse edilmiştir (şekil 5.6.1.A). Ardından üç kez 5 dk boyunca PBS (fosfat tampon solüsyonu) ile yıkanmıştır. Endojen peroksidazı inhibe etmek amacıyla preparatlar %3'lük Hidrojen peroksit solüsyonu içerisinde 20 dk, oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve ardından 3 kez 5 dk PBS ile yıkanmıştır (şekil 5.6.1.B). Antijen geri kazanımını gerçekleştirmek amacıyla, 800 watta 20 sn preparatlar Sitrat buffer solüsyonunda inkübe edilmiş (şekil 5.6.1.C) ve sonrasında 200 watt'lık mikrodalga içerisinde 20 dk boyunca kaynatılmıştır (şekil 5.6.1.D). Sonrasında preparatlar 20 dk soğumaya bırakılmıştır. Preparatlar 5'er dk PBS ile üç kez yıkandıktan sonra preparatlara 10 dk protein blocking solüsyonu uygulanmıştır (şekil 5.6.1.E). PBS ile dilüsyonu sağlanan primer antikor mTOR; 1:100 oranında uygulanmıştır ve 1 gece boyunca +4°C'de bekletilmiştir (şekil 5.6.1.F). Ertesi gün PBS ile 3 kez 5 dk yıkanan preparatlara, biotinlenmiş goat anti-polyvalent kiti 10 dk boyunca uygulanmıştır (şekil 5.6.1.G). Bu işlemin ardından da 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından 10 dk streptavidin peroksidaz uygulanmış (şekil 5.6.1.H) ve sonrasında 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanmıştır. İmmünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla 8 dk boyunca

DAB uygulaması yapılmış ve sonrasında 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanmıştır (şekil 5.6.1.I). Zıt boyama için Mayer's hematoksilen ile 2 dk boyunca hücreler boyandıktan sonra preparatlar 10 dk akarsu altında yıkanmıştır (şekil 5.6.1.J). Preparatlar 3 dk boyunca Ksilen içerisinde tutulduktan sonra mounting medium kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Boyanan antikorların ekspresyon analizlerinin değerlendirilmesi ışık mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Antikor ekspresyonları akrozom, baş, stoplazmik droplet, boyun ve kuyruk bölgesinde olmak üzere yoğunluğuna göre 0: boyanma yok, 1: hafif boyanma, 2: orta boyanma, 3: tam boyanma şeklinde skorlanmış ve bu skorlar toplanarak toplam sperm sayısına bölünerek IRS (immün reactivity score) hesaplanmıştır.





Resim 5.5.1: İmmünohistokimyasal analiz basamakları.

5.5.1. Kimyasal hazırlığı

PBS Hazırlığı

80 gr NaCl, 2 gr KCl, 2 gr KH₂PO₄, 21,6 gr Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich, Amerika) 1 litre distile su içerisinde çözüldü ve pH'ı 7,4'e ayarlanmıştır. Elde edilen 10X PBS distile su ile 1X PBS'e seyreltilerek kullanılmıştır.

%4' lük PFA Hazırlığı

40gr pfa 800ml 1x pbs içine konularak yeterince karışması ve çözünmesi için 600C'de manyetik karıştırıcıya konulmuştur. Manyetik karıştırıcıda karışırken çözeltinin berraklaşması ve ph dengesi için NaOH eklemesi yapılmıştır. Berraklık sağlandıktan sonra solüsyon soğumaya bırakılmıştır. Soğuduktan sonra filtreden geçirilmiştir. Ardından 1X PBS ile 1 litreye tamamlanıp pH'ı 6,9 olarak ayarlanmıştır.

%3' lük H2O2 Hazırlığı

Satın alınan Hidrojen Peroksit (Fisher Scientific JT Baker, Amerika) %30'luk olduğu için %3 metanol (Merck 10600925, Almanya) ile seyreltilmiştir.

Citrate Buffer Hazırlığı

Piyasada bulunan Citrate Buffer'ın (Bio Optica 15M-103, İtalya) kullanımı için 1:10 oranında distile su ile dilüe edilmiştir.

Primer Antikor Hazırlığı

Yapılan dilüsyon denemesi sonucunda mTOR antikorunun (mTOR monoclonal antibody, İnvitrogen, Lot: VH307678, USA) 1:100 oranında, kullanılmasına karar verilmiştir. Antikorlar PBS ile dilüe edilmiştir.

DAB Kromojen / Substrat Hazırlığı

Ticari olarak satın alınan DAB Kromojen/Substrat kitinin (Scytek, ACK125, A.B.D.) prosedürüne uygun olarak karışım 1:50 oranında hazırlanmıştır.

5.6. DNA fragmantasyon analizi

5.6.1. SCSA (sperm chromatine structure assay) yöntemi

Semen örneklerindeki DNA fragmantasyonu Halomax® kit (Halotech DNA, Spain) kullanılarak analiz edilmiştir. Semen örnekleri Vortekslendikten sonra örneklerden 1 ml ayrılmıştır. Ayrılan semen örneği 1:1 (1 ml) medium (global/ HEPES LGGH-100, LGGH-20020C) ile muamele edilip, 2500 rpm'de 10 dk santrifüje edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Elde edilen örnekten 25 µl alınıp eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Halomax kit içerisindeki agaroz jel 95°C-100°C'de kaynatılmış olup, sonrasında 37°C etüvde 5 dk bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra 25 µl semen örneğine 50 µl agaroz jel eklenmiştir. Semen-agaroz karışımından 2 µl örnek alınarak kit içerisinde yer alan slide halkaları üzerine yerleştirilip 24 × 24 mm

lamel ile kapatılmış ve 4°C de 5 dk jelin sperm hücrelerine invazyonu için bekletilmiştir. Sonrasında lamalar kaldırılıp lizis solüsyonu ile 5 dk oda sıcaklığında mumamele edilmiştir. Sonrasında slaytlar 5 dk distile su ile yıkanmış ve dehidrasyon işlemi için 2'şer dk %70'lik ve %100'lük alkol serilerinden geçirilip kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan slidelar difquick boyası ile boyanıp, her bir örnek için 100 spermatozoa ışık mikroskopunda 100x büyütme ile sayılmıştır. Normal DNA yapısına sahip spermelerde halo yapısı gözlenmiştir. Halo yapısı gözlenmeyen veya baş yapısı bozulmuş spermeler DNA fragmentasyonuna sahip olarak kabul edilmiştir ve sonuçlar yüzde olarak verilmiştir.

5.6.2. Annexin-v PI boyama yöntemi

Normal canlı hücrelerde PS, hücre zarının sitoplazmik alt yüzeyinde bulunmaktadır. Apoptozun başlaması ile birlikte PS yüzeye çıkar bu sayede FITC ile konjüge edilmiş annexin-V ortamda kalsiyum varlığında PS ile bağ kurmaktadır. Bu bağlanma erken apoptozu bize belli etmektedir. Flow stometri, floresan ya da konfokal mikroskop ile bağlanma belirlenmektedir. Bu çalışmada Annexin V-FITC Apoptoz Tespit kiti kullanılmıştır. Hücreler 1 X PBS ile 1000 rpm de 2 defa santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti 1 X binding buffer içinde $2-5 \times 10^5$ hücre/ml'lik konsantrasyona kadar yeniden süspanse edilmektedir. 195 µl hücre süspanسیونunu temiz bir tüpe aktarılır ve 5 µl Annexin V-FITC eklenip Karıştırılmaktadır. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler 1X Binding Buffer ile yıkandı ve 1000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atıldı. Hücre peleti 190 µl 1X Binding Buffer içinde yeniden süspanse edildi ve 10 µl Propidium Iodide (nihai konsantrasyon = 1 µg/ml) eklenmiştir. Konfokal mikroskopta gözlenmiştir. Propidium Iodide ileri apoptoz evresinde parçalanmış hücre zarından geçerek direkt genoma tutunmuştur. Bu durum ileri evre apoptozun tespitini sağlamaktadır.

5.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (IBM) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler minimum ve maksimum değer, ortalama, standart sapma olarak sunulmuştur. Nicel verilerin dağılımına Shapiro-Wilk testi ile bakılmıştır. Normal dağılım gösteren nicel verilerde grupların karşılaştırılmasında independent student's-t testi

kullanılmıştır. Normal dağılıma uymayan verilerde grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için alfa değeri $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlandırılmıştır.



6. BULGULAR

6.1. Demografik Bilgiler

Çalışmaya dahil edilen olgularda, genç yaş grubundaki bireylerin yaş ortalamaları $29,50 \pm 6,14$ (minimum 17, maksimum 38), ileri baba yasındaki olgularda $45,80 \pm 4,66$ (minimum 40-maksimum 57) olarak belirlenmiştir.

6.2. Sperm Parametreleri

Olguların semen parametreleri (semen hacmi, toplam sperm sayısı, ileri hareketli, yerinde hareketli, hareketsiz sperm, toplam motilite ve normal morfoloji oranları) değerleri (minimum, maksimum ve ortalama \pm standart sapma) Tablo 6.2.1’de de gösterilmiştir.

Olguların semen parametreleri karşılaştırıldığında toplam motilite ve ileri hareketli sperm oranlarının ileri baba yaşındaki bireylerde istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu bulunmuştur ($p=0,015$ ve $p=0,006$) (Şekil 6.2.7, Şekil 6.2.4).

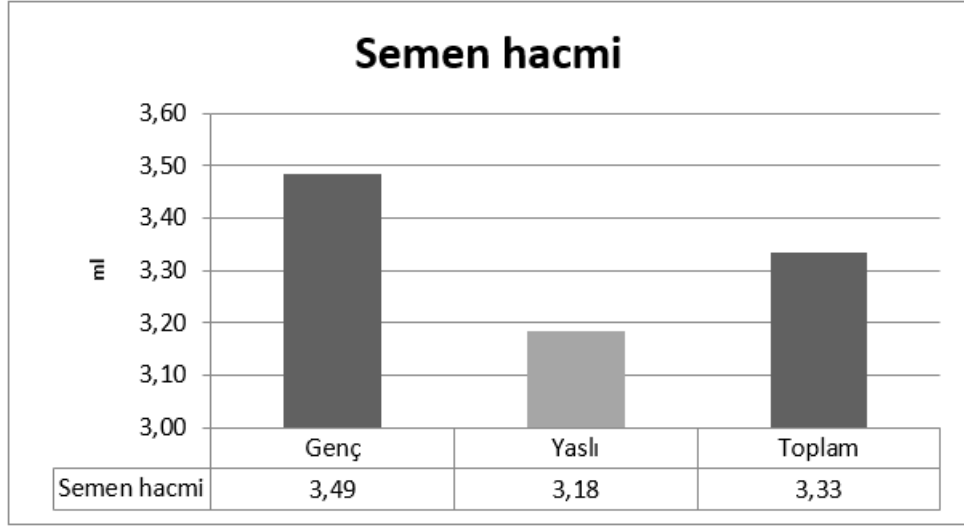
Olguların semen hacmi, yerinde hareketli ve normal morfolojiye sahip sperm oranları ileri baba yasındaki bireylerde daha düşük bulunmuştur, ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde çıkmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 6.2.1, Şekil 6.2.5, Şekil 6.2.8.).

Olguların sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı ve hareketsiz sperm oranları ise ileri baba yaşındaki bireylerde daha yüksek olmasına rağmen, bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde çıkmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 6.2.2).

Tablo 6.2.1: Olguların semen parametreleri ortalama ve standart sapma değerleri

GRUP	Genç (n=20)			Yaşlı (n=20)			p değeri	Toplam (n=40)		
	Min-Max	Ortalama	SD	Min-Max	Ortalama	SD		Min-Max	Ortalama	SD
Semen hacmi (ml)	1,0-7,0	3,49	1,66	0,7-6,0	3,18	1,42	0,540	,7-7,0	3,33	1,53
Sperm konsantrasyonu (x10 ⁶ /ml)	2-79	30,62	23,90	3-79	30,80	22,01	0,981	2-79	30,71	22,68
Toplam sperm sayısı	8,40-276,00	94,07	72,73	2,80-474,00	112,35	119,11	0,989	2,80-474,00	103,21	97,85
Toplam motilite (%)	33-87	53,65	18,74	8-73	38,15	18,47	0,015*	8-87	45,90	19,97
İleri hareketli sperm (%)	0-60	10,00	15,701	0-20	1,35	4,55	0,006*	0-60	5,68	12,22
Yerinde hareketli sperm (%)	20-80	36,90	14,77	0-53	28,50	15,41	0,159	0-80	32,70	15,50
Hareketsiz sperm (%)	0-19	7,25	5,87	0-20	8,10	6,46	0,665	0-20	7,68	6,10
Normal morfoloji (%)	0-4	1,05	1,23	0-2	0,50	0,688	0,173	0-4	,78	1,03

