

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Gamze ZENGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022-ANTALYA

**KİSSPEPTİN/KİSS1R PROTEİN EKSPRESYONLARI İLE
İNSAN TESTİS DOKULARINDAKİ PATOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ**

Gamze ZENGİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KİSSPEPTİN/KİSS1R PROTEİN EKSPRESYONLARI İLE
İNSAN TESTİS DOKULARINDAKİ PATOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ

Gamze ZENGİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Güler Leyla SATI

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
TYL-2022-5799 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 24/05/2022

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Güler Leyla SATI
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Cumhuri İbrahim BAŞSORGUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye :Dr. Öğretim Üyesi Sema AVCI
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Melike CENGİZ

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Gamze ZENGİN

İmza

Doç. Dr. Güler Leyla SATI

İmza

TEŐEKKÖR

Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim sürecinde kıymetli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tez danışman hocam Sayın Doç. Dr. Güler Leyla SATI ve tez sürecim boyunca destek olan Akdeniz Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Cumhur İbrahim BAŐSÖRGÜN'a,

Bana her konuda destek olan, her fikir ve düşüncemi benden çok sahiplenen, bana iyiyi kötüyü, doğruyu yanlış öğreten, sevgi ve desteklerini hayatımın her aşamasında hissettiren, verdikleri emek sayesinde beni bugünlere getiren kıymetli babam, annem ve çok sevgili kardeşlerim Mahmut ve Raşit'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda Kisspeptin/KISS1R'nin sağlıklı ve patolojik (obstrüktif olmayan azoospermi) insan testis dokularındaki ekspresyon ve lokalizasyon paterni araştırılmıştır.

Yöntem: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvuran normal ve obstrüktif olmayan azoospermi (NOA) kriterlerine uygun 83 gönüllü hasta çalışmaya dahil edildi. Olgulardan infertilite tanısı için testis doku örneklerinde patolojinin tanımlanmasının ardından immünohistokimyasal olarak, Kisspeptin/KISS1R'nin hücrel lokalizasyon paternleri değerlendirildi. Kontrol ve NOA hastalarından TESE öncesi alınan kan örneklerinden FSH, LH, total testosteron ve serbest testosteron hormon seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Kisspeptin ve KISS1R ekspresyonları, kontrol insan testisinde uzayan spermatidler hariç tüm germ hücrelerinde tanımlandı. Kisspeptin ekspresyonu kontrol, hipospermatogenez ve maturasyon duraksaması gruplarında preleptoten, pakiten ve yuvarlak spermatidlerde nüklear boyanma paterni gösterdi. SCO grubunda Sertoli hücrelerindeki Kisspeptin ekspresyonu anlamlı olarak az bulundu ($p<0,001$). Leydig hücrelerinde Kisspeptinin kontrol ve hipospermatogenez grubunda nüklear ve sitoplazmik iken, SCO grubunda sadece sitoplazmik lokalizasyonu olduğu gözlemlendi. İlginç olarak, Kisspeptinin, SCO sendromuna sahip hastalarda nadir olarak görülen germ hücrelerini işaretlediği izlendi. Bununla birlikte SCO grubundaki Sertoli hücrelerinde anlamlı derece azalış gösteren KISS1R ekspresyonu dikkat çekti ($p<0,001$). Kontrol grubunda Leydig hücrelerinde belirgin sitoplazmik ve nüklear KISS1R ekspresyon mevcuttu. SCO grubunda sadece sitoplazmik boyanma paterni gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmamızla beraber Kisspeptin ve reseptörünün normal ve NOA patolojisine sahip insan testis dokularındaki lokalizasyonları ilk defa tanımlanmış olup, Kisspeptinin, SCO sendromuna sahip hastalardaki oldukça az sayıda görülen germ hücrelerini işaretlemesinden yola çıkarak, Kisspeptinin infertilite tanısında bir biyobelirteç olabileceğini veya gelecekte IVF tedavi yöntemlerinden olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kisspeptin, KISS1R, insan testisi, azoospermi, infertilite

ABSTRACT

Objective: In our study, the expression and localization pattern of Kisspeptin/KISS1R in healthy and pathological (non-obstructive azoospermia) human testicular tissues was investigated.

Method: 83 volunteer patients who applied to the Urology Department of Akdeniz University Faculty of Medicine and who met the criteria for normal and non-obstructive azoospermia (NOA) were included of the study. For the diagnosis infertility from the cases, after the pathology was defined in testicular tissue samples, the cellular localization patterns of Kisspeptin/KISS1R were evaluated immunohistochemically. FSH, LH, and testosterone hormone levels were measured from blood samples taken from control and NOA patients before TESE.

Results: Expressions of Kisspeptin and KISS1R were identified in all germ cells except elongated spermatids in control human testis. Kisspeptin expression showed a nuclear staining pattern in preleptotene, pachytene and round spermatids in the control, hypospermatogenesis and maturation arrest groups. Kisspeptin expression in Sertoli cells was found to be significantly lower in the SCO group ($p < 0.001$). In Leydig cells, Kisspeptin was nuclear and cytoplasmic in the control and hypospermatogenesis groups, while it was only cytoplasmic in the SCO group. Interestingly, Kisspeptin was observed to mark germ cells, which is rarely seen in patients with SCO syndrome. However, KISS1R expression, which showed a significant decrease in Sertoli cells in the SCO group, was remarkable ($p < 0.001$). There was significant cytoplasmic and nuclear KISS1R expression in Leydig cells in the control group. Only cytoplasmic staining pattern was observed in the SCO group.

Conclusion: With our study, the localization of Kisspeptin and its receptor in normal and human testicular tissues with NOA pathology was defined for the first time.

Keywords: Kisspeptin, KISS1R, human testis, azoospermia, infertility

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Erkek Üreme Sistemi	2
2.2. Spermatogenez	2
2.3. Testisin Genel Yapısı	4
2.3.1. Seminifer Tübüller	5
2.3.2. Sertoli Hücreleri	5
2.3.3. Leydig Hücreleri	6
2.4. Germ Hücrelerinin Oluşum Süreci	7
2.4.1. Spermatogonia	7
2.4.2. Spermatositler	8
2.4.3. Spermatidler	9
2.4.4. Spermatozoa	9
2.5. Spermatogenezin Endokrin ve Parakrin Kontrolü	10
2.6. Erkek İnfertilitesi	11
2.7. Azoospermi	12
2.8. Obstrüktif Azoospermi	13
2.9. Obstrüktif Olmayan Azoospermi	13
2.9.1. Hipospermatogenez	14
2.9.2. Maturasyon Duraksaması	14
2.9.3. Sertoli Cell Only Sendromu (SCO)	15

2.9.4. Obstrüktif Olmayan Azoospermide Steroid Hormon Seviyeleri	15
2.10. Kisspeptin ve KISS1R	17
2.11. Kisspeptin ve Erkek İnfertilitesi	21
2.12. Kisspeptin ve Dişi İnfertilitesi	22
2.12.1. Kisspeptin ve Polikistik Over Sendromu	23
2.12.2. Kisspeptin ve Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu	24
2.12.3. Kisspeptin ve Prematür Ovaryan Yetmezliği (POF)	25
2.12.4. Kisspeptin ve Endometriozis	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Doku Takibi	27
3.2. Histopatolojik Analizler	28
3.2.1. Hematoksilen-Eozin (HE) Boyanması	28
3.2.2. Masson Trikrom Boyanması	28
3.2.3. Periyodik Asit-Schiff Boyanması	29
3.2.4. Johnsen Skorlaması	29
3.3. İmmünohistokimya: Kisspeptin ve KISS1R Proteinlerinin Ekspresyon ve Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesi	30
3.4. Steroid Hormon Ölçümleri	31
3.5. İstatistiksel Analizler	31
4. BULGULAR	32
4.1. Histopatolojik Analizler	32
4.1.1. Hematoksilen Eozin Boyanması ile Histopatolojinin Değerlendirilmesi	32
4.1.2. Masson Trikrom Boyanması ile Histopatolojinin Değerlendirilmesi	33
4.2. İmmünohistokimya: Kisspeptin ve KISS1R Proteinlerinin Ekspresyon ve Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesi	35
4.2.1. Seminifer Tübül içindeki Spermatogenik Seride Kisspeptin Protein Ekspresyonunun HSCORE Yöntemi İle Değerlendirilmesi	36
4.2.2. Sertoli hücrelerindeki Kisspeptin Protein Ekspresyonunun HSCORE Yöntemi İle Değerlendirilmesi	38
4.2.3. Leydig Hücrelerindeki Kisspeptin ve KISS1R Proteinlerinin Ekspresyonu	39

4.2.4. Seminifer Tübül içindeki Spermatogenik Seride KISS1R Protein Ekspresyonunun HSCORE Yöntemi İle Değerlendirilmesi	40
4.2.5. Sertoli hücrelerinde KISS1R Protein Ekspresyonunun HSCORE Yöntemi İle Değerlendirilmesi	42
4.2.6. Leydig Hücrelerindeki Kisspeptin ve KISS1R Proteinlerinin Ekspresyonu	43
4.3. Steroid Hormon Değerlendirmeleri	44
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Obstrüktif Olmayan Azoospermiye Sahip Hastalarda Serum FSH Seviyeleri (Ramasamy ve ark., 2009).	16
Tablo 4.1. Kisspeptin ve KISS1R proteinlerinin hücresel lokalizasyonunu gösteren tablo (N:nüklear, S:sitoplazmik, -: immüno reaksiyon yok).	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** Mayozun aşamalarını gösteren erkek gametogenezi (n: kromozom sayısı, c:DNA içeriği). 3
- Şekil 2.2.** Seminifer tübülü gösteren temsili çizim alıntılanmıştır (Ross MH, 2017). 5
- Şekil 2.3.** Sertoli hücrelerinin germ hücreleriyle ilişkisine dair mikrograf görünümü (O'Donnell ve ark., 2022)'den alıntılanmıştır (Sg:Spermatogonia, PS:primer spermatosit, SC:Sertoli hücresi, rST:yuvarlak spermatosit, eST:uzamış spermatid, TJs:sıkı bağlantılar). 6
- Şekil 2.4.** Spermatozoa (Ross MH, 2017; Teves ve Roldan, 2022)'den alıntılanmıştır. 10
- Şekil 2.5.** Erkek ve kadınlarda olası infertilite nedenleri ve sonuçları (Sharma ve ark., 2013)'den uyarlanmıştır. 12
- Şekil 2.6.** Kisspeptin proteini ve formları (Hu ve ark., 2017)'dan uyarlanmıştır. 17
- Şekil 2.7.** KISS1'in KISS1R ile olası etkileşim mekanizması (Wahab ve ark., 2016)'dan uyarlanmıştır. 19
- Şekil 2.8.** Kadın ve erkeklerde Kisspeptin etki mekanizmasının şekilsel gösterimi. (Wahab ve ark., 2016)'dan uyarlanmıştır. 20
- Şekil 3.1.** Johnsen skorlaması metodu (Johnsen, 1970) 30
- Şekil 4.1.** Hematoksilen eozin boyanması. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir. 33
- Şekil 4.2.** Masson trikrom boyanması. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir. 34
- Şekil 4.3.** Periyodik asit-Schiff boyanması. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak

spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir.	35
Şekil 4.4. İmmünohistokimyasal olarak Kisspeptin proteininin ekspresyonu. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir.	37
Şekil 4.5. Kisspeptinin seminifer tübül içindeki germ hücrelerine ait HSCORE analizi.	37
Şekil 4.6. Kisspeptinin Sertoli hücrelerindeki HSCORE analizi (* p=<0,001).	38
Şekil 4. 7. SCO sendromuna sahip hastanın testis kesitinde görülen Kisspeptin immüno-pozitif germ hücrelerine ait 40X büyütme görüntüsü. * işareti, germ hücreleri; siyah ok işareti, Sertoli hücreleri göstermektedir.	39
Şekil 4. 8. Kisspeptin proteinin Leydig hücrelerindeki ekspresyon paterni (H: Hipospermatogenez, MA: Maturasyon duraksaması, SCO: Sertoli Cell Only; N: nüklear; S:sitoplazmik; N+S: nüklear ve sitoplazmik) (*p=<0,05; **p=<0,001).	40
Şekil 4. 9. İmmünohistokimyasal olarak KISS1R proteininin ekspresyonu. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir.	41
Şekil 4. 10. KISS1R'nin seminifer tübül içindeki germ hücrelerine ait HSCORE analizi.	42
Şekil 4. 11. Kisspeptin ve KISS1R'nin Sertoli hücre nükleuslarına ait HSCORE analizi (* p=<0,001).	42
Şekil 4. 12. KISS1R proteinin Leydig hücrelerindeki ekspresyon paterni (H: Hipospermatogenez, MA: Maturasyon duraksaması, SCO: Sertoli Cell Only; N: nüklear; S:sitoplazmik; N+S: nüklear ve sitoplazmik) (*p=<0,05, **p=<0,001).	43
Şekil 4. 13. FSH ve LH Hormon Ölçüm Grafikleri (*p=<0,001).	44
Şekil 4. 14. Total Testosteron ve Serbest Testosteron Hormon Ölçüm Grafikleri.	44

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AMH	: Anti-müllerian hormon
AVPV	: Anteriyo ventral periventriküler bölge
ARC	: Arkuat nükleus
BMI	: Vücut kitle indeksi
Ca²⁺	: Kalsiyum
DAB	: Diaminobenzidine
DER	: Düz endoplazmik retikulum
DAG	: Diaçil gliserol
DM2	: Diabetes mellitus 2
DMN	: Dorsomediyal nükleus
Dyn	: Dinorfin
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
GDP	: Guanozin difosfat
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GPR54	: G protein kenetli reseptör 54
GTP	: Guanozin trifosfat
hCG	: İnsan koryonik gonadotropin hormon
HPG	: Hipogonadal aks
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IUI	: İntrauterin inseminasyon
IVF	: İn vitro fertilizasyon

KISS1	: Kisspeptin
KISS1R	: Kisspeptin reseptörü
KNDy	: Kenedy nöronları
LH	: Luteinize edici hormon
MEK 1/2	: Mitojen aktive protein kinaz
MPOA	: Medial preoptik alan
MRNA	: Mesajcı RNA
NF-kB	: Nüklear faktör kappa B
NkB	: Nörokinin B
NOA	: Obstrüktif olmayan azoospermi
OA	: Obstrüktif azoospermi
OHSS	: Ovaryan hiperstimülasyon sendromu
PAS	: Periodic acid Schiff
PV	: Periventriküler nükleus
PKC	: Protein kinaz C
PKOS	: Polikistik over sendromu
PLC	: Fosfolipaz
POF	: Prematür over yetmezliği
RP3V	: Üçüncü ventrikülün rostral periventriküler bölgesi
SCO	: Sertoli Cell Only sendromu
TESE	: Testiküler sperm ekstraksiyonu
TBS-T	: Tris Buffer Saline
VMN	: Ventromediyal nükleus
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Kisspeptin, ilk olarak melanoma hücrelerinde keşfedilmiş ve kanser hücrelerinin metastaz kapasitesi üzerindeki baskılayıcı etkisinden dolayı ‘metastin’ adını almıştır. KISS1R (GPR54) ise Kisspeptin reseptörü olarak tanımlanmıştır. Kisspeptin/KISS1R sistemi, özellikle üreme sistemi ve kontrolünde rol oynayan hormonal eksenler (HPG aksı) üzerinde etki göstermektedir. Gerek hayvan modelleri gerekse insanda yapılan çalışmalar Kisspeptin/KISS1R sisteminin puberteye giriş, cinsiyet olgunlaşması gibi üreme sisteminin gelişimi ve normal fonksiyonlarının devamı için önemli bir fonksiyona sahip olduğunu işaret etmektedir. Kisspeptin/KISS1R sisteminin periferik dokularda varlığına dair birçok çalışma raporlanmış olup, özellikle de insan dışında farklı türlere ait Leydig hücre fizyolojisi ve steroid biyosentezi, spermatogenezin ilerlemesi ve spermatozoa fonksiyonları araştırılsa da testis içindeki rolü halen tartışma konusudur. Bu nedenle Kisspeptin/KISS1R, üreme sistemi fonksiyonları üzerindeki etkisinden dolayı yakın dönem çalışmalarında önemli bir odak noktası haline gelmiştir. Tez çalışmamızda sağlıklı insan testis dokularının yanısıra histopatolojik olarak tanısı konulan, hipospermatogenez, maturasyon duraksaması ve Sertoli cell only patolojilerine sahip obstrüktif olmayan azoospermi hastalarından alınan testis dokularında Kisspeptin/KISS1R proteinlerinin “somatik/germ hücrelerindeki ekspresyon paterni” ortaya koyulmuştur. Çalışmamız, obstrüktif olmayan azoospermi tanısı almış hastalara ait testis örneklerinde, Kisspeptin/KISS1R ekspresyonlarına dair ilişkinin araştırıldığı öncü çalışmalardan birisi olma özelliğini taşımaktadır. Ayrıca, infertilite ön tanısı almış bu hastalarda Kisspeptin/KISS1R sisteminin anlaşılması ileride terapötik bir tedavi seçeneğinin olmasının yanısıra hastalığın tanı aşamasında da göz önünde bulundurulabilecek bir biyobelirteç olma potansiyelini de taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, haploid gamet hücresinin spermatazoaya kadar devamlı üretiminden, beslenmesinden ve geçici olarak depolanması ile seks hormonlarının sekresyonundan sorumludur. Bu sistem karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alan yaklaşık 40'ar gram olan iki testis, spermatozoanın taşınmasından sorumlu kanallar olan epididimis, vas deferens (duktus deferens), ejakülatuar kanal, üretra ve seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretral bezlerden oluşur (Ross MH, 2017).

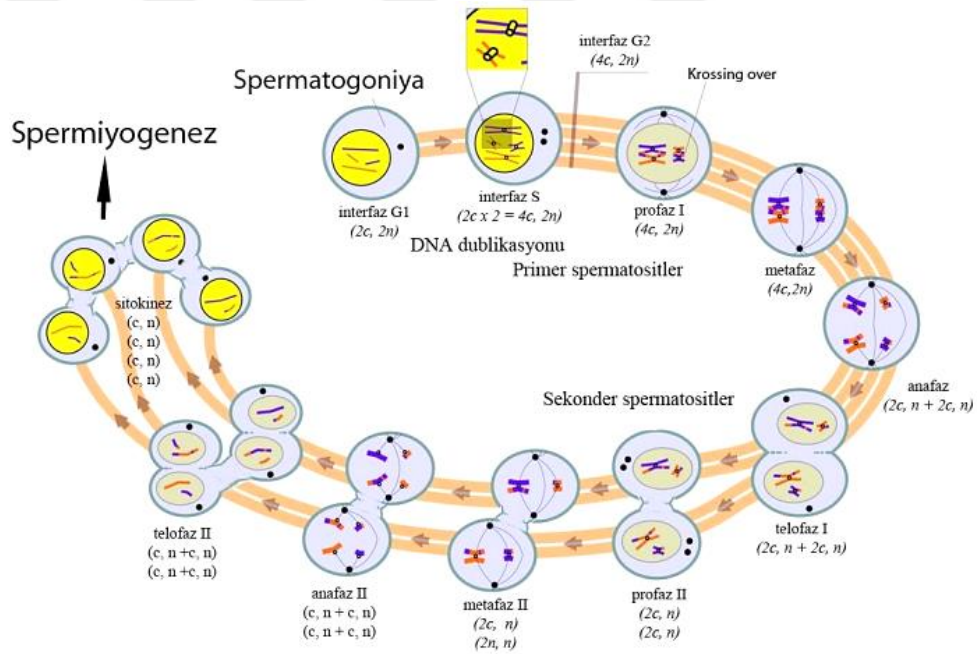
Epididimis üç bölüme ayrılır: kaput, korpus ve kauda. Testislerden gelen 13-15 efferent kanal, epididimisin başında tek bir kanalda birleşir. Epididimisin dışındaki epididimal kanal duktus deferens olarak devam eder. Spermatozoa epididimisten geçerken olgunlaşır ve ardından epididimisin kauda kısmında fertilizasyon yeteneği kazanır (Johnson ve ark., 1980). Ekstragonadal sperm rezervleri, toplam sperm rezervlerinin sırasıyla %62 ve %7'sini içeren kauda epididimiste ve duktus deferenste bulunur (Amann ve ark., 1993). Epididimisin kaudasının bölgeye özgü koşulları, olgun spermatozoayı hareketsiz bir durumda tutar; ejakülasyonun seminal plazma ile birleşmesi sonrası, spermatozoanın metabolik aktivitesi artar. Epididimis çiftinde toplam 15 ila 25 milyar sperm toplanabilir (Guimaraes ve ark., 2012). Morfolojik bozukluklar ve viabilite açısından ejakülat ve epididimal spermatozoa arasında fark yoktur (Guimaraes ve ark., 2012). Epididimal kanaldan geçen spermatozoa vas deferens ile prostat bezine yönelir.

Seminal veziküller ve prostat seminal sıvının çoğunu üretir ve fonksiyonları androjenler tarafından düzenlenir. Seminal veziküller fruktozdan zengin visköz bir sıvı salgılar. Salgısı insan seminal sıvısının %50-70'ini oluşturur. Prostat bezinin salgı ürünleri prostat özgün asit fosfataz, prostat özgün antijen, amilaz ve fibrinolizindir.

2.2. Spermatogenez

Spermatogonyumlar bazal membran üzerinde yerleşimlidir. 13 değişik aşama gösteren germ hücreleri lümene doğru yerleşimlidir (Şekil 2.1.). Spermatogonia ve Sertoli hücreleri bazal membrana yapışıktır. TipA spermatogonia, Tip A₁ ila Tip A₄ hücrelerinden

farklılaşmak için mitotik hücre bölünmeleri geçirirken, tip A₄ hücrelerinin bazıları, daha sonra tip B spermatogoniayı oluşturmak üzere bir kez bölünen ara spermatogoniaya farklılaşır. Tip B spermatogoniyalar tetraploid primer spermatositlere dönüşür. Ardından mayoz I ile diploid sekonder spermatositler oluşur. Mayoz II'nin tamamlanmasından sonra, her bir sekonder spermatositten 2 haploid spermatid oluşur. Tip A₁ spermatogoniyasının spermatidlere geçişi ile bağlantılı hücre bölünmeleri ve olgunlaşma sırasında, germ hücreleri bazal membrandan seminifer tübülün lümen tarafına göç eder. Daha sonra, spermatidler, nükleusun yoğunlaşmasını ve uzamasını, akrozomun biyogenezini içeren spermiyogenez ile spermatozoaya dönüşür (Nishimura ve L'Hernault, 2017).



Şekil 2.1. Mayoz bölünme aşamalarını gösteren erkek gametogenezi (n: kromozom sayısı, c:DNA içeriği).

(<http://www.embryology.med.unsw.edu.au>, Erişim tarihi: 15.05.2022)' alıntılanmıştır.

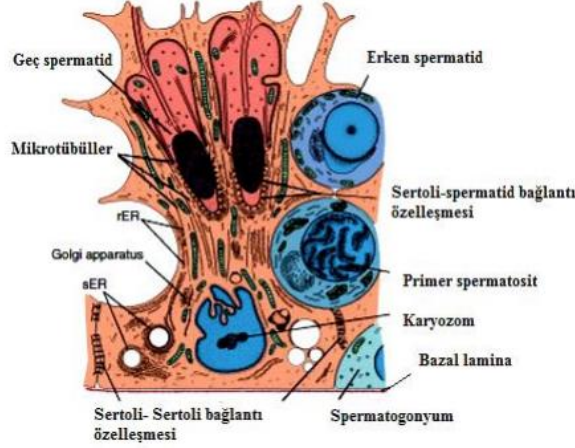
2.3. Testisin Genel Yapısı

Memelilerde testisler sperm üretimi ve steroidlerin sentezinden sorumlu bir çift organdır. Her testis tunika albuginea adı verilen bağ dokusu ile çevrilidir (Clermont, 1972). Tunika albuginea düz kas fibrillerini içeren sıkı bağ dokusundan oluşmuştur. Tunika albugineanın iç yüzeyi, gevşek bağ doku karakterindedir ve damarca zengin bir bölge olan “tunika vasküloza” ile komşudur (Holstein ve Weiss, 1967). Tunika albugineanın iç yüzeyindeki bağ dokusu septası “mediastinum” bölgesine uzanır. Bağ dokusundan oluşan bu bölgenin içinde kanal ağı görünümünde olan “rete testis” vardır. Testis yaklaşık 250-300 lobülден oluşur ve her lobül 1-4 seminifer tübül içerir (Şekil 2.2.) (Huckins ve Clermont, 1968). Seminifer tübül iki hücre popülasyonundan oluşur; Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler. Tübüller arası doku düzeni türler arasında değişiklikler gösterir; kan damarlarını, lenfatikleri ve sinir liflerini içermektedir. Tübüller arası dokudaki interstisyel alandaki bulunan Leydig hücreleri, damarlar ve seminifer tübüllerin “lamina propriyası” ile ilişkili gruplar halinde bulunur. Yaklaşık 50 cm uzunluğunda, 150-250 µm çapındaki seminifer tübüllerin dışında ise, peritübüler “miyoid hücreler” adı verilen modifiye düz kas hücreleri vardır.

“Spermatik kord” testisteki kan damarlarını, “vas deferens” ise lenfatik ve sinirleri ifade eder. “Pampiniform pleksus” zengin ven kümesinden oluşmaktadır. Ve bu yapı testis üzerinde testiküler arteri çevreleyip bu arterle kaynaşıp spermatik korda uzanmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda pampiniform pleksus karmaşık bir damar sisteminden oluşur. Bu sistem, kanı testise girmeden önce soğutup testisten vücuda dönen kanı ısıtmaktadır. Bu sistem testise giden arteriyal kan basıncını da kontrol eder. Testiküler venler kapakçıklara sahiptir.

2.3.1. Seminifer Tübüller

Testis hacminin yaklaşık %85 ila 90'ını oluştururlar, germ hücreleri ve bunları destekleyen Sertoli hücrelerini içerirler.



Şekil 2.2. Seminifer tübülü gösteren temsili çizim alıntılanmıştır (Ross MH, 2017).