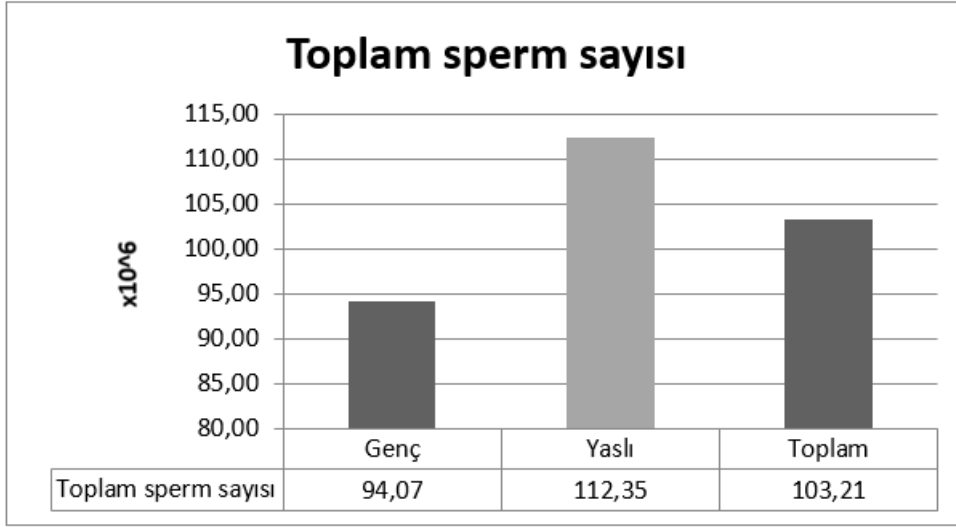
*gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0,05), SD: Standart sapma



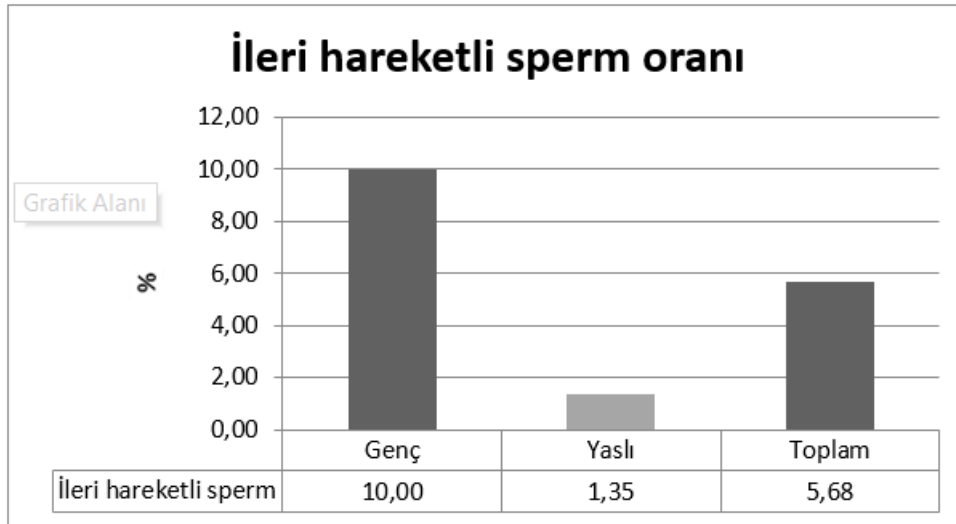
Şekil 6.2.1. Olguların semen hacmi değerleri grafiği



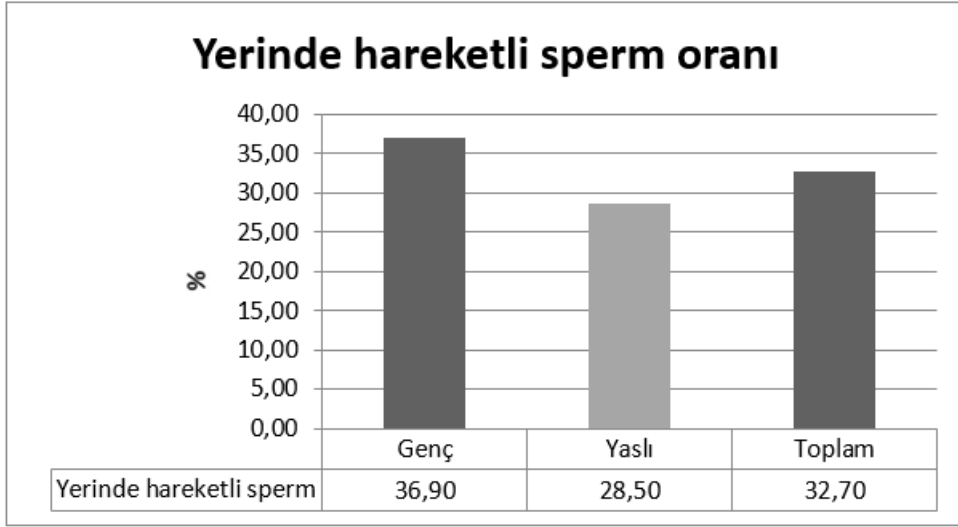
Şekil 6.2.2. Olguların sperm konsantrasyonu değerleri grafiği



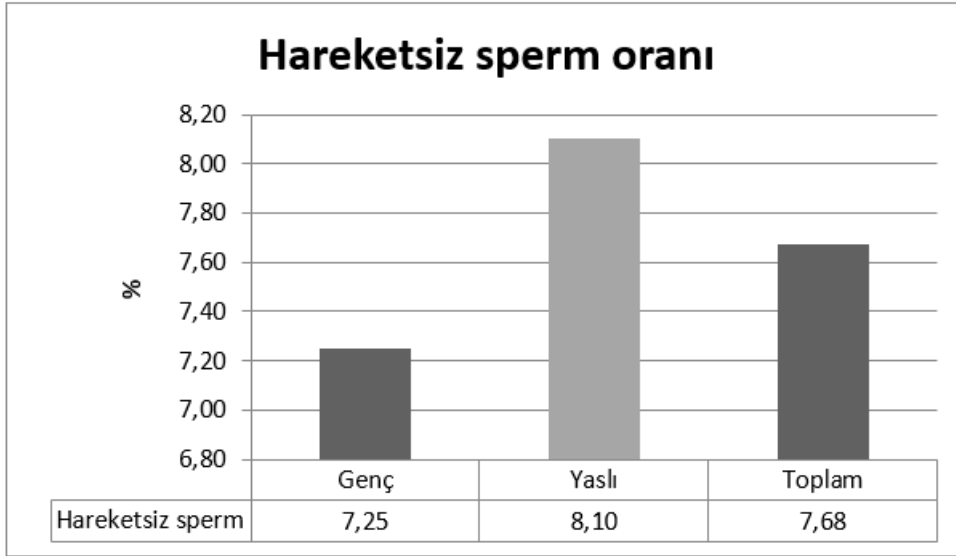
Şekil 6.2.3. Olguların toplam sperm sayısı değerleri grafiği



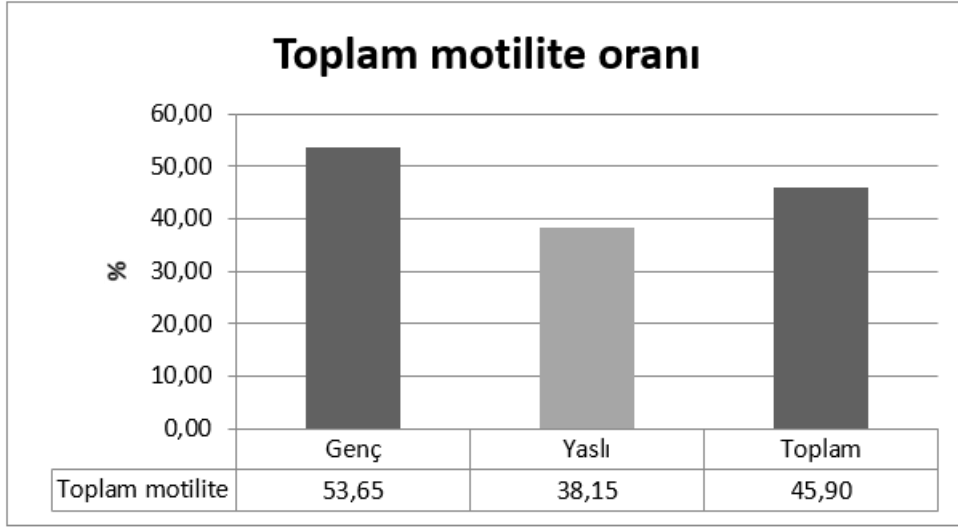
Şekil 6.2.4. Olguların toplam ileri hareketli sperm oranı değerleri grafiği



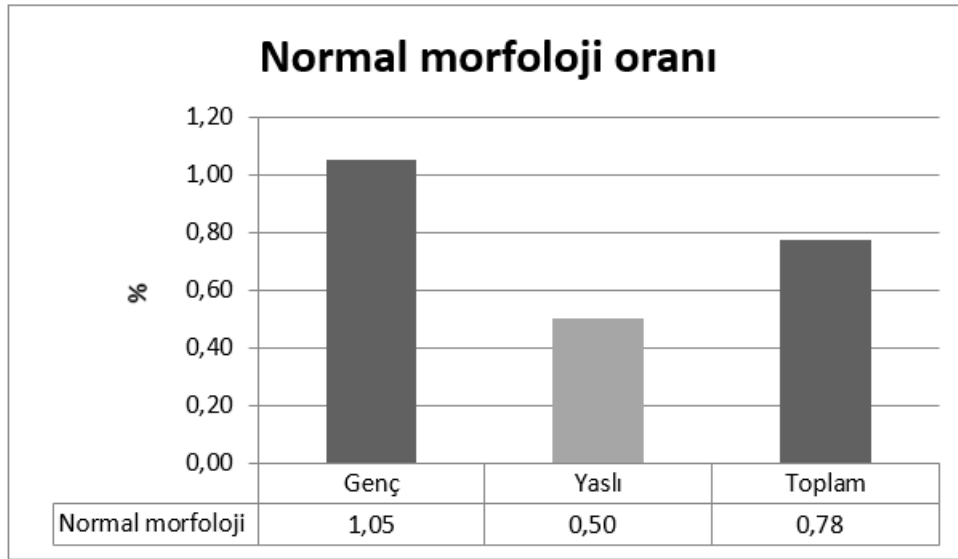
Şekil 6.2.5. Olguların toplam yerinde hareketli sperm oranı değerleri grafiği



Şekil 6.2.6. Olguların toplam hareketsiz sperm oranı değerleri grafiği



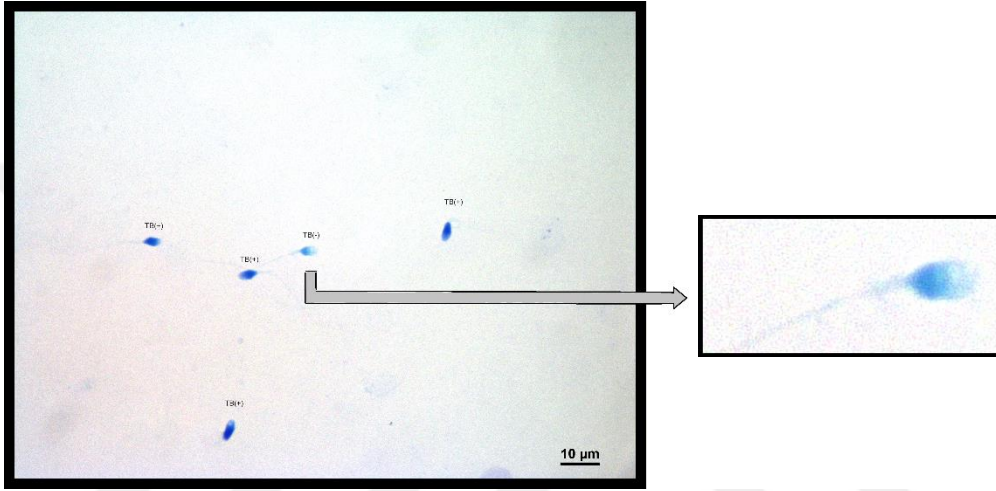
Şekil 6.2.7. Olguların toplam motilite oranı değerleri grafiği



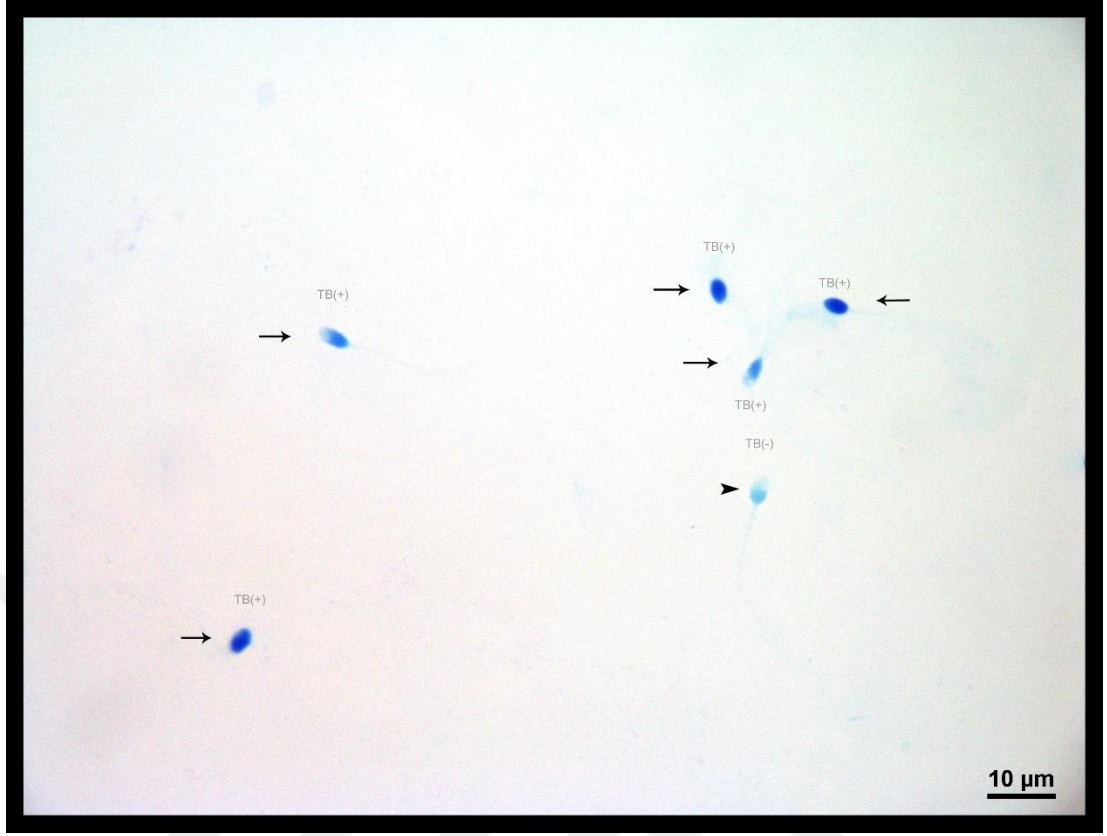
Şekil 6.2.8. Olguların normal morfolojiye sahip sperm oranı değerleri grafiği