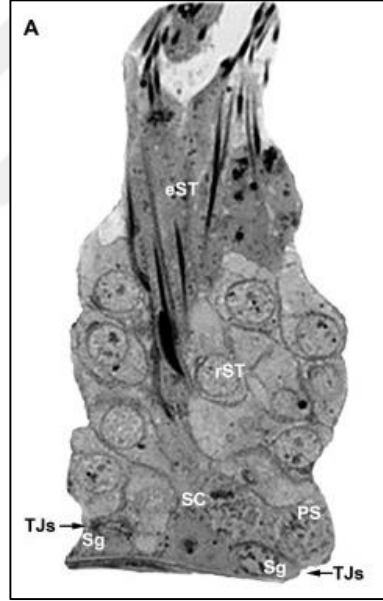
2.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, ilk olarak 1865'de İtalyan Enrico Sertoli tarafından gözlemlenmiş ve onun adını almıştır. Sertoli hücreleri sperm üretimi için gerekli olan önemli somatik hücrelerdir. Seminifer tübülün bazolateral kısmına yakın büyük, sıkıca bağlı hücreler olarak tanımlanır (Wong ve Khan, 2021). Erişkin Sertoli hücreleri, seminifer tübülün bazal membranıyla temas eden düzleştirilmiş bir yüzeye ve çok sayıda lateral ve apikal uzantıya sahip geniş bir sitoplazmaya sahiptir (Russell ve ark., 1990). Sertoli hücreleri dinamiktir ve spermatogonia, spermatosit ve haploid spermatidler ile herhangi bir zamanda beş farklı germ hücresinin gelişimini destekleyebilir (Şekil 2.3.).

Sertoli hücreleri, doğrudan temas yoluyla ve seminifer tübül içindeki fizyolojik ortamı kontrol ederek germ hücrelerinin spermatozoaya ilerlemesini sağlar (Griswold, 1998). Sertoli hücreleri ayrıca androjen bağlayıcı protein (ABP), Inhibin B ve Aktivin gibi pek çok önemli molekül salgılar. Bu salgılar, hormonal negatif geribildirim ile doğrudan veya dolaylı olarak spermatogenezi kolaylaştırır. Sertoli hücreleri ayrıca, spermatogenez sürecini başlatmak için FSH gibi hipofiz hormonlara yanıt verir. Sertoli hücrelerinin erkeklerde çok sayıda hayati üreme işlevi vardır (Wong ve Khan, 2021). Büyümeleri ve beslenmeleri için gerekli maddeleri salgılayarak spermatogoninin büyüme ve

gelişmesinde önemli bir rol oynarlar (Yang ve ark., 2008). Sperm üretimi normal olmasına rağmen Sertoli hücrelerinin testiste bulunmaması infertiliteye yol açabilir (Wong ve Khan, 2021).

Sertoli hücreleri, puberte öncesi testiste peritübüler miyoid hücre gelişiminin desteklenmesi, testis damar sistemi işlevinin desteklenmesi ve diğer testis somatik hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde de görevlidir (O'Donnell ve ark., 2022). Sertoli hücreleri, spermatogenez sürecini düzenlemek için sürekli şekil ve işlev değiştirme yeteneğine sahiptir (Franca ve ark., 2016). Sertoli hücresi başına germ hücrelerinin gerçek sayısı, türler, tübüller içindeki Sertoli hücrelerinin yoğunluğu, puberte öncesi optimal Sertoli hücre gelişimi, hücre tipleri ve türler arasında değişebilen germ hücre apoptoz seviyeleri ve çeşitli faktörlere bağlıdır (O'Donnell ve ark., 2022).



Şekil 2.3. Sertoli hücrelerinin germ hücreleriyle ilişkisine dair mikrograf görünümü (O'Donnell ve ark., 2022)'den alıntılanmıştır (Sg:Spermatogonia, PS:primer spermatosit, SC:Sertoli hücresi, rST:yuvarlak spermatosit, eST:uzamış spermatid, TJs:sıkı bağlantılar).

2.3.3. Leydig Hücreleri

Franz Leydig, 1850'de memeli testisinde testiküler hormon kaynağı olan bir grup hücre tanımladı. Ve bu hücrelere Leydig hücreleri adını verdi. Leydig hücreleri testisin interstisyel kompartmanında kan damarlarının etrafında bulunur ve erkeklerde androjenlerin ana kaynağıdır. Eozinofilik sitoplazma ve büyük nükleusa sahip, yuvarlak şekilli hücrelerdir (Treuting PM, 2018). Leydig hücreleri, tübüler kristalli

mitokondriyonlar, lipid damlacıkları ve iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum (DER) içerir. Bol miktarda DER'e sahip olmaları bu hücrelerin eozinofilik olmasının nedenidir. Ayrıca kolestrolde testosteron sentezlenmesi için gereken enzimler DER ile ilişkilidir (Ross MH, 2017). Memelilerde Leydig hücreleri iki farklı tiptedir. Bunlar, fetal ve neonatal zamanda erkeğe ait primer seks karakterlerinin oluşturan fetal tipteki Leydig hücreleri ve pubertal erkeğe ait özelliklerden sorumlu olan yetişkin tipteki Leydig hücreleridir (Haider, 2004). Yetişkin Leydig hücrelerim üreme fonksiyonu için gerekli olan testosteronu üretir (Habert ve ark., 2001). Leydig hücreleri hipofizden salgılanan LH hormonun düzenlemesi altında testosteronu sentezler ve salgılar (Treuting PM, 2018).

2.4. Germ Hücrelerinin Oluşum Süreci

Birçok hayvan türünde, spermatogenik hücreler yalnızca belirli hücreler ile ilişkilidir. Örneğin, farelerde her bir spermatogonyum farklı biri ile aynı anda gelişebilir, dolayısıyla herhangi bir zamanda seminifer tübül kesiti incelendiğinde, spermatogonyumdan spermatozoaya kadar olan tüm hücre serisi beraber görülür. Bu döngüye “spermatogenik siklus” denir. Fare seminifer tübüllerinde 12 evre tanımlanmıştır. Her evre spermatid hücreleri, spermatositler ve spermatogonia hücrelerinin bulunması ile karakterizedir. İnsan seminifer tübülünün kesitleri incelendiğinde, farklı spermatogenik sikluskıdaki hücrelerin varlığı veya germ hücrelerinin birbirleri ile olan ilişkisinin ile beraber düzensizlik göze çarpmaktadır. Bu karmaşık düzenlemeyi kontrol eden mekanizmalar net olarak bilinmesede, parakrin/otokrin mekanizmaların etkili olduğu tahmin edilmektedir.

2.4.1. Spermatogonia

Diploid sayıda kromozoma sahip spermatogonia, seminifer tübülün bazal membranı üzerinde lokalizedir ve sürekli olarak mitoz bölünmeler geçirip diğer spermatogoniayı veya farklılaşma sürecine ile primer spermatositleri oluşturur. Spermatogonia üç tiptedir; tip A (A_0 , A_1 , A_2 , A_3 , A_4), ara form ve tip B spermatogonia. Spermatogonyumların gösterdiği mitoz bölünmeler random (A_0 ile sonuçlanır) ya da senkronizedir. Her bölünme sonrası, kardeş hücreler arasındaki sitoplazmik bağlantılar görülür. Tip B spermatogonia, spermatosite farklılaşır. Spermatogonia bölünmelerinin mitotik kinetiğı oldukça komplekstir ve günümüzde hala tartışılan bir konudur (De Rooij ve ark., 1989; Ehmcke ve ark., 2005).

2.4.2. Spermatozitler

Spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan spermatozitler, mayoz bölünme geçiririp, haploid sayıda kromozoma sahip dört tane spermatid oluşturur. Önce homolog kromozomlar rastgele ayrılır, ardından, homolog kromozomlar arası crossing over meydana gelir. Bu iki olay türlerin çeşitliliğini sağlar.

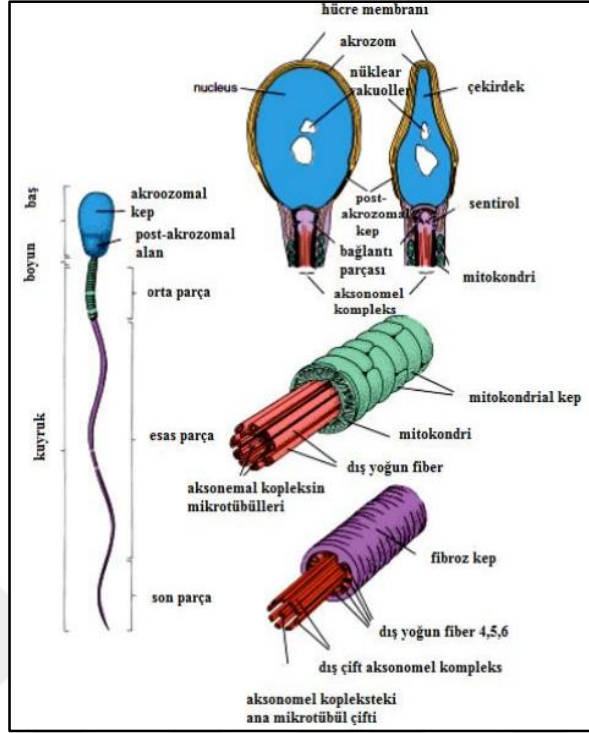
Mayoz bölünmenin profaz aşaması; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez olmak üzere bölümlere ayrılır. Spermatozit hücreleri birinci mayoz bölünmede profaza girdiklerinde, tübülün membranından lümenine doğru ilerler. Homolog kromozomlar yan yana geldikleri aşama olan zigoten aşamasında ise, bazal membrandan ayrılırlar. Pakiten aşaması, profaz evresinin en uzun sürecidir. Bu nedenle geçen bu zamanda spermatozitlerin olası bir hasara uğrama ihtimalleri daha yüksektir. Primer spermatozitler diploid kromozom ve DNA miktarı ($2n / 4DNA$) taşır. Birinci mayoz bitiminde bu miktar yarıya düşer. Birinci mayozda genetik materyal değişimi “kiazma” noktalarında olur. Her primer spermatozit iki sekonder spermatozit oluşturur. Bu sekonder spermatozitler çok kısa sürede varlıklarını sürdürür. Ardından ikinci mayoza giderek iki spermatid oluşturur. Mayoz sırasında, kromozomlardaki DNA replikasyonu, kondenzasyon ve transkripsiyon zamanlamaları, somatik hücre kromozomlarına göre değişiklikler gösterir. Sekonder spermatozit hücreleri 2. mayoz bölünmeyi geçirerek, kromozomlarındaki $2DNA$ 'yı ikiye böler.

2.4.3. Spermatidler

Mayoz bölünmeler sonucun meydana gelen spermatidlerin gelişimi, değişimi ve seminifer tübülün lümenine spermiyum şeklinde bırakılması sürecine “spermiyogenez” denilir. Spermiyogenez süreci oldukça önemlidir. Spermatid hücresi, yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal olarak değişikliklere uğrar ve spermatozoayı oluşturur. Bu değişimin mekanizması hala açıklanamamıştır (Ehmcke ve ark., 2005). Bu süreçte meydana gelen değişiklik, bu hücrelere özgü olaylardır. Spermiyogenez süreci senkronize ve aynı zamanda entegredir. Dolayısıyla bu süreçte oluşan küçük değişimler bile infertiliteye sebep olabilir.

2.4.4. Spermatozoa

Spermatozoa, iki ana yapıya sahip, farklılaşmış ve polarize bir hücredir. Haploid bir nükleus ve akrozomal ekzositotik granül içeren baş ve enerji üreten, hücreyi iten kuyruk yapısı bulunur (Şekil 2.4.). Bu yapılar boyun ile birbirine bağlıdır. Spermin temel amacı, fertilizasyona katılmak, böylece gelişimi harekete geçirmektir (Teves ve Roldan, 2022). Sperm başında nükleus ve akrozom adı verilen bir ekzositotik granül bulunur. Bir boyun veya bağlantı parçası, sperm başını kuyruğa bağlar ve sentriyolleri içerir. Flagellum, orta parça ile ana ve son parçalardan oluşur ve genellikle ATP formunda enerji üretecek mitokondrilere sahiptir. Aynı zamanda yüzme için itici gücü de sağlar (Avidor-Reiss, 2018; Teves ve Roldan, 2022).



Şekil 2.4. Spermatozoa (Ross MH, 2017; Teves ve Roldan, 2022)’den alıntılanmıştır.

2.5. Spermatogenezin Endokrin/Parakrin Kontrolü

Hipofizden salınan gonadotropinlerinden olan, FSH ve LH spermatogenezin temel düzenleyicileridir. LH, seminifer tübüller arasındaki intersitisyel dokuda bulunan Leydig hücrelerini uyarıp ve androjenin üretimini sağlar. Androjenin temel işlev gösterdiği hücreler Sertoli hücreleridir. Kaliteli, tamamlanmış spermatogenez için hem FSH hem de LH gereklidir. Bu mekanizmayı genellemek, türler arası belirgin farklar olduğu için zordur. Ayrıca pek çok çalışmada deney hayvanı kullanılmasına karşın insan çalışmaları daha sınırlıdır. Önemli olarak testisin biyokimyası, fizyolojisi homojen dağılımlı değildir.

Testiste çeşitli hücre tiplerinin görevleri birbirleriyle bağlantılıdır. Leydig hücresinin ürettiği testosteron, peritübüler miyoid hücreler ve Sertoli hücrelerinde etkisini gösterir. Bu şekilde germ hücrelerinin gelişimi etkiler. Dolayısıyla, testosteron sekresyonu testis dokusundaki endokrin etkilerden ziyade parakrin ürün ekinde görev yapar (Sharpe, 1984).

Germ hücreleri ve Sertoli hücresi arasındaki ilişki şimdiye kadar tamamen açıklanamamış da olsa pakitendeki spermatosit hücreleri, Sertoli hücrelerini uyarak “androjen bağlayıcı

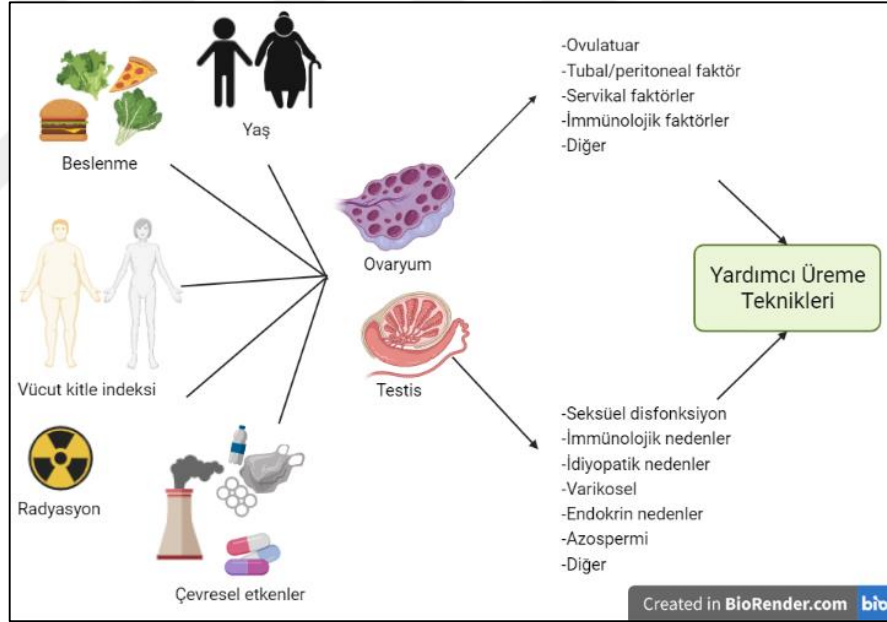
protein” üretimini ve aynı zamanda “adenilat siklaz” aktivitesini de uyarırlar. Sertoli hücreleri aynı zamanda testis içindeki düzenleyicilerden olan “transferin” ve “insülin benzeri büyüme faktörünü” üretir. Sertoli hücrelerinde üretilen parakrin düzenleyicilerin etkileri, seminifer epiteldeki siklus tarafından düzenlenir. Sonuçta, germ hücrelerinin büyüme ve farklılaşması, somatik/germinal hücreler arasındaki kompleks iletişimi içerir. Bu ilişkiler, endokrin, parakrin ve otokrin olmak üzere üçe ayrılır. Bu mekanizmalar, testisin doğal fonksiyonu için iyi denge gösterir.

2.6. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, bir çiftin on iki aylık düzenli korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebe kalamaması olarak tanımlanmaktadır ve dünya genelinde çiftlerin %10-15’i infertildir (Tamrakar ve Bastakoti, 2019). Bu oran dünyada bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Asya, orta/doğu Avrupa, doğu/ kuzey Afrika gibi bölgelerde %30’a ulaşmaktadır. Bu oranlar dünya çapında 186 milyondan fazla çiftin infertil olduğu göstermektedir (Inhorn ve Patrizio, 2015). Yaş, egzersiz, psikolojik stres, çevresel ve mesleki maruziyetler, sigara içme alışkanlıkları, vücut kitle indeksi (BMI), yaşam tarzı ve çevresel faktörler gibi parametreler infertiliteye yol açan başlıca risk faktörleri olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.5.) (Sharma ve ark., 2013). Cinsiyete bağlı olarak infertilite oranları ülkelerin gelişmişlik düzeylerine göre değişmekteyken, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre tüm infertilite vakalarının %20’sinin erkek faktöründen, %38’inin kadın faktöründen, %27’sinin hem erkek hem kadın faktörünün birlikte bulunduğu ve %15’inin ise açıklanamayan nedenlerden kaynaklandığı rapor edilmiştir. İnfertilite, primer ve sekonder olmak üzere iki alt kategoride tanımlanmaktadır. Daha önce hiç gebelik oluşmamışsa primer infertilite, canlı doğumla sonuçlansın ya da sonuçlanmasın en az bir gebelik oluşmuş ve şu an gebelik elde edilemiyorsa sekonder infertilite olarak tanımlanır (Zegers-Hochschild ve ark., 2017). 48,5 milyon infertiliteye sahip çiftten 19,2 milyonunun primer infertiliteye, 29,3 milyonunun ise sekonder infertiliteye sahip olduğu bildirilmiştir (Starc ve ark., 2019).

Erkek infertilitesinin pek çok nedeni olmakla birlikte erkek infertilitesi ile ilişkisi bilinen genetik, hormonal ve obstrüktif nedenler dışında kalan vakalar idiyopatik erkek infertilitesi olarak tanımlanmaktadır. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde, tıbbi

öykü, fiziksel muayene, semenin analizi, genetik test ve endokrin testler önemlidir (Cooper ve ark., 2010). İnfertilitenin değerlendirilmesine önce öykü alımı ile başlanır, ardından fiziksel muayene ve başlangıç laboratuvar test incelemeleri yapılır. Hikaye, fiziksel inceleme ve laboratuvar sonuçları sonucuna göre ayırıcı tanı için spesifik testler yapılır. Değerlendirmede temel amaç infertiliteye sebep olan durumların tespit edilmesidir. İnfertiliteye sebep olan özel bir neden varsa tedaviler buna yönelik düzenlenir. Ancak olguların çoğunda infertilite idiopattır. Bilinen bir etiyolojik faktör saptanamıyor ise deneysel tedavi, intrauterin inseminasyon (IUI) ve in vitro fertilizasyon (IVF) tedavi yöntemleri kullanılır. İnfertil erkeklerde %2-8 alta yatan neden genetik anormallikler iken bu sayının azospermide %15'e yükseldiği tahmin edilmektedir (Das ve ark., 2017).



Şekil 2.5. Erkek ve kadınlarda olası infertilite nedenleri ve sonuçları (Sharma ve ark., 2013)'den uyarlanmıştır.

2.7. Azoospermi

Semende sperm bulunmaması durumudur. Azoospermi söz konusu ise tedavisiz doğal yollardan çocuk sahibi olabilme şansı yoktur. Ancak azoospermi tanısı konulabilmesi için 2 hafta ara konularak, en az 2 kere semen örneği verilmesi ve bu örneklerin tecrübeli bir embriyolog tarafından taranması ve teyit edilmesi zorunludur. Azoosperminin spermatogenezdeki anormallikler, hormonal dengesizlikler ve genetik değişiklikler dahil

olmak üzere spesifik veya çoklu fiziksel ve fizyolojik faktörlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Das ve ark., 2017).

Azoospermi 2 başlık altında incelenmektedir, obstrüktif azoospermi (OA) ve obstrüktif olmayan azoospermi (NOA). Bu iki grup etiyoloji ve tedavi olarak çok farklıdır. Ayrıntılı öykü ve fizik muayene ile belirtilen laboratuvar ve genetik testlerine bağlıdır (Wosnitzer ve ark., 2014).

2.8. Obstrüktif Azoospermi

Obstrüktif azoospermi, azoosperminin % 40'ından sorumludur ve rete testis ile ejakülatuvar kanallar arasında herhangi bir yerde birçok nedenden dolayı kanalların tıkanmasından kaynaklanır (Wosnitzer ve Goldstein, 2014). Bununla birlikte, enfeksiyon, konjenital anomaliler veya iyatrojenik yaralanmadan da kaynaklanabilir (Baker ve Sabanegh, 2013). Obstrüktif azoospermi, tarih/fizik muayene, laboratuvar testi, genetik testler ve görüntüleme çalışmalarının bir kombinasyonu ile teşhis edilir (Wosnitzer ve ark., 2014). Obstrüktif azoospermi tanısına sahip erkekler için, birkaç cerrahi sperm elde etme tekniği, yardımcı üreme teknikleri ile gebe kalmayı kolaylaştırabilir. Sperm elde etmeye yönelik yaklaşımlar, cerrahi mikroskop kullanımı, in vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu gibi teknikleri içermektedir (Akerman ve ark., 2020).

2.9. Obstrüktif Olmayan Azoospermi

Obstrüktif olmayan azoospermi (primer ve sekonder testisküler yetmezliği içeren), klinik değerlendirme (testis yoğunluk / hacmi), laboratuvar (FSH) ve genetik testleri (karyotip, Y kromozom mikrodelsiyonu veya hipogonadotropik hipogonadizm için spesifik genetik test) ile OA'dan ayrılır (Wosnitzer ve ark., 2014). Obstrüktif olmayan azoospermi, moleküler temeli büyük ölçüde bilinmeyen çok faktörlü bir hastalıktır ve bugüne kadar, NOA hastalarında çeşitli genlerde mutasyonlar tanımlanmıştır (Nakamura ve ark., 2017). Obstrüktif olmayan azoospermi, azoosperminin daha şiddetli bir şeklidir ve üreme sistemindeki doğuşsal veya gelişimsel bozukluklardan, genetik anomalilerden, endojen ve/veya ekzojen testis hareketlerinden ve spermatogenez sırasında kritik önem taşıyan genlerdeki ekspresyon değişikliklerinden kaynaklanabilir (Safran ve ark., 1998). Obstrüktif azoospermi tedavisi mikrocerrahi rekonstrüksiyonu içerirken,

rekonstrüksiyona uygun olmayan vakalar için in vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF ve ICSI) ile mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu kullanılır (Wosnitzer ve ark., 2014). Son yıllarda NOA hastalarında spermatogonial kök hücre transplantasyonu çalışmaları mevcut olsa bile bu yöntemin hala deneysel olmasının yanı sıra kök hücrelerin kullanımı ve gen tedavisi için hem teknik hem de etik açıdan çeşitli sınırlamalar vardır (Hendriks ve ark., 2014). Obstrüktif olmayan azospermi üç farklı grupta sınıflandırılır: hipospermatogenez, maturasyon duraksaması ve SCO (Marques ve ark., 2017).

2.9.1. Hipospermatogenez

Germ hücre aplazisi olarak da bilinir. Seminifer tübül başına düşen germ hücrelerinde azalış olarak tanımlanmaktadır. Maturasyon zinciri normaldir. Spermatogonia, spermatositler, spermatidler ve spermatozoa dahil tüm basamaklarda yaklaşık yarı yarıya azalma vardır ancak az sayıda dejeneratif hücre görülmektedir. Hipospermatogenezdeki hata, germ hücrelerinin farklılaşma hattına girmesini engelleyen kök hücre popülasyonudur. Ancak hücreler bu farklılaşma çizgisine gelmiş olduklarında spermatogenez normal olarak ilerlemektedir (Soderstrom ve Suominen, 1982). Yapılan bir çalışmada, idiyopatik hipospermatogenez olan infertil hastalar arasında, spermatogonial hücrelerde proliferasyon bozukluğu görülmüştür; ancak spermatogonial proliferasyonun ardından spermatogenezde neredeyse normal farklılaşma gösteren hastalar (tüm hastaların %8'i) da gözlemlenmiştir (Takagi ve ark., 2001). 2010 yılında yapılan bir çalışmada ise uzun süreli radyasyona maruziyetin hipospermatogenez ve maturasyonda duraksamaya neden olduğu belirtilmiştir (Meo ve ark., 2011). Ayrıca hipospermatogenez tanısına sahip erkeklerden elde edilen testiküler spermatozoa metilasyon kusurları taşımaktadır (Marques ve ark., 2010). İdiyopatik hipospermatogenezin nedenleri belirsizliğini korusa da tüm bu çalışmalar muhtemelen heterojen olduğunu göstermektedir.

2.9.2. Maturasyon Duraksaması

Gonadotropin yetersizliği durumunda veya kemoterapi ve radyoterapiye bağlı germ hücre hasarı sonrasında spermatogonial düzeyde meydana gelebilir. Sıklıkla primer spermatosit düzeyinde görülür. Bu seviyedeki geri dönüşümlü duraksama, ısı, enfeksiyonlar,

hormonal ve beslenme faktörlerine bağlı olabilir. Primer spermatosit veya spermatid düzeyinde geri dönüşümsüz duraksama, gerek somatik hücrelerde gerekse germ hücrelerinde kromozom anomalileri nedeniyle genetik kökene sahiptir (Martin-du Pan ve Campana, 1993). Spermatogenezin normal tamamlanması için nakavt modellerinin kullanılmasıyla beraber gerekli olan 300'den fazla gen tanımlanmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler insan erkek fertilitesinde çeşitli işlev bozuklukları ile ilgili olabilecek aday genlerin tanımlanmasına izin vermiştir. Maturasyon duraksaması olan ve normal FSH seviyelerine sahip hastalarda, diğer NOA patolojisine sahip hastalara kıyasla daha yüksek kromozomal anormali ve Y kromozom mikrodelesyonu insidansına sahiptirler (Hung ve ark., 2007). Maturasyon duraksaması patolojisi temelinde yatan nedenler araştırılmaya devam edilmektedir.

2.9.3. Sertoli Cell Only Sendromu (SCO)

Sertoli hücreleri, spermatogenezin düzenleyicilerindendir. Spermatogonial kök hücre nişinin ve spermatogonial popülasyonların korunmasında görevlidir. Spermiyogeneze ve spermiyasyon sırasında olgun spermatidlerin nihai salınımına kadar germ hücre gelişimi için gereklidir.

Del Castillo sendromu veya germ hücre aplazisi olarak da bilinen SCO, tipik olarak 20 ila 40 yaş arasındaki erkeklerde görülmektedir. Bu sendromda, sadece Sertoli hücreleri vardır ve testisin seminifer tübüllerini kaplar. Bu sendroma sahip hastalarda spermatogenez çok düşüktür veya yoktur. Bu hastalar tipik olarak fizik muayenede normaldir. Tanı genellikle testis biyopsi bulgularına göre konur (Ramphul ve Mejias, 2021).