6.3. Kromatin Yapısı Analizi

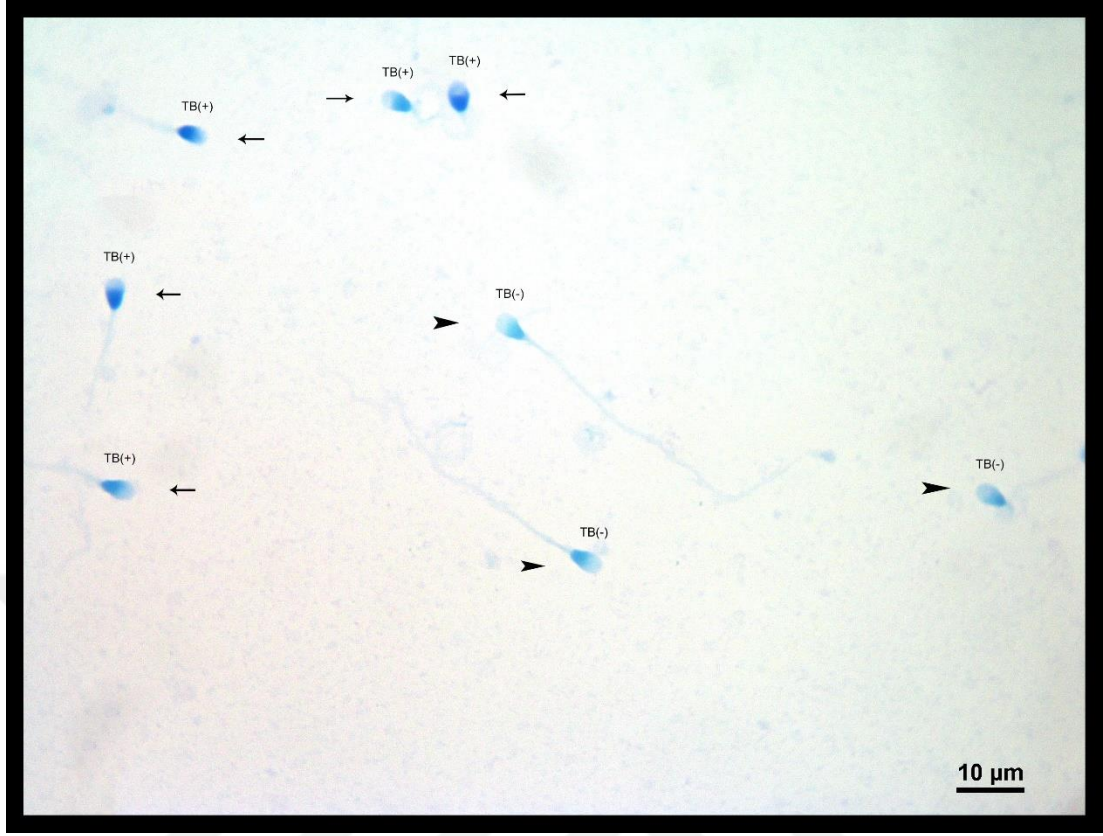
Olguların kromatin yapısı inceleme sonuçları Tablo 6.3.1’de gösterilmiştir. İleri baba yası grubunda bozulmuş kromatine sahip koyu renkli boyanan sperm oranı, genç yastaki bireylerle ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,001$) (Sekil 6.3.1). Olguların kromatin yapı analizi örnekleri Resim 6.3.1, 6.3.2, 6.3.3’te gösterilmiştir.



Resim 6.3.1: Spermelerde kromatin bütünlüğü Toluidin mavisi boyama testi ile gösterilmiştir X100. Kromatin bütünlüğü bozulmuş olan spermeler koyu mavi renk ile boyanmıştır ve TB (+) olarak belirtilmiştir. Normal kromatin yapısına sahip olan spermeler TB (-) olarak belirtilmiştir ve açık mavi renk ile boyanmıştır.



Resim 6.3.2: TB boyama yöntemi ile kromatin analizi X100. Ok başı ile gösterilen açık mavi renge boyanan TB (-) sperm hücresi, ok ile gösterilen sperm kuyruğu koyu mavi boyanan TB(+) sperm hücreleridir (X100).

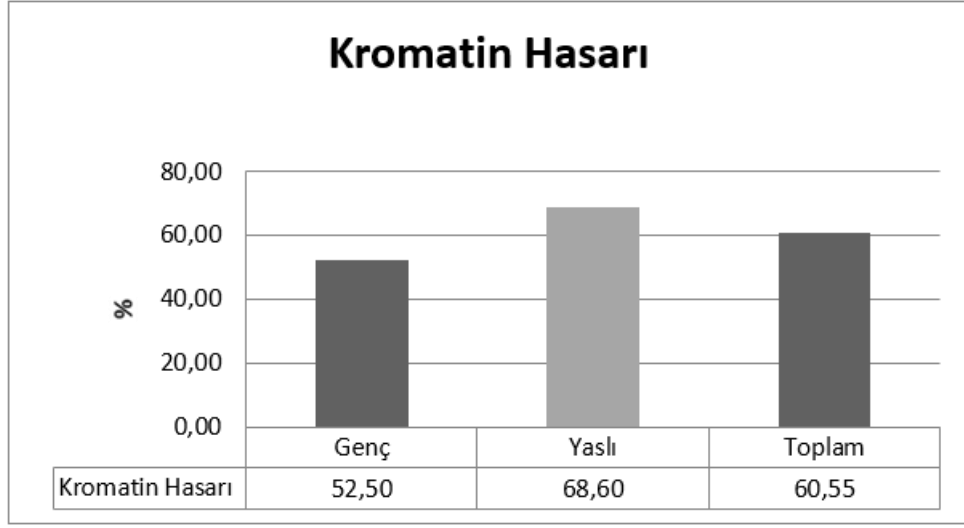


Resim 6.3.3: TB boyama yöntemi ile kromatin analizi X100. Ok ile gösterilenler TB(+) olup kromatin bütünlüğünde hasar tespit edilmiştir. Ok başı ile gösterilen spermeler TB(-) boyanma göstererek kromatin bütünlüğü sağlam olarak gösterilmiştir.

Tablo 6.3.1. Olguların kromatin hasarı ortalama ve standart sapma değerleri

	Genç (n=20)			Yaşlı (n=20)			p değeri	Toplam (n=40)		
	Min-Max	Ortalama	SD	Min-Max	Ortalama	SD		Min-Max	Ortalama	SD
Kromatin Hasarı %	31,0-80,0	52,50	14,53	37,0-88,7	68,60	14,05	0,001	31,0-88,7	60,55	16,29

*gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0,05$), SD: Standart sapma



Şekil 6.3.1. Olguların kromatin hasarı oranı grafiği

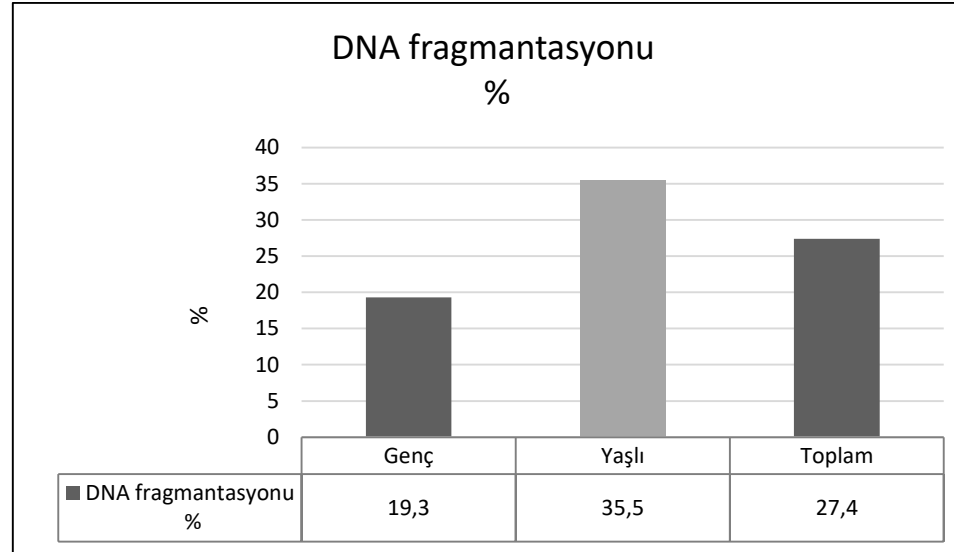
6.4. DNA Fragmantasyonu Oranı

Olguların DNA fragmantasyonu sonuçları Tablo 6.4.1’de gösterilmiştir (Şekil 6.4.1). Olguların DNA fragmantasyon analiz sonuçları karşılaştırıldığında ileri baba yaşındaki bireylerde DNA fragmantasyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,029$). DNA fragmantasyon analizi örneği Resim 6.4.1 ve Resim 6.4.2’de gösterilmiştir. Annexin-V PI yöntemi ile hücrelerde apoptoz tespit edilmiştir. Bulgular Resim 6.4.3’de ve 6.4.4’de gösterilmiştir.

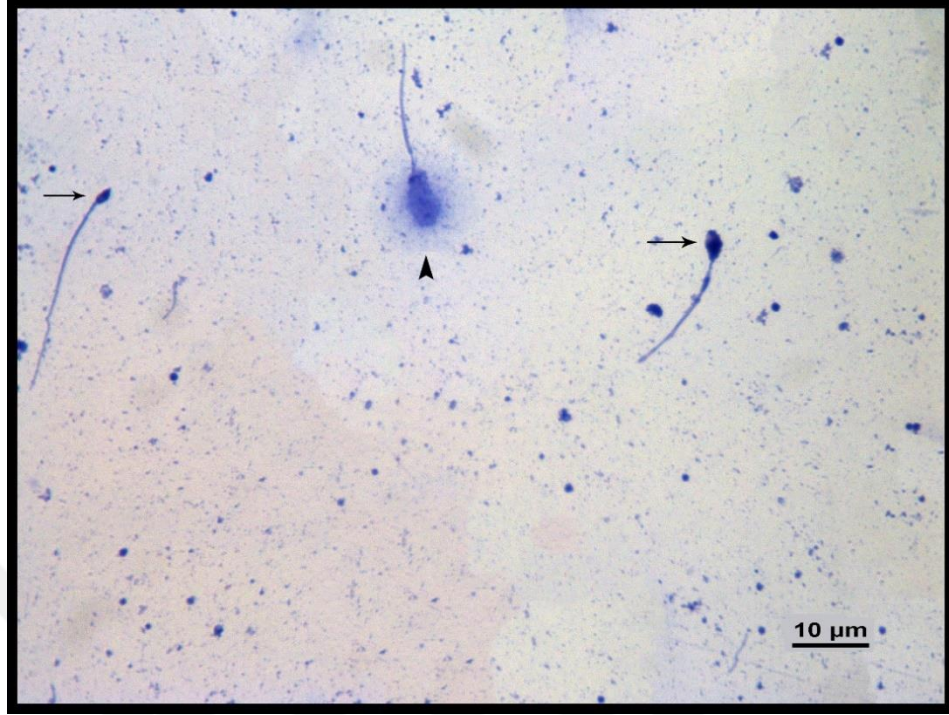
Tablo 6.4.1. Olguların DNA fragmentasyonu ortalama ve standart sapma değerleri

	Genç			Yaşlı			p değeri	Toplam		
	Min-Max	Ortalama	SD	Min-Max	Ortalama	SD		Min-Max	Ortalama	SD
DNA fragmentasyonu %	16-25	19,3	4,03	31-41	35,5	4,43	0,029	16-41	27,4	9,53