2.9.4. Obstrüktif Olmayan Azoospermide Steroid Hormon Seviyeleri

Hipofiz bezinden salınan FSH ve LH testiste sperm üretimini ve testosteron üretimini sağlamaktadır. Sertoli hücrelerinin salgıladığı inhibin ve Leydig hücrelerinin salgıladığı testosteron hormonu negatif feed-back mekanizması ile FSH, LH salgılanmasını baskılayıp, spermatogenezdeki hormon seviyelerinin dengede kalmasını sağlar. Sperm üretiminde baskıya sebep olan anomali gelişirse inhibin seviyesi düşer ve buna bağlı FSH seviyesi artar. Bu nedenle serum FSH seviyelerindeki artış, azalmış spermatogenez ile doğrudan ilişkilidir (Ramasamy ve ark., 2009) (Tablo 2.1.). Ancak bu durum testis içerisinde sperm üretiminin olmadığını göstermemektedir.

Tablo 2.1. Obstrüktif Olmayan Azoospermiye Sahip Hastalarda Serum FSH Seviyeleri (Ramasamy ve ark., 2009).

	Serum FSH Seviyeleri (IU/ML)			
	<15	15-30	31-45	>45
N	245	360	124	63
Yaş	34±7	36±7	38±7	37±7
FSH ortalaması	9,0±4,1	21,9±4,0	36,5±4,0	63,5±22,8
Histopatoloji (n)	127	314	102	58
Hipospematogenez	28%	23%	16%	22%
Maturasyon Duraksaması	38%	16%	16%	28%
SCO	34%	61%	68%	50%

FSH hormonu spermatogenez, LH ise testosteron üretimi açısından oldukça önemlidir. İnfertilitenin nedeninin hipofiz salgısından (FSH, LH hormonları) kaynaklı mı yoksa testisteki fonksiyonel bozukluktan mı köken aldığının ayırımını steroid hormon seviyelerine göre yapılmaktadır. FSH seviyelerini yükselmesi, LH ve testosteron hormonu seviyelerinin normal olması hipofiz ile ilgili herhangi bir sorun olmadığını ve Leydig hücrelerinin testosteron üretimini yapabildiğini göstermektedir. FSH seviyesinin yüksek olması ise sperm üretiminde bir sorun olduğunu işaret eder. Bu şekilde görülen hormon seviyeleri genelde Azoospermik factor c (AZFc) delesyonuna bağlıdır. Bu durum, sperm üreten hücrelerde mitoz veya mayoz bölünmede maturasyon duraksama (erken spermatosit, spermatosit) sorunlarında görülür.

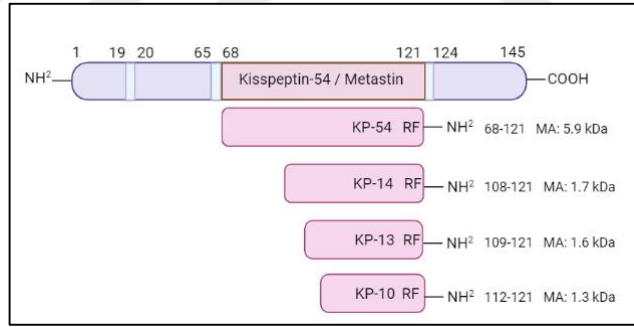
FSH, LH ve testosteron hormonlarının normal sınırlarda olması ve normal semen miktarı ise sperm kanallarında tıkanıklık ve sperm üretiminde ileri dönemdeki duraklamaya (spermatid) bağlı sperm üretim bozuklukları sebebiyle azospermiye neden olabilir. Bu durum birbirin klinik bulgularla ayrılamaz. Bu yüzden testis biyopsisi yapılarak testis içerisindeki sperm varlığı değerlendirilir.

Yüksek FSH ve LH hormonları ile düşük testosteron seviyelerinin olduğu vakalarda ise hipofiz bezi sperm yapımını ve testosteron üretiminin düzenlenmesi için çok fazla miktarlarda hipofizer hormon üretimine geçmiştir. Bu sorun hipofiz kaynaklı değildir, testis kaynaklıdır. Örneğin, bu durum Klinefelter sendromlu erkeklerde ve kabakulak hastalığı sonucu orşit geçirmiş olan erkeklerde sıklıkla görülür. Bununla birlikte, FSH, LH hormonu ve testosteron hormon seviyeleri çok düşük ise hipotalamus-hipofiz

sisteminde sperm üretimi ve testosteron üretiminin sağlanmasına yetecek miktarda hormon salgılanmamaktadır. Bu duruma ise hipogonadotropik hipogonadizm vakaları örnek verilebilir.

2.10. Kisspeptin ve KISS1R

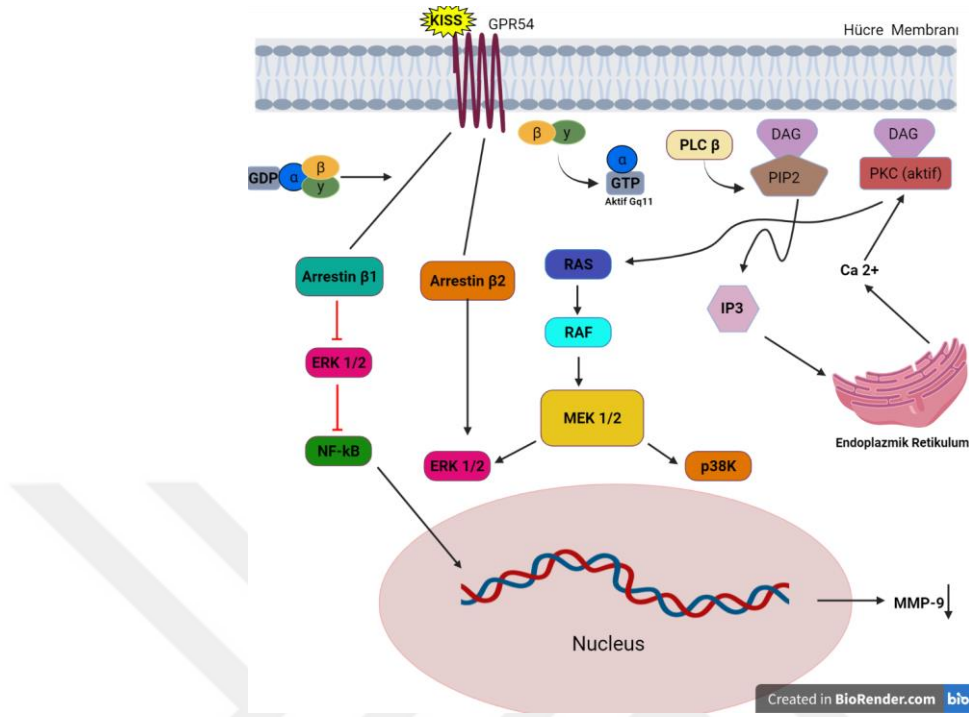
KISS1 geni tarafından kodlanan Kisspeptin (KISS1), 1996 yılında Dr. Henny Welch'in Pensilvanya'daki laboratuvarında, melanom ve meme kanseri metastazını baskılama yeteneğine sahip insan metastaz baskılayıcı bir gen olarak tanımlanmıştır (Lee ve ark., 1996). Kisspeptin, insanlarda 1. kromozomun q.32.1 bölgesinde lokalize olan *KISS1* geninden (gen ID: 3814) transkribe edilir. Etkileşimini, galanın reseptör ailesinden G proteine bağlı reseptör KISS1R (GPR54) üzerinden gösterir. *KISS1* geni, 145 aminoasitlik bir protein kodlar. Bu öncül protein post-translasyonel işlemlerden sonra 54 aminoasitlik Kisspeptin-54 ve Kisspeptin-54 ile aynı C-terminal bölgelere ve aynı fonksiyonel özelliklere sahip daha kısa formlardaki Kisspeptin-14, Kisspeptin-13 ve Kisspeptin-10'a dönüştürülür (Şekil 2.6.) (Messenger, 2005).



Şekil 2.6. Kisspeptin proteini ve formları (Hu ve ark., 2017)'dan uyarlanmıştır.

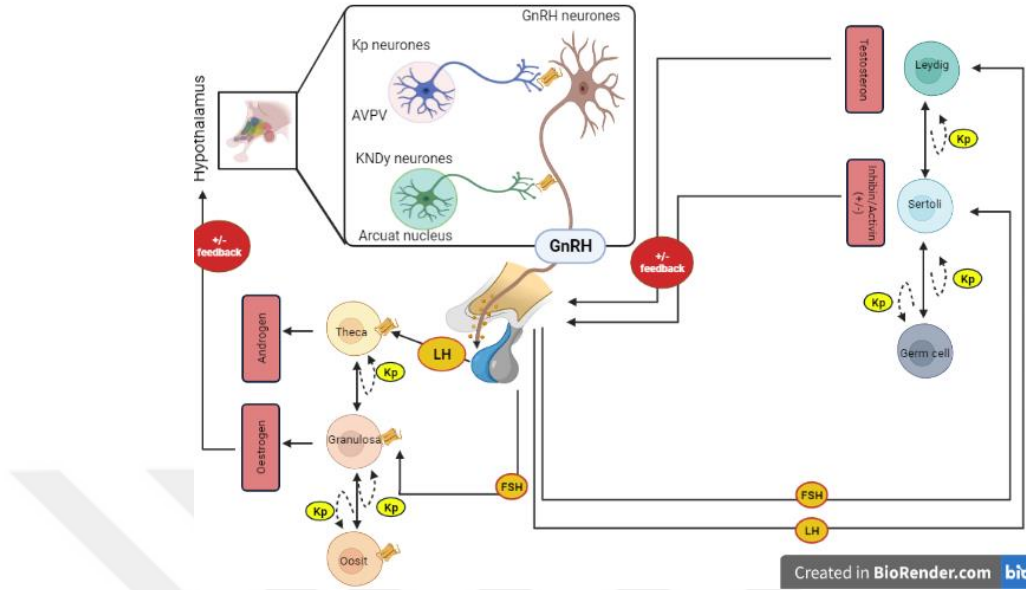
Kisspeptin sentezleyen hücre popülasyonlarının beyindeki dağılımının, memeli türleri arasında korunduğu bilinmektedir. Kisspeptin eksprese eden nöronlar, üçüncü ventrikülün rostral periventriküler bölgesi (RP3V) ve arkuat nükleus (ARC) olmak üzere beyinde başlıca bu iki hipotalamik bölgede yerleşim göstermektedir (Irwig ve ark., 2004; Smith ve ark., 2006). Üçüncü ventriküle bitişik ventral diensefalonda bulunan hipotalamusun periventriküler nükleusu (PV), zebra balığından insanlara kadar pek çok türde bulunan yüksek oranda korunmuş bir beyin bölgesidir (Qin ve ark., 2018).

ARC’de Kisspeptin, nörokinin B (NkB), endojen opioid peptid dinorfin A (Dyn) ve diğer sinyal molekülleriyle birlikte eksprese edilmektedir. Bu nöronlar, Kenedy nöronları (KNDy) olarak tanımlanır ve pulsatil GnRH nörosekresyonunun kritik aracıları olarak işlev görürler (Lehman ve ark., 2010; Grachev ve ark., 2014). İkinci büyük Kisspeptin hücre popülasyonu, fare (Clarkson ve Herbison, 2006), sıçan (Kauffman ve ark., 2007), hamster (Greives ve ark., 2007) ve insanlarda (Rometo ve ark., 2007) RP3V’de lokalizedir. RP3V, anterior ventral periventriküler bölgeyi (AVPV) ve PN’yi içermektedir. Bu iki hipotalamik bölge testosteron ve östradiol salımını düzenler. Östrojen, RP3V’de Kisspeptin ekspresyonunu artırırken, ARC’de Kisspeptin ekspresyonunu azaltır (Garcia-Galiano ve ark., 2012). Rodentlerde bu iki ana Kisspeptin hücre popülasyonun yanı sıra *Kiss1* mRNA ve Kisspeptin immünoreaktif nöronları beyin sapında, medial amigdala, hipotalamusta, dorsomedial nükleus (DMN) ve PV’da bildirilmiştir (Brailoiu ve ark., 2005). Kisspeptin immünoreaktif lifleri de DMN, ARC ve PV’de bulunur ve preoptik bölgelere projeksiyon gönderir. İn situ hibridizasyon yöntemiyle, GPR54’ün medial preoptik alanda (MPOA), DMN, ARC ve lateral hipotalamik bölgede sentezlendiği de gösterilmiştir (Kinoshita ve ark., 2005). Hipotalamustaki bu nükleusların, besin alımı, iştahın düzenlenmesi, açlık-tokluk durumları, stres, vücudun enerji metabolizması ve vücut ağırlığının homeostatik düzenlenmesi dahil olmak üzere pek çok önemli rolü vardır (Rui, 2013).



Şekil 2.7. KISS1'in KISS1R ile olası etkileşim mekanizması (Wahab ve ark., 2016)'dan uyarlanmıştır.

KISS1/KISS1R sisteminin üreme fonksiyonunun kontrolünde rolü olduğuna ilişkin ilk kanıtlar, KISS1R'deki mutasyonların insanlarda hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğunu gösteren çalışmalardır (de Roux ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003). LH ve FSH eksikliği ile karakterize olan hipogonadotropik hipogonadizm sonucunda üreme fonksiyonunun gecikmesi ile infertilite görülmektedir. *Kiss1/Kiss1r*'nin susturulduğu transgenik farelerde de hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite gözlenmiştir (Seminara ve ark., 2003). Bu çalışmalar ile Kisspeptinin, HPG ekseninin modülasyonunda ve gonadotropin salınmasında önemli bir role sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Kisspeptin, GnRH nöronları üzerinde bulunan GPR54 reseptörüne bağlanarak HPG ekseninin kontrolünde rol oynar. Kisspeptinin reseptörlere bağlanması ile GnRH pulsatil olarak salınmaya başlar ve bu durum hipofizin ön lobundan FSH ve LH salınmasına neden olur (Oakley ve ark., 2009). Salınan FSH ve LH gonadlara ulaşarak üreme sisteminde rol oynar. Gonadlarda FSH ve LH seviyesi östrojen mekanizması üzerinden pozitif geribildirim ile düzenlenirken, progesteron ile negatif geribildirimle sağlanır (Marques ve ark., 2000) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Kadın ve erkeklerde Kisspeptin etki mekanizmasının şekilsel gösterimi. (Wahab ve ark., 2016)'dan uyarlanmıştır.

Kadınlarda KISS1 ekspresyonu östrojenin pozitif geri bildirim mekanizmasıyla düzenlenirken, KISS1R ekspresyonu GnRH pozitif geri bildirimi ile ayarlanmaktadır ve östrojene devamlı maruziyet sonucunda negatif yönde etkilenir (Richard ve ark., 2008). Geç foliküler fazda dominant folikül 12 mm çapına ulaştığında, artmış östrojen, Kisspeptin nöronları üzerinde bulunan reseptörüne bağlanır ve Kisspeptin sekresyonunu uyarır (Muir ve ark., 2001). Salınan Kisspeptin, GnRH nöronları üzerinde bulunan GPR54 reseptörüne bağlanarak, gonadotropin salgılanması üzerinde güçlü uyarıcı bir etki oluşturur. GnRH salınım frekansının artması sonucunda LH salınımı artar ve ovulasyon meydana gelir (Hrabovszky ve ark., 2010). Kisspeptin, foliküler gelişim ve ovulasyonda potansiyel bir belirleyici olarak rol oynamaktadır. KISS1 ve GPR54 genlerinde meydana gelen mutasyonlar hafif düzeyde pubertal gelişim eksikliğinden ağır hipogonadotropik hipogonadizme kadar farklı fenotipler ile sonuçlanabilir. Aksine kemirgenlerde Kisspeptin uygulamasının, dişi üreme sisteminin maturasyonuna ve erken ergenliğe neden olduğu bilinmektedir (Witchel ve Tena-Sempere, 2013). Bunun sonucunda cinsel gelişimin her aşamasında Kisspeptin anahtar bir rol oynamaktadır.

2.11. Kisspeptin ve Erkek İnfertilitesi

Kisspeptin ve reseptörünün testisteki lokalizasyonu pek çok türde araştırılmış olmasına karşın insan testisindeki lokalizasyonuna ait herhangi bir bilgi yoktur (Wahab ve ark., 2016; Meccariello ve ark., 2020; Sharma ve ark., 2020). Bununla birlikte insana en yakın tür olarak primatlarda yapılmış tek bir çalışma vardır (Irfan ve ark., 2016). Bu çalışma bulgularına göre, peritübüler miyoid hücrelerde ve interstisyel hücrelerde Kisspeptin ekspresyonu varken, Kisspeptin reseptörü Sertoli hücrelerinde, spermatogonia ve farklılaşmış germ hücrelerinde bulunmaktadır (Irfan ve ark., 2016). Erkek üreme biyolojisi ve Kisspeptin alanında yapılan diğer insan çalışmaları ise seminal plazma ve kan plazması arasındaki ilişkiyi, yaş, fertilité, infertite nedeni ve dozaj çalışmalarını kapsamaktadır. İnsanda Kisspeptinin üreme hormonlarını uyarma yeteneği, 2005 yılında yapılan ilk Kisspeptin insan çalışmasıyla doğrulanmıştır (Dhillon ve ark., 2005). Bu çalışmada dolaşımdaki Kisspeptin düzeylerinin yükselmesinin LH, FSH ve testosteron üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiş ve Kisspeptin-54 infüzyonun, FSH, LH ve testosteron artışına sebep olduğu bulunmuştur (Dhillon ve ark., 2005). İnfertil erkek hastalardan oluşan başka bir çalışmada ise gönüllülerden alınan kan örneklerinde serum Kisspeptin seviyesi araştırılmış ve kontrol grubundaki sağlıklı olguların örneklerine kıyasla infertil gruplarda Kisspeptin seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu gösterilmiştir (Ramzan ve ark., 2015). Bu çalışma, infertilite tanısı konmuş erkek olgularda serum Kisspeptin seviyesinin, sperm parametrelerinde gözlenen farklılıklar ile ilişkisini biyokimyasal yöntemler ile ortaya çıkaran ilk çalışmadır. Başka bir çalışmada ise testosteron seviyelerinin 40 yaşından itibaren her yıl %1 azalmasından yola çıkılarak, yaşlı ve genç erkekler arasında Kisspeptin-54'e hipofiz yanıtı karşılaştırılmıştır (Abbara ve ark., 2018). Elde edilen bulgulara göre, geç başlangıçlı hipogonadizm olmayan sağlıklı yaşlı erkeklerin Kisspeptin-54'e karşı hipotalamik yanıtı ve GnRH'a karşı ise hipofizer yanıtı koruduğu, ancak testiküler yanıtın bozulduğu ortaya konulmuştur (Abbara ve ark., 2018). Bununla birlikte sağlıklı erkeklerde Kisspeptin ve KISS1R'nin insan spermatozasında ekspresyonuna dair sadece tek bir çalışma vardır (Pinto ve ark., 2012). Bu çalışmada Kisspeptinin özellikle sperm başının post-akrozomal bölgesinde bulunduğu ve Kisspeptin reseptörünün esas olarak sperm başının ekvatoryal segmentinde ve boyun bölgesinde yerleşim gösterdiği, immünohistokimya ve western blot yöntemleri ile

gösterilmiştir. Buna ek olarak, *in vitro* ortamda sperm örneklerine Kisspeptin uygulanmış ve sonrasında sperm içi kalsiyum değişimleri ölçülerek, Kisspeptinin spermin progresif motilitesini arttırdığı ancak akrozom reaksiyonuna hiçbir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Pinto ve ark., 2012). Başka bir çalışmada ise biyokimyasal yöntemler ile seminal plazmadaki Kisspeptin ekspresyonu ve kan örneklerindeki total Kisspeptin seviyesinin, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı ve total motil sperm sayısı ile ilişkili olabileceğine dair bulgular paylaşılmıştır (Zou ve ark., 2019). Tüm bu literatür bilgileri ışığında, Kisspeptin ve KISS1R'nin erkek üreme biyolojisindeki önemi açıkça görülmektedir. İnfertilite olgularındaki semen ve kan plazmasındaki Kisspeptin proteinin normal olgulara göre daha az olması, infertilite tanısı konulmasında, Kisspeptinin bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Kisspeptin tedavisine dair yapılan çalışmalarda Kisspeptin'in üreme hormonlarını etkilemesi nedeniyle bir tedavi seçeneği olma ihtimalini güçlendirmektedir (Dhillon ve ark., 2005; George ve ark., 2011; George ve Seminara, 2012; Jayasena ve ark., 2014). Bununla birlikte Kisspeptin ve reseptörünün tam olarak klinik kullanımlarını test etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.12. Kisspeptin ve Dişi İnfertilitesi

İnfertilite, 35 yaşından küçük kadınlarda 1 yıllık düzenli korunmasız cinsel ilişkiden, 35 yaşından büyük kadınlarda 6 aylık düzenli korunmasız ilişkiden sonra klinik gebelik elde edilememesidir. İnfertilite etiyolojisinin belirlenmesinde, detaylı tıbbi öykü, fizik muayene ve hormonal değerlendirme, kadın partnerin tanısız görüntülemesi sıklıkla önemli bir rol oynar (Merritt ve ark., 2020). Genellikle üreme yolu enfeksiyonları, dünya genelinde kadın infertilitesinin en yaygın nedenidir. Kendiliğinden gebe kalma olasılığını etkileyen üç ana faktör, istenmeyen gebelik süresinin artması, kadın partnerin yaşı ve hastalığa bağlı infertilitedir. Polikistik over sendromu, ovaryan hiperstimülasyon, erken over yetmezliği, endometriozis, uterus fibroidleri ve endometriyal polipler kadın infertilitesinde rol oynamaktadır (Vander Borgh ve Wyns, 2018). Kadın infertilitesi nedenleri arasında, endokrin nedenler, enfeksiyonlar, immünolojik nedenler, stres, genetik nedenler ve genetik gelişimsel bozuklukların yanı sıra kilo ve kilo sorunları da yer almaktadır (Beke, 2019).

Ovaryumlar, menstrüal siklusun hormonal kontrolü nedeniyle, kadın üreme sisteminde merkezi organlardır. Hipotalamus-hipofiz-ovaryum ekseninin son organı olan ovaryumdaki hormonal olaylar, endometriyumdaki siklusu kontrol eder (Luciano ve ark., 2013). Menstrüal döngü, hipotalamustan salınan GnRH'nin etkisiyle hipofiz ön lobundan salınan ve ovaryumlara ulaşan birçok hormon tarafından yönetilmektedir. Ovulasyon ve foliküler-luteal geçiş sırasındaki olayların zamanlaması embriyonik-endometriyal senkronizasyonu sağlar ve başarılı bir gebeliğin temelini oluşturur (Luciano ve ark., 2013). 2019 yılında menstrüal siklus çeşitlerini araştırılmıştır ve 600.000'den fazla döngü türü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle tedavi yöntemleri hastalıklarda ve kişiden kişiye farklılık göstermektedir (Bull ve ark., 2019).

2.12.1. Kisspeptin ve Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS), kadınlarda en yaygın görülen endokrin bozukluklarından biridir (Hoeger ve ark., 2021). İlk olarak 1935'de Stein ve Leventhal bilateral polikistik overlerle beraber hirsutizm ve anovulasyon görülen yedi hastada tanımlamıştır. 18-44 yaş arası kadınları etkiler. Kalıcı hormonal dengesizlik, kist, düzensiz bir menstrüal döngü gibi karmaşıklıklara yol açar. Bunun yanı sıra birçok aday genin PKOS'a neden olduğu tespit edilmiştir (Ajmal ve ark., 2019). Pubertede genellikle normal bir menstrüal paternin oluşmaması ve hiperandrojenizm bulgularının PKOS ile yakından ilişkisine rağmen, tanı için diğer hiperandrojenizm durumunun dışlanması gerekmektedir (Rotterdam, 2004). Klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm, ovulasyon anormallikleri, ultrason görüntülerinde büyümüş veya polikistik oluşum ile karakterizedir (Bednarska ve Siejka, 2017). Yüksek prevalansına rağmen, PKOS teşhisi için teknikler yetersizdir ve tanımlanması için sıklıkla birden fazla ziyaret gerekir. Tanıda gecikme, bir veya daha fazla bozukluk veya hastalığın ilerlemesine yol açar (Meier, 2018). Dünya çapında PKOS için mevcut birkaç tedavi yöntemi bulunmaktadır.

Bugüne kadar, birkaç çalışma PKOS hastalarında serum Kisspeptin düzeyleriyle ilgili çelişkili sonuçlar göstermiştir. PKOS'lu kadınların daha yüksek LH seviyelerine sahip oldukları bilinmektedir. Bunun Kisspeptin etkisindeki artışla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. PKOS'lu kadınlarda sağlıklı kadınlara göre serum Kisspeptin konsantrasyonu da daha yüksek olduğu gösteren çalışmalar mevcuttur (Terao ve ark.,

2004; Panidis ve ark., 2006). Aksine Kisspeptin seviyelerinin, PKOS'lu kadınlarda, sağlıklı kadınlara göre önemli ölçüde olmamakla birlikte daha düşük olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Panidis ve ark., 2006; Araujo ve ark., 2020). Ayrıca, serum Kisspeptin düzeylerinin PKOS'lu ve sağlıklı kadınlar arasında farklılık göstermediğini ifade eden çalışmalar da mevcuttur (Mut ve ark., 2021). Yaş, serum Kisspeptin düzeylerini öngörmeye bağımsız bir değişkendir. Jayasena ve arkadaşları, puberte döneminde ve yetişkin kadınlar arasında dolaşımdaki Kisspeptin konsantrasyonlarında yaşa bağlı bir azalma olduğunu bildirmiştir (Jayasena ve ark., 2014). PKOS'lu kadınlardan elde edilen granüloza lutein hücrelerinde, KISS1 ve KISS1R proteinleri önemli ölçüde upregüle iken, PKOS olmayan hastaların granüloza hücrelerindeki KISS1 seviyesi, KISS1R seviyesi ile koreledir. KISS1'in ekspresyon seviyeleri, ovaryum rezerviyle ilgili olan AMH ile yüksek oranda paralel olarak bulunmuştur (Hu ve ark., 2019). Bu tür bir korelasyon ve Kisspeptinin GnRH nöronlarını uyarması, Kisspeptini daha sonraki araştırmalar için ilginç bir nokta haline getirmektedir. Kisspeptin ve KISS1R sinyali, PKOS'taki nöral mekanizmaları potansiyel olarak etkilemekle birlikte, bu bozukluğun tedavisi açısından yeni bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

2.12.2. Kisspeptin ve Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu

IVF tedavisinde, menstruasyon döngüsünde meydana gelen fizyolojik süreçleri stimüle etmek için suprafizyolojik tedaviler kullanılır. Oosit olgunlaşması, oositin fertilizasyon başarısı için kritik bir süreçtir. Oosit olgunlaşması, insan koryonik gonadotropin (hCG), GnRH agonisti, rekombinant LH veya Kisspeptin tarafından başlatılır (Abbata ve ark., 2018). Oosit maturasyonun tetiklenmesi amacıyla sıklıkla hCG kullanılmaktadır. hCG doğrudan ovaryumlar üzerinden etki ederek LH piki oluşmasını sağlar ve bu nedenle hCG uygulaması sonrasında oluşan etkinin kontrol edilmesinde bilinen bir negatif geri bildirim mekanizması yoktur (Clarke ve ark., 2015). Bu nedenlerden dolayı hCG ile yapılan işlemlerde ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) gelişme riski bulunur. Henüz literatürde yeterli çalışma olmamasına karşın, yapılmış olan deneysel hayvan çalışmaları ve klinik çalışmaların sonuçlarında oosit matürasyonu amacıyla Kisspeptinlerin kullanılmasının IVF siklusları sırasında OHSS gelişme riskini ciddi şekilde azalttığını söylemek mümkündür (Clarke ve ark., 2015).