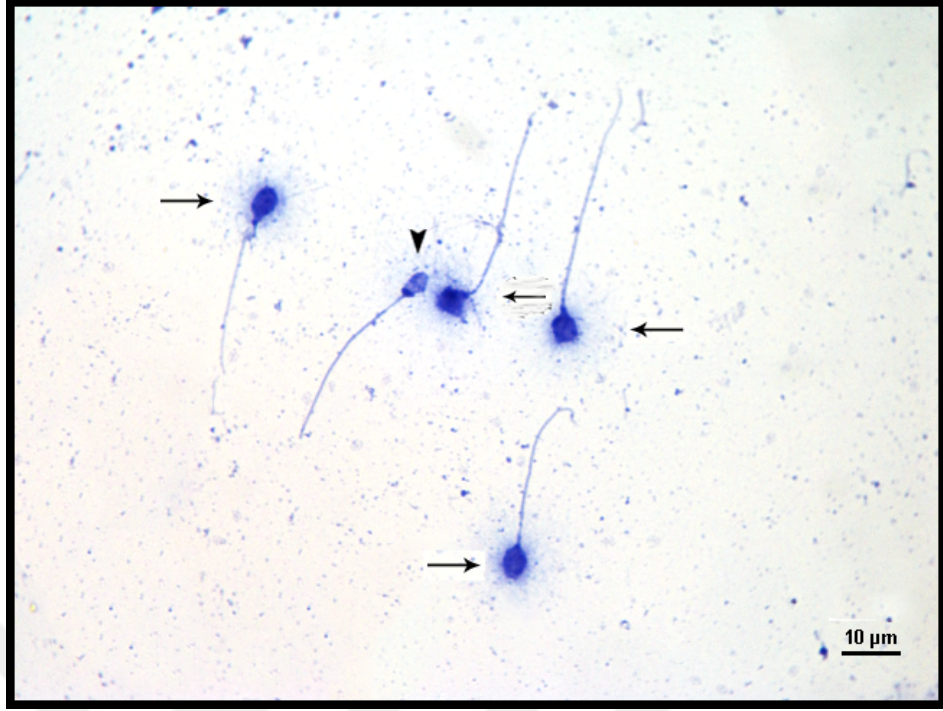
SD: Standart sapma



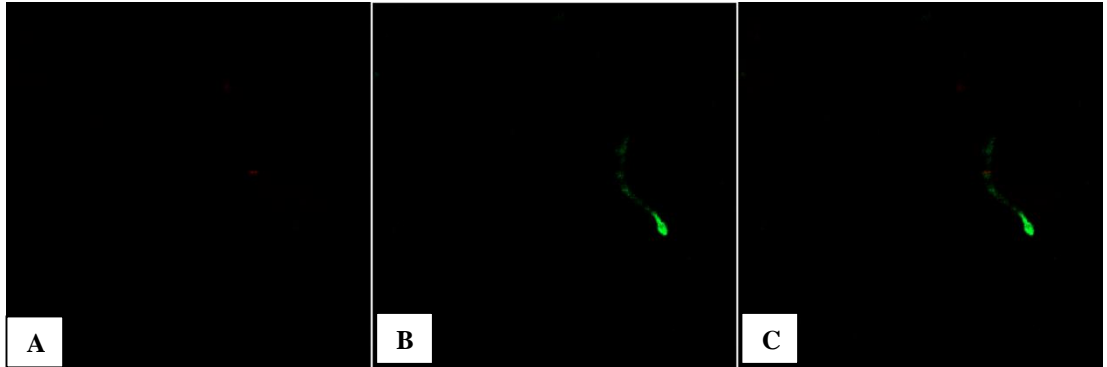
Şekil 6.4.1. Olguların DNA fragmentasyonu grafiği



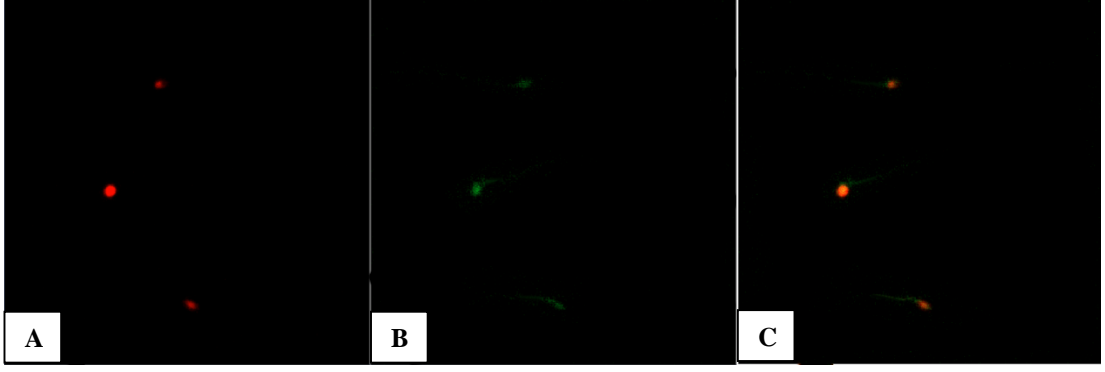
Resim 6.4.1: Olgularda sperm chromatine structure assay yöntemi ile DNA fragmantasyonunun gösterilmesi X100. Ok başı DNA fragmantasyonu olmayan spermi göstermektedir. Oklar DNA fragmantasyonu olan spermleri göstermektedir.



Resim 6.4.2: Olguların DNA fragmentasyonunu analizi örneği: Ok normal halo yapısına sahip sperm başını, ok başı halo yapısı gözlenmeyen DNA fragmentasyonu hasarlı spermi göstermektedir (X100).



Resim 6.4.3: FITCH ile boyanan sperm erken apoptozu göstermektedir. LSM800 konfokal mikroskopta 20X'te çekilmiştir. A:PI boyanma durumunun azlığı gösterilmiştir. B:FITCH boyanma yoğunluğu gösterilmiştir. C: FITCH ile PI boyanmanın eşleşmesi gösterilmiştir.



Resim 6.4.4: FITCH ile PI birlikte gözlenmiş ileri evre apoptoz örneği LSM800 konfokal mikroskop 20X'te çekilmiştir. A: PI boyanma gösterilmiştir. B: FITCH boyanma gösterilmiştir. C: FITCH ve PI boyanma birlikte gösterilmiştir.

6.5. Oksidatif Stres Parametreleri:

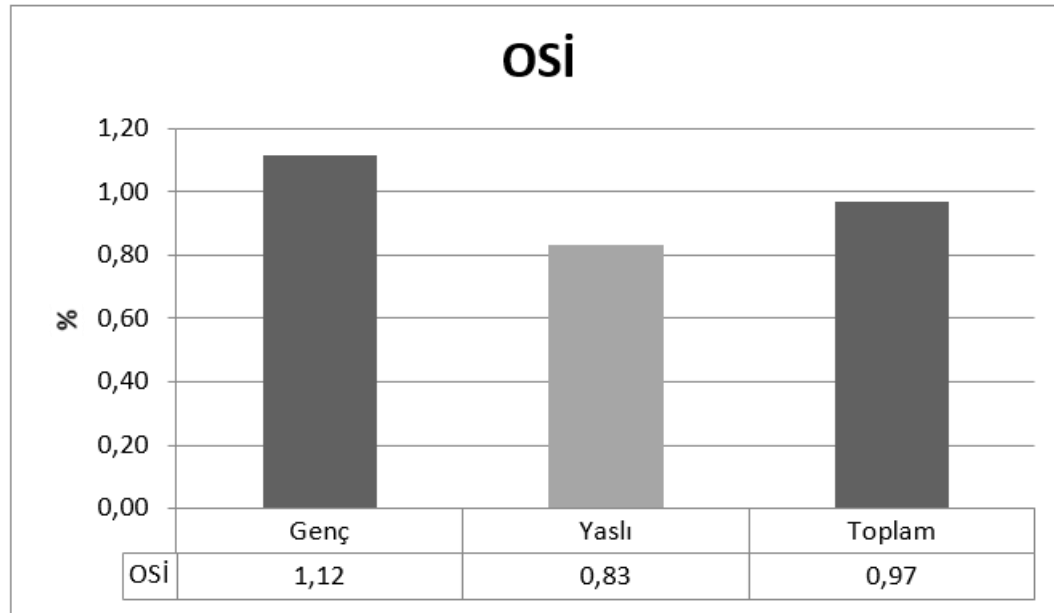
Oksidatif stres indexi (OSİ) değerleri (minimum, maksimum ve ortalama \pm standart sapma) Tablo 6.5.1'de gösterilmiştir. İleri baba yasındaki bireylerde ortalama oksidatif stres indeksi değerleri, genç bireylere göre daha yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p < 0,05$).



Tablo 6.5.1. Oksidatif stress parametreleri ortalama ve standart sapma değerleri

GRUP	Genç (n=19)			Yaşlı (n=20)			p değeri	Toplam (n=39)		
	Min-Max	Ortalama	SD	Min-Max	Ortalama	SD		Min-Max	Ortalama	SD
OSİ	-1,77-6,86	1,12	1,57	-0,96-2,52	0,83	0,64	0,633	-1,77-6,86	0,97	1,18

SD: Standart sapma



Şekil 6.5.1. Olguların oksidatif stres indexi grafiği

6.6. mTOR Yolağı Parametreleri

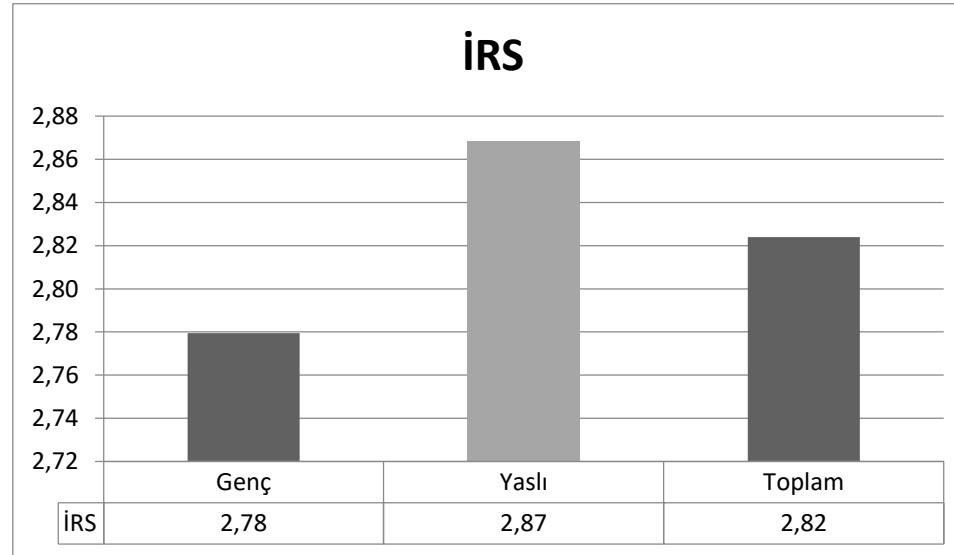
Olguların mTOR protein ekspresyonlarının seviyelerine ait İRS değerleri (minimum, maksimum ve ortalama \pm standart sapma) hesaplanarak Tablo 6.6.1'de gösterilmiştir. Ortalama IRS değerleri ileri baba yasındaki bireylerde daha yüksek olmasına rağmen iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (şekil 6.6.1) ($p < 0,05$). mTOR proteininin ifade seviyeleri Resim 6.6.1, 6.6.2, 6.6.3'de gösterilmiştir.



Tablo 6.6.1. Olguların mTOR proteini ekspresyonlarının ortalama ve standart sapma değerleri

	Genç (n=20)			Yaşlı (n=20)			p değeri	Toplam (n=40)		
	Min-Max	Ortalama	SD	Min-Max	Ortalama	SD		Min-Max	Ortalama	SD
İRS	0,68-6,53	2,78	1,37	1,14-4,02	2,87	0,67	0,409	0,68-6,53	2,82	1,07