2.12.3. Kisspeptin ve Prematür Ovaryan Yetmezliği (POF)

Hipergonadotropik hipogonadizm, ovaryan fonksiyonlarında azalma ve seks steroidlerindeki negatif geri bildirimin olmaması ile FSH ve LH gibi gonadotropinlerin serum seviyelerindeki artış olarak tarif edilir. Primer ovaryum ve hipotalamik-hipofiz fonksiyon bozuklukları da POF hastalık kategorisine dahilken, bu hastalık prematür menapoz veya POF olarak da adlandırılmaktadır (Dang ve ark., 2015). Prematür ovaryan yetmezlik hastalarında menstrüal sikluslar dursa bile, bazı vakalarda ovaryumlar rezidüel dormant foliküller içerebilir (Kawamura ve ark., 2016). Prematür ovaryan yetmezlik, kadınlarda 40 yaşından daha önce, en az dört ay amenore öyküsü ve hipergonadotropik serum FSH seviyeleri, düşük östrojen seviyesi, matür folikül eksikliği gibi semptomlarla ifade edilir. Ölümcül değildir ancak kadın infertilitesinin en çok rastlanan sebeplerinden biridir (Xiong ve ark., 2017).

KISS1R nakavt farelerde, ovulasyon hızında erken bir düşüş, ardından antral foliküllerin ilerlemesinde kayıp, oosit kaybı ve tüm preantral folikül kategorilerinde bir azalma gözlemlenmiştir (Gaytan ve ark., 2014). Ayrıca KISS1R yokluğuna bağlı foliküler gelişim ve ovulasyon başarısızlığının gonadotropin replasmanı ile tamamen kurtarılamadığı da gösterilmiştir. Bu bulgularla da ilk defa Kisspeptin sinyallemesinin POF patogeneziine katkıda bulunarak, ovaryumda doğrudan rolüne işaret edilmektedir (Gaytan ve ark., 2014).

2.12.4. Kisspeptin ve Endometriozis

Endometriozis, üreme çağındaki kadınların %15'ini etkileyen endometriyal kavite dışında ektopik endometriyal bezler ve stroma varlığı ile tanımlanmaktadır (Hur ve Falcone, 2021). Pelvik ağrı ve infertilite ile ilişkili kronik bir hastalıktır (Lee ve ark., 2021). Endometriozisin patogenezi çok faktörlü olmakla birlikte bunu açıklamak için çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Bunlar geriye giden (retrograde) menstruasyon, sölomik metaplazi ve lenfovasküler yayılmayı içerir. Hormonlar, immünolojik durum ve genetik faktörler de bu yayılmada rol oynayabilir. Çoğu hastada hastalık pelvik organları tutmakla birlikte nadiren vücuttaki çok çeşitli uzak bölgelere de yayılabilir. Endometriozisi olan hastalarda, endometrioid ve berrak hücreli karsinomlar dahil olmak üzere ovaryum karsinomlarını geliştirme riski daha yüksektir. Endometriozis için bilinen bir tedavi bulunmamaktadır (Arafah ve ark., 2021). Kisspeptin ve KISS1R'nin infertilitede tedavi

seçeneği ve/veya infertilite belirteci olarak kullanılabileceğine dair çalışmaların yayınlanmasıyla beraber endometriozis ve Kisspeptin ilişkisi de araştırılmaya başlanmıştır. 2012 yılında yapılan bir çalışmada endometriozise sahip kadınların %41.6'sının endometriyal biyopsi örneğinde KISS1R ekspresyonu ve ektopik endometriyal doku örneklerinde ekspresyonun kaybı olduğu bildirilmiştir. Tüm bunlar göz önüne alındığında, Kisspeptin/KISS1R sisteminin endometriozis patofizyolojisinde rol oynayabileceği düşünölmektedir (Makri ve ark., 2012). Kisspeptin endometriyal karsinomda metastaz baskılayıcı olarak görev yapar. Kisspeptin, derin infiltre edici endometriotik implantlar ve ovaryum endometriomalarının hem glandüler hem de stromal bileşenlerinde yüzeysel endometriotik implantlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük orandan eksprese edilmektedir (Abdelkareem ve ark., 2020). Kisspeptin ve KISS1R'nin seviyeleri, endometriozisi olmayan kadınlara kıyasla ötopik endometrial stromada daha düşüktür. Bu durum endometriozis patogeneğinde Kisspeptin ekspresyonunun azalması ile tutarlıdır (Abdelkareem ve ark., 2020).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Anabilim dalı tarafından tanısal testis biyopsisi yapılan ve NOA tanısı konulan hastara ait testis örnekleri (yaş aralığı 25-70) ile infertilite sebebiyle alınan ve histopatolojik inceleme sonucu normal sınırlarda değerlendirilen kontrol grubu testis dokuları kullanıldı. Hastaların klinik muayeneleri (tıbbi geçmiş, fiziksel muayene vb.) yapıldıktan sonra, anormal kromozom karyotipi, varikosel, orşit, testis torsiyonu, seminal kanal obstrüksiyonu, hipogonadotropik hipogonadizm, testis hastalıkları, anabolik androjenik steroid kullanımı olmayan hastalar ile genital bölgede ciddi travma, ameliyat veya kemo/radyoterapi almayan, fiziksel ve endokrin anormallikler gibi erkek infertilitesi ile ilişkisi bilinen risk faktörlerine sahip olmayan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hasta örneklerinden sadece histopatolojik olarak tanısı konulan hastalara ait dokular kullanıldı. Çalışmamızda hasta örneklerinin temini ve kullanımı için, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'na etik kurul onayı alındı (Protokol no:70904504/248). Örnek gruplarımız aşağıda sunulmuştur:

1. Normal testis dokuları (n=13)
2. Hipospermatogenez tanısı konmuş hastalara ait testis dokuları (n=11)
3. Maturasyon duraksaması (arresti) tanısı konmuş hastalara ait testis dokuları (n=15)
4. Sadece Sertoli hücrelerinin bulunduğu (SCO tanısı konmuş) testis dokuları (n=45)

3.1. Doku Takibi

Doku örnekleri %10'luk formalin ile 35°C'de 2 saat fikse edildikten sonra alkolik formalin içerisinde takibe devam edildi. Slaytlar %95 alkolden geçirildikten sonra absolüt alkolde bekletilip, iki değişim ksilen ile muamele edildi. Ardından üç parafin serisinden geçirildikten sonra kesitlere gömme işlemi yapıldı. Hasta örneklerine ait doku takipleri, Thermo Fisher Scientific Shandon Citadel 2000 otomatik doku takip cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2. Histopatolojik Analizler

Tüm hasta örneklerine ait parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen Eozin, Masson Trikrom, PAS (Periodic Acid Schiff) boyaması ile histopatoloji doğrulandı.

3.2.1. Hematoksilen-Eozin (HE) Boyanması

Çalışmaya dahil edilen her hasta dokusundan 5µm kesitler alınarak hematoksilin eozin boyanması yapıldı. Hematoksilin eozin boyama, rutin incelemelerde kullanılan histolojik bir boyama tekniğidir. Temel prensibi, mavi-mor arası renk veren hematoksilin ile, pembe-kırmızı renk veren eozin'in hücreleri boyamasıdır. Bu boyamada, hematoksilin bazik bir boya görevi görür ve eozinin de asit boyası olması mükemmel bir ikili oluşturur. Hematoksilin nükleik asitler açısından çok zengin olan hücre çekirdeklerini, eozin pozitif yüklü yapılar olan hücrelerin sitoplazmalarını, kas liflerini, sitoplazmik organellerini ve kollajeni boyar.

Slaytlar parafinden arındırılıp (deparafinizasyon) ve su ile muamele edildikten sonra 3 değişim ksilolde sırayla 3'er dakika bekletildikten sonra, %70, %80, %90, %100 alkolde 2'şer dakika bekletildi. Mayer hematoksilin ile 6 ila 15 dakika arasında boyandıktan sonra akan musluk suyunda 2 ila 5 dakika arasında yıkandı. %1'lik asit alkolle 1-2 kez daldırılıp çıkarılıp, musluk suyunda yıkandı. Ardından zayıf amonyak solüsyonu ile slaytlar parlak mavi bir renge boyanmaya kadar bekletildikten sonra, akan musluk suyunda 5 dakika süreyle yıkandı. %80 etil alkolde 1-2 dakika bekletilip, eozin-phloxine solüsyonunda 2 dakika zemin boyaması (counterstain) yapıldı. Ardından üçer dakika olmak üzere iki kez %95'lik alkol ile muamele edildikten sonra, üçer dakika olmak üzere iki kez absolüt alkol ile muamele edildi. İkişer dakika olmak üzere üç kez ksilol ile muamele edilip slaytlar entellan ile kapatıldı.

3.2.2. Masson Trikrom Boyanması

Bu boyama yöntemi testisteki bağ doku yapılarının ayırt edilmesi için kullanılmıştır. Boyama protokolü olarak slaytlar öncelikle ksilol, alkol ve su aşamalarından geçirilerek parafinden uzaklaştırıldı. Önceden 45°C'ye kadar ısıtılmış %5'lik (ferric ammonium sulphate) $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ içinde 5 dakika rengi sabitleştirildi. Çeşme suyunda yıkanmasının ardından Mayer hematoksilin solüsyonu içinde 5 dakika boyandı. %95'lik

alkolde yıkandıktan sonra pikrik alkolde differansiye edildi. Slaytların çeşme suyunda yıkanmasının ardından ponceau-asit fuksin solüsyonunda 5 dakika boyandı. Distile suda yıkandıktan sonra, 5 dakika %1'lik sulu fosfomolibdik asitte differansiye edildi. Asetik anilin mavisi solüsyonunda 5 dakika beklendi. Distile suda yıkandıktan sonra slaytlar 5 dakika %1'lik sulu fosfomolibdik asitte tekrar bırakıldı. Slaytlar %1'lik sulu asetik asitte 5 dakika muameleden sonra absolüt alkolü takip eden %95'lik alkolde dehidrate edildi ve distile suda yıkandı. Son olarak ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra kesitler entellan ile kapatıldı.

3.2.3. Periyodik Asit-Schiff Boyanması

Periyodik asit-schiff boyası, glikojeni parçalayan bir enzim olan diastaz ile beraber kullanılmaktadır. PAS boyası tipik olarak glikojen varlığında magenta renk (kırmızı ve mor karışımı) verir. Periyodik asit ve Schiff birlikte kullanıldığında koyu magenta'nın yerini açık pembe renk alır. Farklı glikojen konsantrasyonlarındaki renk yoğunlukları farklılıklar içerir. PAS boyası özellikle seminifer tübül içindeki akrozomal kep yapısının belirlenmesinde oldukça belirleyici olmuştur. Slaytlar deparafinizasyon işleminden geçirildikten sonra, periyodik asit solüsyonunda [0,8 gr Periyodik asit (Merck, katalog no: 8.22288.0100), 0,4 gr Sodyum asetat (Merck, katolog no: 6131-90-4) ve 90 ml distile su] 5 dakika beklenmesinin ardından %70 alkol ile çalkalanıp, 5 dakika Schiff solisyonunda (Merck, katalog no: 101646/2) beklenildi. Slaytlar suda yıkandıktan sonra %90 ve %100 alkol serilerinden geçirilip ksilolde 5 dakika bekletilip entellan ile kapatıldı.

3.2.4. Johnsen Skorlaması

Hematoksilen-eozin ile boyanmış slaytlarda hasta patolojilerinin belirlenebilmesi amacıyla Johnsen skorlaması yapıldı. Her hastadan en az 50 tübül değerlendirmesi yapıldı. Seminifer tübül skor ortalamalarına göre hastalar, kontrol grubu (skor 9-10), hipospermatogenez (skor 8), maturasyon duraksaması (3-7) ve SCO (skor 2) grupları olarak kontrol edildi.