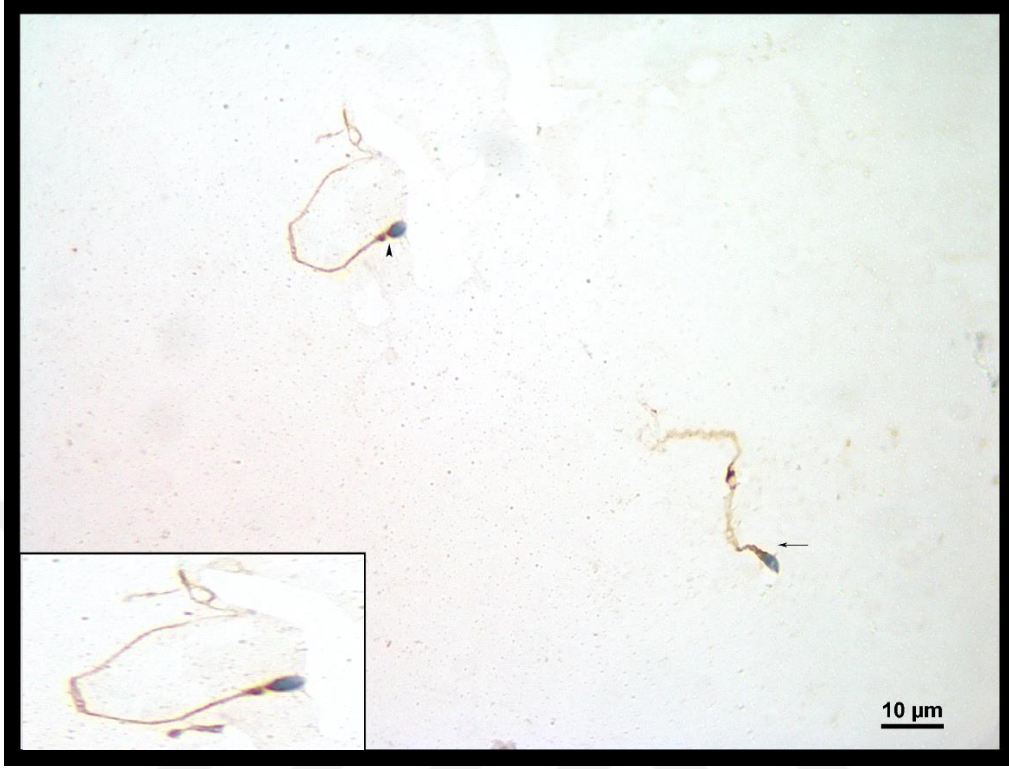
SD: Standart sapma



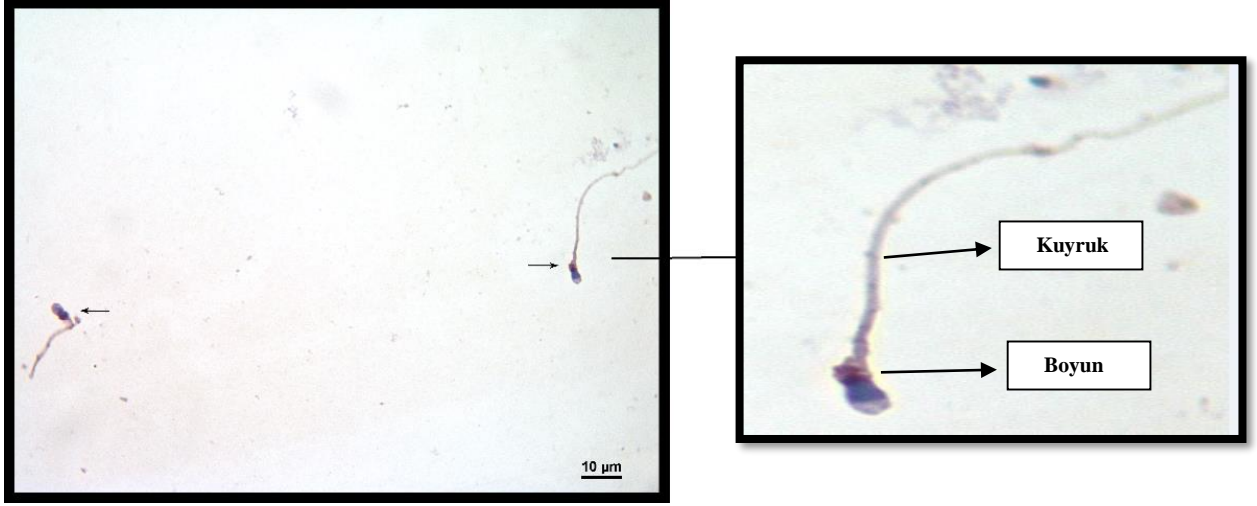
Şekil 6.6.1. Olguların protein ekspresyon değerleri (İRS - İmmünreaktivite skoru)değerleri grafiği



Resim 6.6.1: mTOR proteinin immünohistokimyasal analizi X100. Ok başı boyun bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir. Büyütülmüş örnekte spermın boyun bölgesinde mTOR protein ifadesi gösterilmiştir. Sol alt büyütme ışık mikroskopik görüntü X100 üzerinden yakınlaştırılmıştır.



Resim 6.6.2: mTOR proteinin immünohistokimyasal analizi X100. Oklar boyun ve kuyruk bölgesindeki mTOR protein ekspresyonunu göstermektedir. Büyütülmüş örnekte boyun ve kuyruk bölgesinde mTOR protein ekspersyonu gösterilmiştir. Büyütülmüş örnekte spermin boyun bölgesinde mTOR protein ifadesi gösterilmiştir. Sol alt büyütme ışık mikroskopik görüntü X100 üzerinden yakınlaştırılmıştır.



Resim 6.6.3: mTOR proteinin immünohistokimyasal analizi, kuyruk ve boyun bölgesinin gösterimi X100. Oklar boyun bölgesindeki mTOR protein ekspresyonu göstermektedir. Büyütülmüş resimde boyun ve kuyruk bölgesinde mTOR protein ekspresyonu gösterilmiştir. Oklar ile kuyruk ve boyun bölgesi net bir şekilde gösterilmiştir.

7. TARTIŞMA

Gelişen teknoloji, sosyal yaşam ve ekonomik sebepler toplumlarda çiftlerin daha ileri yaşlarda çocuk sahibi olmasına neden olmaktadır (3,4). Kadınların doğurganlık seviyesinin yaşa bağlı etkisi üzerine çok çalışma olmasına rağmen baba yaşının infertiliteye etkisi üzerine çalışmalar son yıllarda artış göstermektedir (5). Baba yaşının infertiliteye etkisi göz önünde bulundurulduğunda bu mekanizmaların aydınlatılması giderek önem kazanmaktadır (1-5). Yapılan araştırmalarda semen hacmi, sperm konsantrasyonu, morfolojisi, motilitesi ve DNA fragmantasyonu gibi semen parametreleri üzerindeki yaşa dayalı etkiyi araştıran çalışmalar bulunmaktadır (184,185). Ancak baba yaşının insan sperm sinyal yolları üzerindeki etkisi ile ilgili çok az çalışma vardır ve bu moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (66,106).

Çalışmamızda ileri baba yaşının spermlerde kromatin bütünlüğüne, DNA fragmantasyonuna, seminal plazmada belirlenen oksidatif stres parametrelerine ve hücre içi sinyal mekanizmalarını düzenleyen önemli bir sinyal yolağı olan mTOR yolağının merkezi proteini mTOR'un ekspresyonuna etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, semende oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS), mTOR proteini ekspresyon seviyeleri ve genetik yapı parametreleri (DNA fragmantasyonu, Kromatin bütünlüğü), semen parametreleri araştırılmış ve bu parametrelerin 40 yaş üstü ve altı bireyler arasında karşılaştırılmıştır.

Semen Parametreleri

Literatürde bazı araştırmacılar, semen parametrelerinin yaşlanmadan olumsuz etkilendiğini bildirirken (186-188), bazı araştırmaların sonucunda ise yaşın sperm parametrelerine belirgin etkisinin olmadığı saptanmıştır (186-191). Stone ve ark. 5000'den fazla erkekte alınan semen örneklerini analiz etmiş, toplam sperm sayısının ve hareketliliğinin 34 yaşından hemen sonra azaldığını, sperm morfolojisi gibi diğer parametrelerin ise 40 yaşından sonra önemli ölçüde etkilendiğini gözlemlemiştir. Bu çalışmanın sonucunda semen parametrelerdeki bozulmanın başlangıcı için 34 yaşın eşik değer olarak kabul edilebileceği öne sürülmüştür (189).

Demirkol ve ark. farklı yaş gruplarındaki bireylerin semen parametrelerini karşılaştırdıkları araştırmanın sonucunda, farklı yaş gruplarında bireylerin semen hacimleri arasında farklılık olmadığını, ancak sperm konsantrasyonu, toplam sayı, hareketlilik, canlılık ve morfoloji parametrelerinde anlamlı farklılıklar bulunduğunu bildirmiştir (192). Kumar ve ark. ise yaşla birlikte semen hacmi, toplam sperm sayısı, sperm motilitesi ve morfolojisi parametrelerinde sabit bir düşüş olduğunu bildirmiştir (191). Johsen ve ark. tarafından yapılan bir meta-analiz çalışmasının sonucunda da Kumar ve ark.'larının bulgularına paralel sonuçlar ortaya konmuştur (106). Brahem ve ark. 140 semen örneğinde sperm kalitesini değerlendirmiş ve ilerleyen yaşın semen hacmi ve canlılığında azalma ve sperm konsantrasyonunda artış ile ilişkili olduğunu, ancak hareketlilik ve morfolojideki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmiştir (30). Yapılan birkaç çalışmada yaşlı erkeklerde yaş ile birlikte semen hacmindeki azalma gösterilmiştir (63,193). Sloter ve ark. ilerleyen yaşın sperm konsantrasyonu veya toplam sperm sayısı üzerinde etkisi olmadığını bildirmiştir (194). Yapılan çalışmalarda, 31 ve üstü yaşındaki erkeklerin sperm motilitesinde azalma olması daha olası olduğu ve erkeklerde 50 yaş ile 21-30 yaş ile karşılaştırıldığında bozulmuş sperm motilitesine sahip olduğu gösterilmiştir (195-197). Lai ve ark. Çalışmalarında 40 yaş ve üzerini ileri baba yaşı olarak belirlemiş semen hacmi, toplam motilite, ileri hareketlilikte baba yaşı ile birlikte düşüş olduğunu bildirmiştir (184). Brahem ve ark. 24-76 yaş aralığında yaptıkları çalışmada yaş ile birlikte semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam motilite, ileri hareketlilik ve sperm morfolojisi oranlarında azalma olduğunu iddia etmiştir (198).

Çalışmamızda 40 yaşın üzerindeki bireyler ile 40 yaşın altındaki bireylerin semen parametreleri karşılaştırıldığında semen hacmi, sperm konsantrasyonu ve sperm morfolojisi değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak toplam motilite ve ileri hareketli sperm oranları, ileri baba yaşındaki bireylerde istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. Yaptığımız çalışma sonucu bulgularımızda ileri baba yaşı ile birlikte toplam motilite ve ileri hareketli sperm oranlarında meydana gelen azalma, Sloter ve ark., Lai ve ark.'nın yaptığı çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (184,198). Diğer bulgularımızda (semen hacmi, sperm konsantrasyonu ve sperm morfolojisi) ise anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmamızın bulguları semen parametrelerinden en çok motilite parametrelerinin

etkilendiğini ortaya koymuştur. Bunun nedeni olarak yaşlanmayla birlikte mitokondriyel aktivasyona bağlı olarak hücrelerde metabolizma hızının yavaşlaması düşünülebilir. Çalışmalarda ortaya çıkan farklı bulgular hasta gruplarının farklılığından ve semen analizinde ortaya çıkan farklılıklardan kaynaklanabilir. Hasta sayılarının artırılarak standardize edilmiş semen analizi yöntemleriyle yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

DNA Fragmentasyonu ve Kromatin Hasarı

İnsan sperminde kromatin ipliğın karmaşık katlanma sistemi vardır. Kromatin ipliğın spermde küçük bir bölgeye yerleştirilmesi için normalde histon proteinlerine sarılı şekilde bulunan DNA'nın spermde histonların protaminler tarafından değiştirilmesi yoluyla yüksek oranda sıkıştırılmış kromatin elde edilmektedir. Protaminler ile DNA'nın paketlenmesi gelecek nesli oluşturacak olan mayoz bölünme geçirmiş tek iplik DNA'nın daha fazla korunmasını da sağlamaktadır (199). Yüksek oranda sıkıştırılmış kromatin sıkı bir şekilde paketlenmesine ve iyi korunmasına rağmen yine de doğurganlığı ciddi şekilde bozabilecek etkenlere (radyasyon, stres, beslenme vd.) karşı hassastır (200).

Sperm DNA fragmentasyonu spermin oluşması ve taşınması aşamalarında gerçekleşmektedir. Spermin oluşma aşamalarından spermatogenez sürecinde apoptozun meydana gelmesi ve spermiyogenezde ise spermin yeniden şekillenmesi sırasında DNA ipliğı kopmaları meydana gelmesi DNA fragmentasyonu ve kromatin hasarı meydana getirmektedir. Spermin taşınma aşamalarında, seminifer tübüller ve epididim yoluyla sperm nakli sırasında hidroksil radikali ve nitrik oksit dahil oksijen radikalleri oluşmaktadır. Oluşan bu radikaller DNA fragmentasyonu ve kromatin hasarı meydana getirmektedir. Endojen kaspazlar ve endonükleazlar radyoterapi, kemoterapi ve benzeri çevresel toksik maddeler tarafından indüklenen DNA hasarlarına benzer DNA fragmentasyonları meydana getirdiği bildirilmiştir (201,202).

Rybar ve ark. yaptığı çalışmada yaşları 41 yaşından fazla olan erkeklerde 41 yaşından düşük olanlara göre daha fazla sperm kromatin hasarının meydana geldiği bildirmiştir [196]. Buna karşın bazı araştırmacılar yaşlanma ile spermlerin kromatin

bütünlüğünün azalması arasında bir bağlantı olmadığını bildirmiştir (203,204). Nijs ve ark., IVF veya ICSI uygulanan 278 hasta üzerinde yaptıkları araştırmanın sonucunda, erkeklerin yaşının sperm konsantrasyonu, motilitesi veya morfolojisi üzerinde hiçbir etkisi olmadığını ancak DNA fragmantasyonunda önemli bir artış bulunduğunu iddia etmişlerdir (203). Baba yaşının artmasıyla kromatin hasarı ve DNA fragmantasyonunda artış olduğu iddia edilmiş bu durumun yaptığımız çalışmayla uyumlu olduğu tespit edilmiştir (183,184).

Bu çalışmamızda 40 yaş ve üzerindeki bireylerde kromatin hasarı ve DNA fragmantasyonunda artış saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda yaşlanmanın genetik materyal üzerinde hasar meydana getirdiği ve ileri baba yaşı olan bireylerde infertilitede artış olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca yaşlı bireylerde DNA yapısının bozulmasına bağlı gelecek nesne hasarlı genetik materyalin aktararak çeşitli genetik hastalıklara zemin hazırlayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (205-207).

Oksidatif Stres

Oksidatif stres, ROT ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin bozulmasıdır. Reaktif oksijen türleri (ROS) yüksek oranda oksitleyici serbest radikal ajanlardır ve süperoksit anyonları (O^-), hidrojen peroksit(H_2O_2), peroksil (ROO) ve hidroksil (OH^-) radikallerini içermektedir (208).

Spermdeki başlıca ROT kaynakları, seminal plazmadaki aktive olmuş lökositler ve spermdeki mitokondridir (79). Yapılan çalışmalar, spermelerde ROS aracılı hasarların infertil erkeklerin %30-80'inde önemli bir etken olduğunu ortaya çıkarmıştır (79, 209). Oksidatif stres, lipid membran bileşenlerinin oksidasyonu ile membran akışkanlığını ve geçirgenliğini engelleyerek spermin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün bozulmasına neden olmaktadır. Yapısal ve fonksiyonel bozulma ise spermelerde işlev bozukluklarına neden olarak infertiliteye sebep olmaktadır (210).

Sperm hücrelerinde en çok bilinen oksidatif stres kaynağı ATP üretimi sırasında mitokondride meydana gelen yüksek ROT seviyeleri olarak gösterilmektedir. ROT oksijenin enerjiye dönüştürülmesi sırasında açığa çıkarak,

mitokondri DNA'sının ve zarının parçalanmasına neden olmaktadır. Bu durum mitokondrilerin aktivitesini etkileyerek sperm hücrelerinin kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gibi çeşitli fonksiyonlarını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (79). Seminal plazma, sağlıklı bireylerde aşırı ROS üretiminin etkisini, içerdiği antioksidanlar sayesinde nötralize etmektedir. İleri baba yaşı ile birlikte seminal plazmada mevcut antioksidanlarda azalma meydana gelerek antioksidan ile ROT seviyeleri arasındaki denge bozularak oksidatif stres seviyelerinde artış gerçekleştiği bildirilmiştir (211).

Yaşın semen parametrelerine etkisi üzerine yapılan meta-analiz çalışmaları, ileri yaşla birlikte semen parametrelerinde görülen bu değişimlerin yaşa bağlı aşırı ROS üretimi, spermde antioksidanların savunma etkisinin azalması ve oksidatif stres tarafından sperm hasarının uyarılması sonucu ortaya çıktığını bildirmektedir (106). Desai ve ark. ROT üretimini etkileyerek erkek fertilitésinin yaşa bağlı azalmasında merkezi bir role sahip olduğunu belirtmektedir (212,213). Sıçanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, yaşlı hayvanlardan elde edilen spermlerin, genç hayvanlara kıyasla daha fazla serbest radikal ürettiğini ve daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (178,213). Benzer şekilde Paoli ve ark. tarafından yürütölen bir çalışmada 51 ila 81 yaş arasındaki erkeklerin semenlerinde, 20 ila 32 yaş arasındaki erkeklere kıyasla daha fazla ROT bulunduğu, bu durumun düşük sperm ve semen parametrelerine yol açtığını göstermiştir (214).

Vaughan ve ark. 16945 örnek üzerinde çalışma gerçekleştirmiş, yapılan çalışma sonucunda artan baba yaşının OS'de artışa sebep olduğunu bildirmiştir (215). Aitken ve Curry yaptıkları çalışmada yaş ile birlikte OS'de artış olduğunu iddia etmişlerdir. Bu artışın spermiyogenezde kusurlara neden olduğunu raporlamışlardır (216). Çalışmamızda oksidatif stres indeksinde gruplar arasında farklılık bulunmamıştır. Bunun sebebi olarak çalışılan bireylerin farklılığı, örnek sayısının az olması, deney yöntemlerinin farklılığı olabileceği düşünülmektedir.

mTOR Proteini Ekspresyonu

Literatürde semen hacmi, sperm konsantrasyonu, morfolojisi, motilitesi ve DNA fragmantasyonu gibi parametrelerin yaşa dayalı etkisini araştıran çalışmalar

bulunmasına rağmen baba yaşının insan spermelerde sinyal yolları üzerindeki etkisi üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada ileri yaş erkekler ile genç erkeklerde mTOR sinyal yolağının önemli bir düzenleyici proteini olan mTOR proteininin etkisi incelenmiştir.

mTOR'un SC'lerde glukoz tüketimini ve redoks dengesini kontrol ettiği ve spermatogenezin beslenme desteğinde doğrudan bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (217). Jun ve ark. farelerde üzerinde yürüttüğü çalışmanın sonucunda yaşlanma ile birlikte spermatogoniumların mTOR sinyal yolağında azalma olmadığı bildirmiştir (218). Silva ve ark. mTOR yolağında görevli 12 proteini incelemiş, ileri baba yaşının (27 yaş üzeri) mTOR sinyal yolağı üzerinde olumsuz etkileri olduğu sonucuna varmıştır (219). Boyer ve ark. İleri baba yaşının LH'lerdeki mTOR sinyal yolunun değişimi ve bu değişimin spermatogenezdeki etkisini inceleyen bir başka çalışmanın sonucunda bu sinyal yolağı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (220). Xu ve ark ise mTOR ekspresyonunun p70S6K, rpS6 ve 4E-BP1'in saptanması yoluyla mTOR'un spermatogenez ile pozitif ilişkili olduğunu göstermiş ve P70S6K, rpS6 ve 4E-BP1 proteinlerinin seviyelerinin yaşla birlikte kademeli olarak azaldığını ortaya koymuştur (221). Literatürde raptor, mTORC1 ve SIRT1 proteinlerinin mTOR da yaşlanma ile azalma gösterdikleri tespit edilmiş, bu azalmanın erkek üreme sağlığı bozukluklarını meydana getirdiği belirtilmiştir (178,222).

Yaptığımız deneylerin sonucunda mTOR protein seviyelerinde yaş ile birlikte anlamlı bir değişiklik bulunmadığı gözlenmiştir. Bulduğumuz sonuçlar Boyer ve ark. yaptıkları çalışmaların bulgularını desteklemektedir. Baba yaşı ile mTOR ekspresyonunda değişiklik olmadığını tam olarak kanıtlamak için yapılacak daha ileri çalışmalarla, western blot gibi yöntemlerle, sonuçların konfirme edilmesi gerekmektedir. Ayrıca bu yolda yer alan diğer proteinlerin de araştırılması ve etkileşimlerinin incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

8. SONUÇ

Çalışmamızda ileri baba yaşının DNA kromatin bütünlüğü, DNA fragmentasyonu, mTOR sinyal yolağı ve OS parametrelerinde meydana getirdiğı değişimlerin sperm parametrelerinde herhangi bir değişikliğe yol açıp açmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda semen parametrelerinde 40 yaş ve üzerindeki bireylerde semen hacmi ve sperm konsantrasyonu değerlerinde yaş ile anlamlı bir değişim olmadığı ancak toplam motilite ve ileri hareketli sperm oranlarının anlamlı derecede daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca ileri baba yaşının DNA fragmentasyonu ve kromatin bütünlüğü parametrelerini olumsuz etkilediğı, mTOR sinyal yolu ve OS parametrelerini ise etkilemediğı gösterilmiştir. Konu ile ilgili daha kapsamlı ve ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece infertiltede kadın yaşının olumsuz etkilerinin yanı sıra erkeğin yaşının fertiliteye olan etkisinin aydınlatılması da mümkün olacak ve bu durumla ilgili farkındalık oluşması sağlanacağı gibi, tedaviye yönelik girişimler için veri sağlanmasına katkı sağlanacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Borghot M Vander, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.* 62: 2-10, 2018.
2. Krausz C, Giachini C, Lo Giacco D, Daguin F, Chianese C, Ars E, et al. High Resolution X Chromosome-Specific Array-CGH Detects New CNVs in Infertile Males. Orban L, editor. *PLoS One* ;7:10:e44887, 2012.
3. Hwang K, Yatsenko N. A, Jorgez C. J, Mukherjee S, Nalam R. L, Matzuk M, et al. Mendelian genetics of male infertility. *1214: E1–E17*, 2010.
4. Zitzmann M. Effects of age on male fertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 27(4);617-28, 2013.
5. Vieira Silva J, Cabral M, Regadas Correia B, Carvalho P, Sousa M, Fontes Oliveira P, et al. mTOR signaling pathway regulates sperm quality in older men. *Cells.* 8(6);629, 2019.
6. Kirichok Y, Navarro B, Nature DC-, 2006 undefined. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *nature.* 439(7077);737-40, 2006.
7. Crapster JA, Rack PG, Hellmann ZJ, Le AD, Adams CM, Leib RD, et al. HIPK4 is essential for murine spermiogenesis. *Elife.* 12(9);e50209, 2020.
8. Nguyen TMD. Main signaling pathways involved in the control of fowl sperm motility. *Poult Sci.* 98(3);1528–38, 2019.
9. Allouche-Fitoussi D, Bakhshi D, Breitbart H. Signaling pathways involved in human sperm hyperactivated motility stimulated by Zn²⁺. *Wiley Online Libr.* 86(5);502–15, 2019.
10. Laplante M, Sabatini DM. An Emerging Role of mTOR in Lipid Biosynthesis. *Curr Biol.* 19(22);1046-52, 2009.
11. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 122(Pt 20);3589-94, 2009.
12. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell.* 110(2);177-89, 2002.
13. Kim D, Sarbassov D, Ali S, King J, Latek R. R, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* 110(2);163-75, 2002.
14. Gangloff Y-G, Mueller M, Dann SG, Svoboda P, Sticker M, Spetz J-F, et al. Disruption of the Mouse mTOR Gene Leads to Early Postimplantation Lethality and Prohibits Embryonic Stem Cell Development. *Mol Cell Biol.*

24(21);9508–16, 2004.

15.Martin P, biology AS-D. Exogenous amino acids regulate trophectoderm differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Dev Biol.* 240(1);182-93, 2001.

16.Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, et al. mTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol.* 24(15);6710–8, 2004.

17.Rato L, Meneses M, Silva B, Sousa M, Alves M, Oliveira P. New insights on hormones and factors that modulate Sertoli cell metabolism. *Histol Histopathol.* 31(5):499-513, 2016.

18.Alves M, Dias T, Silva B, Oliveira F P. Metabolic cooperation in testis as a pharmacological target: from disease to contraception. *Curr Mol Pharmacol.* 7(2):83-95, 2014.

19.Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 25(3);287–99, 2011.

20.Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: Etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 27(1);3–12, 2010.

21.Lamirande E de, Eiley D, Gagnon C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl.* 16(4);258–66, 1993.

22.Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 210(4474);1131–3, 1980.

23.Sergerie M, Mieuisset R, Croute F, Daudin M, Bujan L. High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertil Steril.* 88(4);970.e1-7, 2007.

24.Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet.* 28(5);425–432, 2011.

25.Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertil Steril.* 92(5);1520–4, 2009.

26.Niederberger C. Re: Diagnostic Evaluation of the Infertile Male: A Committee Opinion. *Fertil Steril.* 103(3):e18-25, 2015.

27.Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril.* 110(5);810–4, 2018.

- 28.Boeri L, Ventimiglia E, Capogrosso P, Ippolito S, Pecoraro A, Paciotti M, et al. Low birth weight is associated with a decreased overall adult health status and reproductive capability - Results of a cross-sectional study in primary infertile patients. *PLoS One*.11(11);1–14, 2016.
- 29.HANDELSMAN DJ, STARAJ S. Testicular Size: The Effects of Aging, Malnutrition, and Illness. *J Androl*. 6(3);144–51, 1985.
- 30.Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet*. 28(5);425–32,2011.
- 31.Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update*. 16(1);65–79, 2009.
- 32.Nguyen-Powanda P, Robaire B. Oxidative stress and reproductive function in the aging male. *Biology (Basel)*. 9(9);1–15, 2020.
- 33.Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 59:10–26, 2016.
- 34.Hermo L, Lalli M, Clermont Y. Arrangement of connective tissue components in the walls of seminiferous tubules of man and monkey. *Am J Anat*. 148(4);433–45, 1977.
- 35.Russell LD, Ren HP, Hikim IS, Schulze W, Hikim APS. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the sertoli cell. *Am J Anat*. 188(1);21–30, 1990.
- 36.Morales C, Clermont Y. Structural changes in teh Seroli cell during the cycle of the seminiferous epithelium. *Sertoli Cell*. PP:305–239, 1993.
- 37.Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, et al. Mullerian inhibiting substance in humans: Normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 81(2);571–6, 1996.
- 38.Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol Reprod Dev*. 71(2);166–77, 2005.
- 39.Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colón E, Svechnikov I, et al. Origin, development and regulation of human leydig cells. *Horm Res Paediatr*. 73(2);93–101, 2010.
- 40.Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. *Androl Male Reprod Heal Dysfunct*. PP:11–59, 2010.
- 41.Holstein AF, Roosen-Runge EC, Schirren C. Illustrated pathology of human spermatogenesis [Internet]. *Andrologia*.PP:1–278, 1988.
- 42.Mahmoud AM, Goemaere S, El-Garem Y, Van Pottelbergh I, Comhaire

- FH, Kaufman JM. Testicular volume in relation to hormonal indices of gonadal function in community-dwelling elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(1);179–84, 2003.
- 43.Sharma R, Agarwal A, Rohra VK, Assidi M, Abu-Elmagd M, Turki RF. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol.* 13(1);1–20, 2015.
- 44.Hermann M, Untergasser G, Rumpold H, Berger P. Aging of the male reproductive system. *Exp Gerontol.* 35(9–10);1267–79, 2000.
- 45.Hoover P, Naz RK. Do men with prostate abnormalities (prostatitis/benign prostatic hyperplasia/prostate cancer) develop immunity to spermatozoa or seminal plasma? *Int J Androl.* 35(4);608–15, 2012.
- 46.Robaire B, Syntin P, Jervis K. The Coming of Age of the Epididymis. *Testis, Epididymis Technol Year 2000.* PP:229–62, 2000.
- 47.Serre V, Robaire B. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biol Reprod.* 58(2);497–513, 1998.
- 48.Gray A, Feldman HA, Mc kinlay JB, Longcope C. Age, Disease, and Changing Sex Hormone Levels in Middle-Aged Men: Results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 73(5);1016–25, 1991.
- 49.Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: Longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(2);589–98, 2002.
- 50.NEAVES WB, JOHNSON L, PORTER JC, PARKER CR, PETTY CS. Leydig Cell Cytoplasmic Mass, Daily Sperm Production, and Serum Gonadotropin Levels in Aging Men. *Ann N Y Acad Sci.* 438(1);490–1, 1984.
- 51.Wolk A, Andersson SO, Bergström R. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 89(11);820, 1997.
- 52.Veldhuis JD. Recent insights into neuroendocrine mechanisms of aging of the human male hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Androl.* 20(1);1–18, 1999.
- 53.Mastrogiacomo I, Feghali G, Foresta C, Ruzza G. Andropause: Incidence and Pathogenesis. *Arch Androl.* 9(4);293–6, 1982.
- 54.Mirone V, Ricci E, Gentile V, Basile Fasolo C, Parazzini F, Calabrese M, et al. Determinants of Erectile Dysfunction Risk in a Large Series of Italian Men Attending Andrology Clinics. *Eur Urol.* 45(1);87–91, 2004.
- 55.Cayan S, Kendirci M, Yaman O, Asci R, Orhan I, Usta MF, et al. Prevalence of erectile dysfunction in men over 40 years of age in Turkey:

Results from the Turkish Society of Andrology Male Sexual Health Study Group. *Türk Üroloji Dergisi/Turkish J Urol.* 43(2);122–9, 2017.

56.Mulligan T, Retchin SM, Chinchilli VM, Bettinger CB. The Role of Aging and Chronic Disease in Sexual Dysfunction. *J Am Geriatr Soc.* 36(6);520–4, 1988.

57.Kenkel S, Rolf C, Nieschlag E. Occupational risks for male fertility: an analysis of patients attending a tertiary referral centre. *Int J Androl.* 24(6);318–26, 2008.

58.Hauser R. The environment and male fertility: Recent research on emerging chemicals and semen quality. *Semin Reprod Med.* 24(3);156–67, 2006.

59.Hossain MM, Fatima P, Rahman D, Hossain HB. Semen parameters at different age groups of male partners of infertile couples. *Mymensingh Med J.* 21(2);306–15, 2012.

60.Jiang H, Zhu WJ, Li J, Chen QJ, Liang WB, Gu YQ. Quantitative histological analysis and ultrastructure of the aging human testis. *Int Urol Nephrol.* 46(5);879–85, 2014.

61.Nieschlag E, Lammers U, Freischem CW, Langer K, Wickings EJ. Reproductive functions in young fathers and grandfathers. *J Clin Endocrinol Metab.* 55(4);676–81, 1982.

62.Haidl G, Jung A, Schill WB. Ageing and sperm function. *Hum Reprod.* 11(3);558–60, 1996.

63.Kidd S, Eskenazi B, Wyrobek AJ Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril.* 75(2);237–48, 2001.

64.Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril.* 85(1);128–34, 2006.

65.Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, et al. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod.* 18(2);447–54, 2003.

66.Zhu Q, Meads C, Lu M, Wu J, Zhou W, sterility EG-F and, et al. Turning point of age for semen quality: a population-based study in Chinese men. *Fertil Steril.* 96(3);572–6, 2011.

67.Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: Analysis of 6022 semen samples. *Andrologia.* 39(2);45–50, 2007.

68.Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Am J Reprod Immunol.* 59(1);2–11, 2008.

69.Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative Stress and Cell

Signalling. *Curr Med Chem.* 11(9);1163–82, 2012.

70. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017.

71. Karalar M, Amlı MŞ, Tüzel E, Köken T, Demirbaş M. Evaluation of oxidative stress in the spermatic and peripheral veins of patients with varicocele. *Andrologia.* 33(1);40–4, 2007.

72. Barati E, Nikzad H, Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci.* 77(1);93–113, 2020.

73. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl.* 6(1);59–65, 2004.

74. Gavella M, Lipovac V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Syst Biol Reprod Med.* 28(2);135–41, 1992.

75. Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl.* 17(2);151–7, 1996.

76. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 103(1);17–26, 1995.

77. Yadav SB, Suryakar AN, Huddedar AD, Shukla PS. Effect of antioxidants and antibiotics on levels of seminal oxidative stress in leukocytospermic infertile men. *Indian J Clin Biochem.* 21(1);152–6, 2006.

78. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev.* 47(4);468–82, 1997.

79. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. *BioEssays.* 16(4);259–67, 1994.

80. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet.* 16(21);2542–51, 2007.

81. Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet.* 26(9–10);537–44, 2009.

82. Cemeli E, Anderson D. Mechanistic investigation of ROS-induced DNA damage by oestrogenic compounds in lymphocytes and sperm using the comet assay. *Int J Mol Sci.* 12(5);2783–96, 2011.

83. Wang E, Huang Y, Du Q, Sun Y. Silver nanoparticle induced toxicity to human sperm by increasing ROS (reactive oxygen species) production and DNA damage. *Environ Toxicol Pharmacol*. 52:193–9, 2017.
84. Lopes F, Pinto-Pinho P, Gaivão I, Martins-Bessa A, Gomes Z, Moutinho O, et al. Sperm DNA damage and seminal antioxidant activity in subfertile men. *Andrologia*. 53(5);1–14, 2021.
85. 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.
86. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*. 80(3);531–5, 2003.
87. Zubkova E V., Robaire B. Effects of ageing on spermatozoal chromatin and its sensitivity to in vivo and in vitro oxidative challenge in the Brown Norway rat. *Hum Reprod*. 21(11);2901–10, 2006.
88. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 13:757–72, 2018.
89. Schöneich C. Reactive oxygen species and biological aging: A mechanistic approach. *Exp Gerontol*. 34(1);19–34, 1999.
90. Menezo YJR, Silvestris E, Dale B, Elder K. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reprod Biomed Online*. 33(6);668–83, 2016.
91. Smerdon MJ. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol*. 3(3);422–8, 1991.
92. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 12(4);417–35, 2006.
93. Brohi RD, Huo LJ. Posttranslational Modifications in Spermatozoa and Effects on Male Fertility and Sperm Viability. *Omi A J Integr Biol*. 21(5);245–56, 2017.
94. Laberge RM, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod*. 73(2);289–96, 2005.
95. Luconi M, Forti G, Baldi E. Department of Clinical Physiopathology, Center of Research, Transfer and High Education: DENOthe, Andrology Unit, University of Florence. *Front Biosci*. 11(3);1433–47, 2006.
96. Kodama H, Kasai H, Yamaguchi R, Tanaka T, Fukuda J. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male

- patients. *Fertil Steril*. 68(3);519–24, 1997.
97. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem*. 274(43);30651–30656, 1999.
98. Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, et al. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett*. 477(1–2);1–7, 2000.
99. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*. 66(4);1061–7, 2002.
100. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 15(6);1338–44, 2000.
101. Pohl E, Gromoll J, Wistuba J, Laurentino S. Healthy ageing and spermatogenesis. *Reproduction*. 161(4);R89–101, 2021.
102. Goldmann JM, Wong WSW, Pinelli M, Farrah T, Bodian D, Stittrich AB, et al. Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nat Genet*. 48(8);935–9, 2016.
103. Freitas AA, De Magalhães JP. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 728(1–2);12–22, 2011.
104. Dakouane M, Albert M, Bergère M, Sabbagh C, Brayotel F, Vialard F, et al. Aging and spermatogenesis: An histologic, cytogenetic and apoptosis study. *Gynecol Obstet Fertil*. 33:9, 2005.
105. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: A review of the literature. *Fertil Steril*. 75(2);237–48, 2001.
106. Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 19:22–33, 2015.
107. He Z, Kokkinaki M, Dym M. Signaling molecules and pathways regulating the fate of spermatogonial stem cells. *Microsc Res Tech*. 72(8);586–95, 2009.
108. Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science*. 294(5551);2542–5, 2001.
109. Brawley C, Matunis E. Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science*. 304(5675);1331–4, 2004.
110. Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, De Rooij DG, Hess MW,

et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*. 287(5457);1489–93, 2000.

111. Trupp M, Scott R, Whittemore SR, Ibáñez CF. Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem*. 274(30);20885–94, 1999.

112. Braydich-Stolle L, Kostereva N, Dym M, Hofmann MC. Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev Biol*. 304(1);34–45, 2007.

113. Klippel A, Escobedo M-A, Wachowicz MS, Apell G, Brown TW, Giedlin MA, et al. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Sufficient for Cell Cycle Entry and Promotes Cellular Changes Characteristic of Oncogenic Transformation. *Mol Cell Biol*. 18(10);5699–711, 1998.

114. Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogunuki N, Miki H, Toyokuni S, et al. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development*. 134(10);1853–9, 2007.

115. Yamamoto T, Taya S, Kaibuchi K. Ras-induced transformation and signaling pathway [Internet]. Vol. 126, *Journal of Biochemistry*. PP: 799–803, 1999.

116. Dolci S, Pellegrini M, Di Agostino S, Geremia R, Rossi P. Signaling through Extracellular Signal-regulated Kinase Is Required for Spermatogonial Proliferative Response to Stem Cell Factor. *J Biol Chem*. 276(43);40225–33, 2001.

117. He Z, Jiang J, Kokkinaki M, Golestaneh N, Hofmann M-C, Dym M. Gdnf Upregulates c-Fos Transcription via the Ras/Erk1/2 Pathway to Promote Mouse Spermatogonial Stem Cell Proliferation. *Stem Cells*. 26(1);266–78, 2008.

118. Besser D. Expression of nodal, lefty-A, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3. *J Biol Chem*. 279(43);45076–84, 2004.

119. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGF β /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*. 132(6);1273–82, 2005.

120. Pellegrini M, Grimaldi P, Rossi P, Geremia R, Dolci S. Developmental expression of BMP4\ALK3\SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: A potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *J Cell Sci*. 116(16);3363–72, 2003.

121. Fardilha M, Esteves S, Korrodi-Gregório L, Vintém AP, Domingues SC, Rebelo S, et al. Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome. *Biochem Pharmacol*. 82(10);1403–15, 2011.

122. Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, Smith GD, Khatra B, Da Cruz E Silva EF, et al. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biol Reprod.* 54(3);709–18, 1996.
123. Han Y, Haines CJ, Feng HL. Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility. *Arch Androl.* 53(4);169–77, 2007.
124. Cohen P. Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods Enzymol.* 201:389–98, 1991.
125. Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, et al. PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One.* 2(11):e1217, 2007.
126. Wang QM, Park IK, Fiol CJ, Roach PJ, DePaoli-Roach AA. Isoform Differences in Substrate Recognition by Glycogen Synthase Kinases 3 α and 3 β in the Phosphorylation of Phosphatase Inhibitor 2. *Biochemistry.* 33(1);143–7, 1994.
127. Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod.* 96(1);2–12, 2017.
128. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell.* 149(2);274–93, 2012.
129. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell.* 12(1);9–22, 2007.
130. Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K, Takehana K, et al. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem.* 285(26);20109–16, 2010.
131. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol.* 10(8);935–45, 2008.
132. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 17(15);1829–34, 2003.
133. Kakumoto K, Ikeda JI, Okada M, Morii E, Oneyama C. MLST8 promotes mTOR-mediated tumor progression. *PLoS One.* 10(4):e0119015, 2015.
134. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, et al. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Mol Cell.* 25(6);903–15, 2007.
135. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple

- Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell*. 137(5);873–86, 2009.
- 136.Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem*. 282(27);20036–44, 2007.
- 137.Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, et al. mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Curr Biol*. 16(18);1865–70, 2006.
- 138.Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell*. 127(1);125–37, 2006.
- 139.Weng Z, Shen X, Zheng J, Liang H, Liu Y. Structural Basis of DEPTOR to Recognize Phosphatidic Acid Using its Tandem DEP Domains. *J Mol Biol*. 33(13);166989, 2021.
- 140.Gao D, Inuzuka H, Marcus Tan M-K, Fukushima H, Locasale WJ, Liu P, et al. mTOR drives its own activation via SCF β TrCP-dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR. *Mol Cell*. 44(2):290-303,2011.
- 141.Zhao Y, Xiong X, Sun Y. DEPTOR, an mTOR Inhibitor, is a physiological substrate of SCF β TrCP E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol Cell*. 44(2);304–16, 2011.
- 142.Zhao L, Wang X, Yu Y, Deng L, Chen L, Peng X, et al. OTUB1 protein suppresses mTOR complex 1 (mTORC1) activity by deubiquitinating the mTORC1 inhibitor DEPTOR. *J Biol Chem*. 293(13);4883–92, 2018.
- 143.Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KVP, Erdjument-Bromage H, et al. G β L, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*. 11(4);895–904, 2003.
- 144.Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al. Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev Cell*. 11(6);859–71, 2006.
- 145.Nakashima A, Kawanishi I, Eguchi S, Yu EH, Eguchi S, Oshiro N, et al. Association of CAD, a multifunctional protein involved in pyrimidine synthesis, with mLST8, a component of the mTOR complexes. *J Biomed Sci*. 20(1);24, 2013.
- 146.Wang B, Jie Z, Joo D, Ordureau A, Liu P, Gan W, et al. TRAF2 and OTUD7B govern a ubiquitin-dependent switch that regulates mTORC2 signalling. *Nature*. 545(7654);365–9, 2017.
- 147.Ghomlaghi M, Yang G, Shin S, James DE, Nguyen LK. Dynamic modelling of the PI3K/MTOR signalling network uncovers biphasic

dependence of mTORC1 activity on the mTORC2 subunit SIN1. *PLoS Comput Biol.* 17(9):e1008513, 2021.

148.Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 4(9):648–57, 2002.

149.Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci.* 30(1):35–42, 2005.

150.Manning BD. Balancing Akt with S6K: Implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol.* 167(3):399–403, 2004.

151.Schieke SM, Phillips D, McCoy JP, Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem.* 281(37):27643–52, 2006.

152.Chen C, Liu Y, Liu R, Ikenoue T, Guan KL, Liu Y, et al. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med.* 205(10):2397–408, 2008.

153.Bentzinger CF, Romanino K, Cloëtta D, Lin S, Mascarenhas JB, Oliveri F, et al. Skeletal Muscle-Specific Ablation of raptor, but Not of rictor, Causes Metabolic Changes and Results in Muscle Dystrophy. *Cell Metab.* 8(5):411–24, 2008.

154.Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature.* 450(7170):736–40, 2007.

155.Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(10):774–85, 2007.

156.Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell.* 115(5):577–90, 2003.

157.Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol Cell.*; 30(2):214–26, 2008.

158.Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer.* 8(11):851–64, 2008.

159.Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem.* 278(32):29655–60, 2003.

160.Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell.*

21(4);521–31, 2006.

161.Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18(23);2893–904, 2004.

162.Reiling JH, Hafen E. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev.* 18(23);2879–92, 2004.

163.Deyoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* 22(2);239–51, 2008.

164.Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, et al. PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature.* 442(7104);779–85, 2006.

165.Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang CY, Swanson J, et al. Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J Biol Chem.* 282(49);35803–13, 2007.

166.Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, et al. The rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science.* 320(5882);1496–501, 2008.

167.Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(23);8204–9, 2005.

168.Lee DF, Kuo HP, Chen C Te, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, et al. IKK β Suppression of TSC1 Links Inflammation and Tumor Angiogenesis via the mTOR Pathway. *Cell.* 130(3);440–55, 2007.

169.Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, et al. TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell.* 126(5);955–68, 2006.

170.Foster DA. Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res.* 67(1);1–4, 2007.

171.Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N, Foster DA. Regulation of mTORC1 and mTORC2 Complex Assembly by Phosphatidic Acid: Competition with Rapamycin. *Mol Cell Biol.* 29:6:1411–20, 2009.

172.Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307(5712);1098–101, 2005.

173.Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene.* 27(16);2276–88, 2008.

174.García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls

hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J.* 416(3);375–85, 2008.

175. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 6(11);1122–8, 2004.

176. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: A key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci.* 114(16);2903–10, 2001.

177. Chrienova Z, Nepovimova E, Kuca K. The role of mTOR in age-related diseases. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 36(1);1679–93, 2021.

178. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaerberlein M. MTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature.* 493(7432);338–45, 2013.

179. Jenkins G, Aston I, Carrell T. Sperm epigenetics and aging. *Translational andrology and urology.* S:328-335, 2018.

180. Cao M, Shao X, Chan P, Cheung W, Kwan T, Pastinen T, et al. High-resolution analyses of human sperm dynamic methylome reveal thousands of novel age-related epigenetic alterations. *Clinical Epigenetics.* 12:192, 2020.

181. Haidı G, Jung A, and Schill WB, Ageing and sperm function. *Human Reproduction.* PP: 558-560, 1996.

182. Pohl E, Gromoll J, Wistuba J, Laurentino S. Healthy ageing and spermatogenesis. *Society for Reproduction and Fertility.* 1470–1626 1741–7899. 2021.

183. Pasqualotto FF, Sobreiro, BP, Hallak J, Pasqualotto, EB. Sperm concentration and normal sperm morphology decrease and follicle-stimulating hormone level increases with age. *BJU Int.* 96(7);1087-91, 2005.

184. Lai S, Li R, Yeung, NG E. Effect of paternal age on semen parameters and live birth rate of in-vitro fertilisation treatment: a retrospective analysis. *Hong Kong Medical J.* 24(5); 444–50, 2018.

185. Gupta NP, Kumar R. Lycopene therapy in idiopathic male infertility—A preliminary report. *International Urology and Nephrology.* 34(3);369–72, 2002.

186. Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet.* 26(1);41–6, 2009.

187. Colasante A, Minasi MG, Scarselli F, Casciani V, Zazzaro V, Ruberti A, et al. The aging male: relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the. *pagepressjournals.org.* 90(4);254-259, 2018.

188. Pino V, Sanz A, Valdés N, Crosby J, Mackenna A. The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *JBRA Assisted Reprod.* 24(1);82-86,2020.
189. Rosiak-Gill A, Gill K, Jakubik J, Fraczek M, Patorski L, Gaczarzewicz D. Age-related changes in human sperm DNA integrity. *11(15);5399-5411*, 2019.
190. Salmon-Divon M, Shrem G, Balayla J, Nehushtan T, Volodarsky-Perel A, Steiner N, et al. An age-based sperm nomogram: the McGill reference guide. *Hum Reprod.* 35(10);2213-2225, 2020.
191. Kumar N, Singh A, Choudhari RA. Impact of age on semen parameters in male partners of infertile couples in a rural tertiary care center of central India: A cross-sectional study. *Int J Reprod Biomed.* 15(8);497-502, 2017.
192. Hamarat B, Resim S, Demirkol MK, Barut O, Dogan NT, Hamarat MB. At what age threshold does the decline in semen parameters begin? *researchgate.net.* 31:01:4–7, 2021.
193. Mazur DJ, Lipshultz LI. Infertility in the Aging Male. *Curr Urol Rep.* 19(7):54, 2018.
194. Slotter E, Schmid T, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Hum Reprod.* 21(11):2868-75, 2006.
195. Verón G, Tissera A, Bello R, Beltramone F, Estofan G, Molina R, et al. Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics. *Fertil Steril.* 110(1);68-75.e4, 2018.
196. Rybar R, Kopecka V, Prinosilova P, Markova P, Rubes J. Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia.*43(4);286–91, 2011.
197. Oliveira JBA, Petersen | C G, Mauri | A L, Vagnini | L D, Renzi | A, Petersen | B, et al. Association between body mass index and sperm quality and sperm DNA integrity. A large population study. *Wiley Online Libr.* 50:3, 2017.
198. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet.* 28(5);425–32, 2011.
199. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* 16(1);30–6, 2009.
200. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.*

17:4:990–8, 2002.

201. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod.* 16:9:1912–21, 2001.

202. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 20(1);226–30, 2005.

203. Nijs M, De Jonge C, Cox A, Janssen M, Bosmans E, Ombelet W. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology. *Andrologia.* 43(3);174–9, 2011.

204. Luetjens CM, Rolf C, Gassner P, Werny JE, Nieschlag E. Sperm aneuploidy rates in younger and older men. *Hum Reprod.* 17(7);1826–32, 2002.

205. Levitas, E.; Lunenfeld, E.; Weisz, N.; Friger, M.; Potashnik, G. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: Analysis of 6022 semen samples. *Andrologia.* 39(2):45-50, 2007.

206. Kalyani, R.; Basavaraj, P.B.; Kumar, M.L.H. Factors influencing quality of semen: A two year prospective study. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2007, 50, 890–895.

207. Martínez E, Bezazián1 C, Bezazián A, Lindl K, Peliquero A, Cattaneo A, et al. Sperm DNA fragmentation and male age: results of in vitro fertilization treatments. *Assist. Reprod.* 25(4); 533-539, 2021.

208. Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol.* 151(3);466–77, 1992.

209. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. Urology SA-, 2006 undefined. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology.* 67(1);2-8, 2006.

210. Aitken R, Gibb Z, Mitchell LA, Lambourne SR, Connaughton HS, Iuliis G. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod.* 87(5);110, 2012.

211. Costa J, Vitorino R, Silva MG, Vogel C, Duarte CA, Rocha-Santos T. A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev.* 29:90-112, 2016.

212. Desai N, Jr ES, Sabanegh E, Kim T, Agarwal A. Free radical theory of aging: implications in male infertility. *Urology*. 75(1);14-9, 2010.
213. Weir CP, Robaire B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown Norway rat. *J Androl*. 28(2);229–40, 2007.
214. Paoli D, Pecora G, Pallotti F, Faja F, Pelloni M, Lenzi A, et al. Cytological and molecular aspects of the ageing sperm. *Hum Reprod*. 34(2):218-227, 2019.
215. Vaughan D, Tirado E, Garcia D, Datta V and Sakkas D. DNA fragmentation of sperm: a radical examination of the contribution of oxidative stress and age in 16 945 semen samples. *Human rep.* (10);2188–2196, 2020.
216. 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. *Antioxid Redox Signal*. 14:367–381, 2011.
217. Jesus TT, Oliveira PF, Silva J, Barros A, Ferreira R, Sousa M, et al. Mammalian target of rapamycin controls glucose consumption and redox balance in human Sertoli cells. *Fertil Steril*. 105(3);825-833.e3, 2016.
218. Cao J, Lin ZB, Tong MH, Zhang YL, Li YP, Zhou YC. Mechanistic target of rapamycin kinase (Mtor) is required for spermatogonial proliferation and differentiation in mice. *Asian J Androl*. 22(2);169–76, 2020.
219. Silva, Cabral, Correia, Carvalho, Sousa, Oliveira, et al. mTOR Signaling Pathway Regulates Sperm Quality in Older Men. *Cells*. 8(6);629, 2019.
220. Boyer A, Girard M, Thimmanahalli DS, Levasseur A, Céleste C, Paquet M, et al. mTOR regulates gap junction alpha-1 protein trafficking in sertoli cells and is required for the maintenance of spermatogenesis in mice. *Biol Reprod*. 95(1);13 2016.
221. Xu H, Shen L, Chen X, Ding Y, He J, Zhu J, et al. mTOR/P70S6K promotes spermatogonia proliferation and spermatogenesis in Sprague Dawley rats. *Reprod Biomed Online*. 32(2);207–17, 2016.
222. Rato L, G. Alves M, M. Silva B, Sousa M, F. Oliveira P. Sirtuins: Novel Players in Male Reproductive Health. *Curr Med Chem*. 23(11);1084–99, 2016.

10. ETİK KURUL ONAYI



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

Sayı : E-10840098-772.02-3676
Konu: Etik Kurulu Kararı

24/06/2022

Sayın Dr. Öğr. Üyesi SEDA KARABULUT

Üniversitemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 20/05/2021 tarihli 510 karar no ile onay verilen "İleri Baba Yaşının Oksidatif Stres, DNA Fragmantasyonu, Kromatin Yapı ve mTOR Sinyal Yolağında Meydana Getirdiği Değişiklikler ile Sperm Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli çalışmamız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

*Yukarıda verilen araştırma açık adı yerine "İleri Baba Yaşının Sperm Parametreleri, Oksidatif Stres, DNA Fragmantasyonu, Kromatin Yapı ve mTOR Ekspresyonuna Etkilerinin İncelenmesi" olarak değiştirilmesi isteği.

Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrakımızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 8C29D4DCXA kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacak Yerleşkesi (Ana Yerleşke Rektörlük)
Kavacak Mah. Ekinçiler Cad. No: 19, Kavacak Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55
E-Posta: bilgi@medipol.edu.tr İnternet Adresi: www.medipol.edu.tr
Kep Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kep.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilge KAYA
Tel: ~~0212 531 75 55~~



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"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No:510	Tarih: 20/05/2021				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ	Tıp Tarihi ve Etik	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"/>	Uygundur
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	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"/>	Uygundur
Doç. Dr. Mehmet Kemal ÖZDEMİR	Elektrik ve Elektronik	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"/>	Uygundur
Doç. Dr. İlkur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç. Dr. Devrim TARAĞCI	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 checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Uygundur
Dr. Öğr. Üyesi Neziha HACİHASANOĞLU ÇAKMAK	Biyokimya	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"/>	Uygundur
Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	Tıbbi Farmakoloji	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"/>	Uygundur

* :Toplantıda Bulunma

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınız <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden E3EA6505X5 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

COVID-19 (Pandemi) nedeniyle etik kurulumuz sanal olarak toplanmış olup kurul üyelerimizden uygunluk kararı sanal ortamda alınmıştır. Araştırmacı tarafından talep edilirse, COVID-19 (Pandemi) sonrası ıslak imzalı karar formu ayrıca hazırlanabilir.

Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Sekreteri
Bilge KAYA

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden E3EA6505X5 kodu ile doğrulayabilirsiniz.