Skor 10-	Tamamlanmış spermatogenez, çok sayıda spermatazoa var, germinal epitelyum organize,
Skor 9-	Çok sayıda spermatozoa, germinal epitelyum düzensiz
Skor 8-	Sadece birkaç spermatazoa (<5-10) var
Skor 7-	Spermatazoa yok, çok sayıda spermatid var
Skor 6-	Spermatazoa yok, birkaç spermatid (<5-10) var
Skor 5-	Spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
Skor 4-	Birkaç tane spermatosit (<5) var
Skor 3-	Sadece spermatogonya var
Skor 2-	Sadece Sertoli hücreleri var
Skor 1-	Boş tübül

Şekil 3.1. Johnsen skorlaması metodu (Johnsen, 1970)

3.3. İmmünohistokimya: Kisspeptin ve KISS1R Proteinlerinin Ekspresyon ve Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesi

Testis dokularına ait parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirildikten sonra, distile suya alındı. Daha sonra antijen retrieval uygulaması yapıldıktan sonra (Tris-EDTA solüsyonunda mikrodalgada 2 kez 7 dakika kaynatılarak) oda ısısında soğumaya bırakıldı. Distile suda yıkama gerçekleştirdikten sonra dokuda endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için, kesitler hidrojen peroksit solüsyonu (63 ml metanol+7 ml hidrojen peroksit) ile 20 dakika muamele edildi. Bu işleminden sonra kesitler, TBS-T (Tris buffer salin-tween 20) solüsyonunda 3 kez 5 dakika yıkandı. Ardından Ultra V Block (Thermo, katalog no: TA-125-PBQ) ile muamele edilerek sekonder antikorun spesifik olmayan bağlanma bölgeleri blokladı. Bloklama işleminden sonra primer antikorlar Kisspeptin (Merck, katalog no: MABC60) (1:150) ve KISS1R (İnvitrogen, katalog no: PA5-96221) (1:1500) optimize edilen dilüsyonlarda kesitler üzerine uygulandı. Negatif kontrol için kullanılacak kesitlere TBS-T uygulandı. Gece boyu primer antikorlar +4⁰C’ de uygulandıktan sonra, TBS-T solüsyonunda 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı. Uygun sekonder antikorlar; Kisspeptin için 1:600 biyotin işaretli anti-mouse (Vector, katolog no:B100), KISS1R için biyotin işaretli anti-rabbit (Vector, katolog no:BA-9200) kesitler üzerine damlatıldı. Tekrar TBS-T solüsyonunda 3 kez 5 dakika yıkanan kesitler streptavidin peroksidaz (Thermo Fisher, katalog no: TS-060-HR) ile oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra DAB (di-amino benzidin)

(Sigma Aldrich, katalog no: D4418) kromojeni uygulanarak reaksiyon görünür hale getirildi. Reaksiyonlar mikroskop (Olympus CX23) altında gözlendi.

Kisspeptin ve KISSR1 proteinlerinin Leydig hücrelerindeki ekspresyonları, nüklear (N), sitoplazmik (S) ve yok (-) şeklinde tüm hastalarda 100 adet hücre sayılarak belirlendi. Seminifer tübül içinde yer alan (Sertoli, spermatogonia, spermatosit hücreleri) ölçümleri HSCORE yöntemi ile (boyanma şiddeti; 0:boyanmayan, 1: zayıf boyanma, 2: orta güçlükteki boyanma, 3: güçlü boyanma) ve boyanan hücre sayısının (%50'den az ise: 1, %50'den fazla ise: 2) çarpımı ile yapıldı (Yeh ve ark., 2008).

3.4. Steroid Hormon Ölçümleri

Kliniğe başvuran hastalardan TESE operasyonu öncesi hormonal bozuklukları değerlendirebilmek amacıyla yapılan total testosteron, serbest testosteron, FSH ve LH hormon ölçüm sonuçları kullanıldı. Hastalardan alınan kan örnekleri vakumlu, plastik, separatör jel içeren tüplere alındı. Örneklerdeki, total testosteron (referans aralığı: 2,41-8,27), serbest testosteron (referans aralığı: 8,69-54,69), FSH (referans aralığı: 1,5-12,4) ve LH (referans aralığı: 1,7-8,6) hormon seviyeleri Roche-Cobas C501 cihazında ölçüldü.

3.5. İstatistiksel Analizler

Elde edilen tüm veri analizleri Sigma Stat (version 3.5) istatistiksel analiz programı kullanılarak değerlendirildi. Analizler t-test testi ile yapıldı, anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

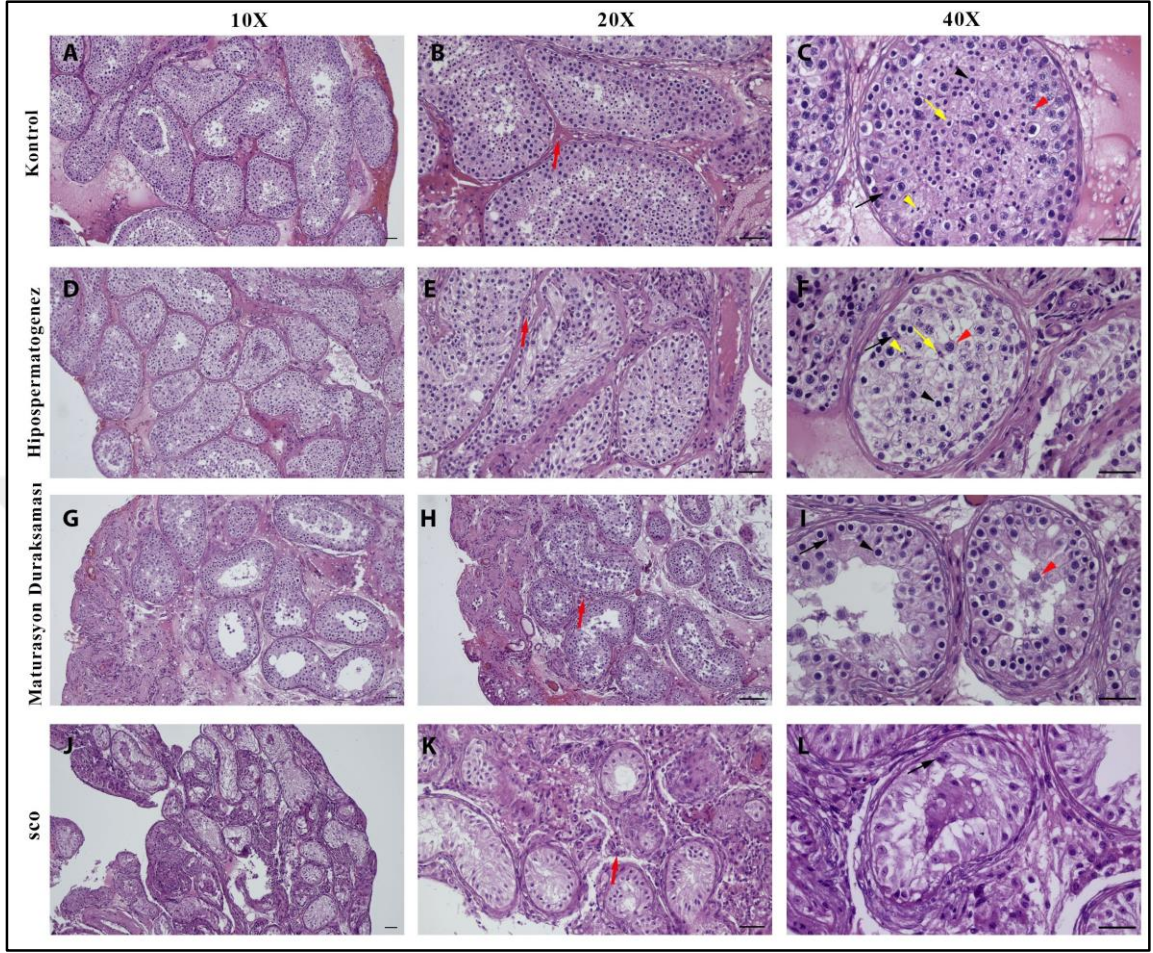
4.1. Histopatolojik Analizler

Hastalardan alınan testis örneklerinde ayrıntılı histopatolojinin değerlendirilmesi amacı ile hematoxilen eozin, Masson Trikrom ve Periodic asit-Schiff boyanmaları yapılmıştır.

4.1.1. Hematoxilen Eozin Boyanması ile Histopatolojinin Değerlendirilmesi

Hematoxilen eozin boyaması sonrasında Johnsen skorlaması gerçekleştirilerek skorlama sonucuna göre hasta dokularının histopatolojik durumları doğrulandı. Her hasta dokusunda 50 seminifer tübül değerlendirildi. Hasta seminifer tübül skoru da dikkate alınarak, kontrol grubuna n=13, hipospermatogenez grubuna n=11, maturasyon duraksaması grubuna n=15, SCO grubuna n=44 hasta dahil edildi.

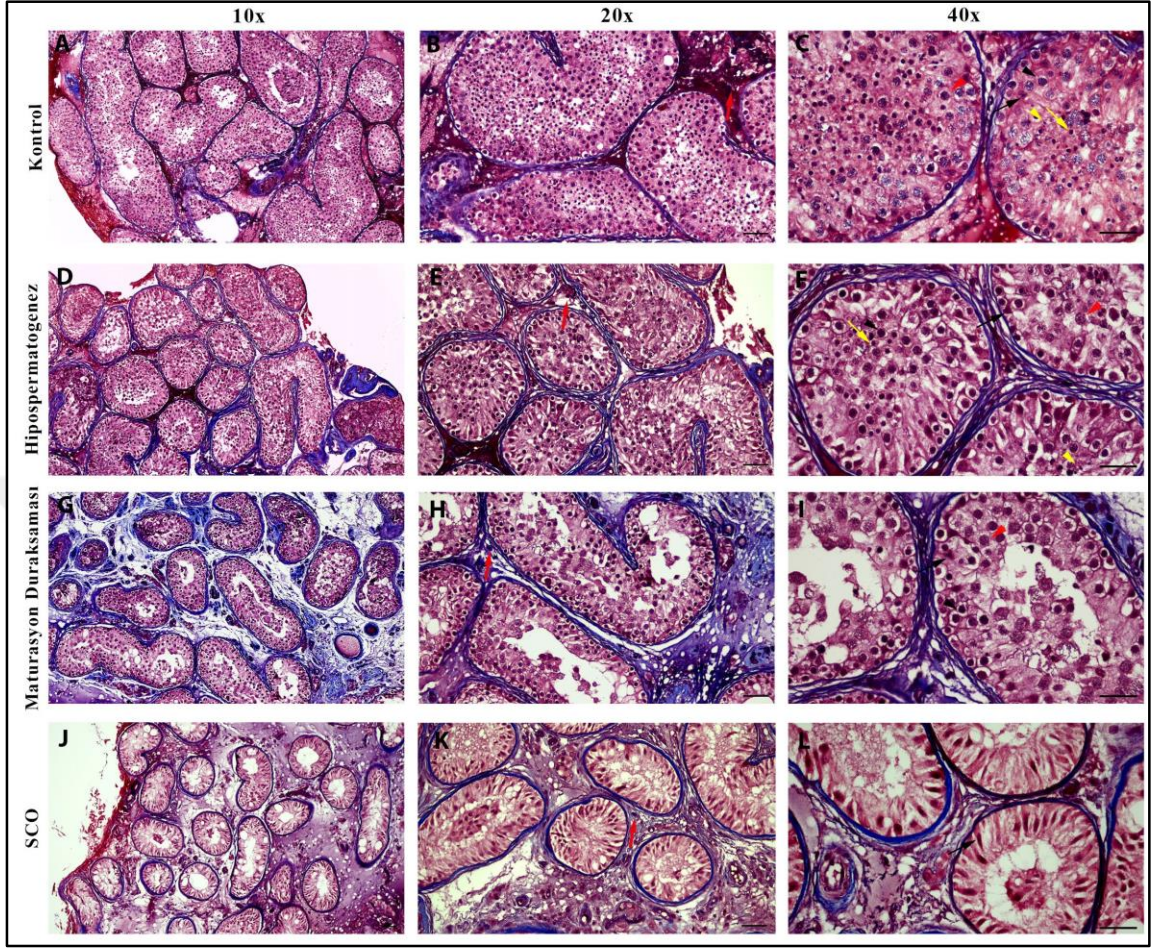
Kontrol grubundaki seminifer tübüllerde tamamlanmış spermatogenez ve çok sayıda spermatid, hipospermatogenez grubunda az sayıda spermatid ve tamamlanmış spermatogenez izlendi. Maturasyon duraksamasında spermatogonia, pakiten, preleptoten veya spermatid aşamasında kalmış bir sonraki spermatogenez evresine geçememiş tübüller mevcuttu. SCO sendromunda ise tübüllerde sadece Sertoli hücrelerinin bulunmaktaydı. Kontrol ve NOA gruplarında tübüller arasındaki interstisyel alanlarda Leydig hücreleri de görüldü. Gruplara ait hematoxilen eozin boyanmalarına ait görüntüler panel olarak sunulmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hematoksilen eozin boyanması. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir.

4.1.2. Masson Trikrom Boyanması ile Histopatolojinin Değerlendirilmesi

Histopatolojinin ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi için ayrıca Masson Trikrom boyanması yapılmıştır. Masson trikrom boyası kasların, kollajen fibrillerinin, bağ doku yapılarının, gametlerin, nükleusların, nörofibrillerin, nörogliaların, kollajenin, hücreler arası keratin fibrillerinin görüntülenmesi için kullanılmaktadır. Masson trikrom boyası ile seminifer tübüllerin bazal membranı, kan damarlarının çevresinde ve tübüller arasındaki ince kollajen lifleri mavi renkte boyandı. Böylelikle tüm spermatogenik seri belirgin olarak ayrıştırılmıştır. Gruplara ait Masson trikrom boyanmalarına ait görüntüler panel olarak sunulmuştur (Şekil 4.2.)

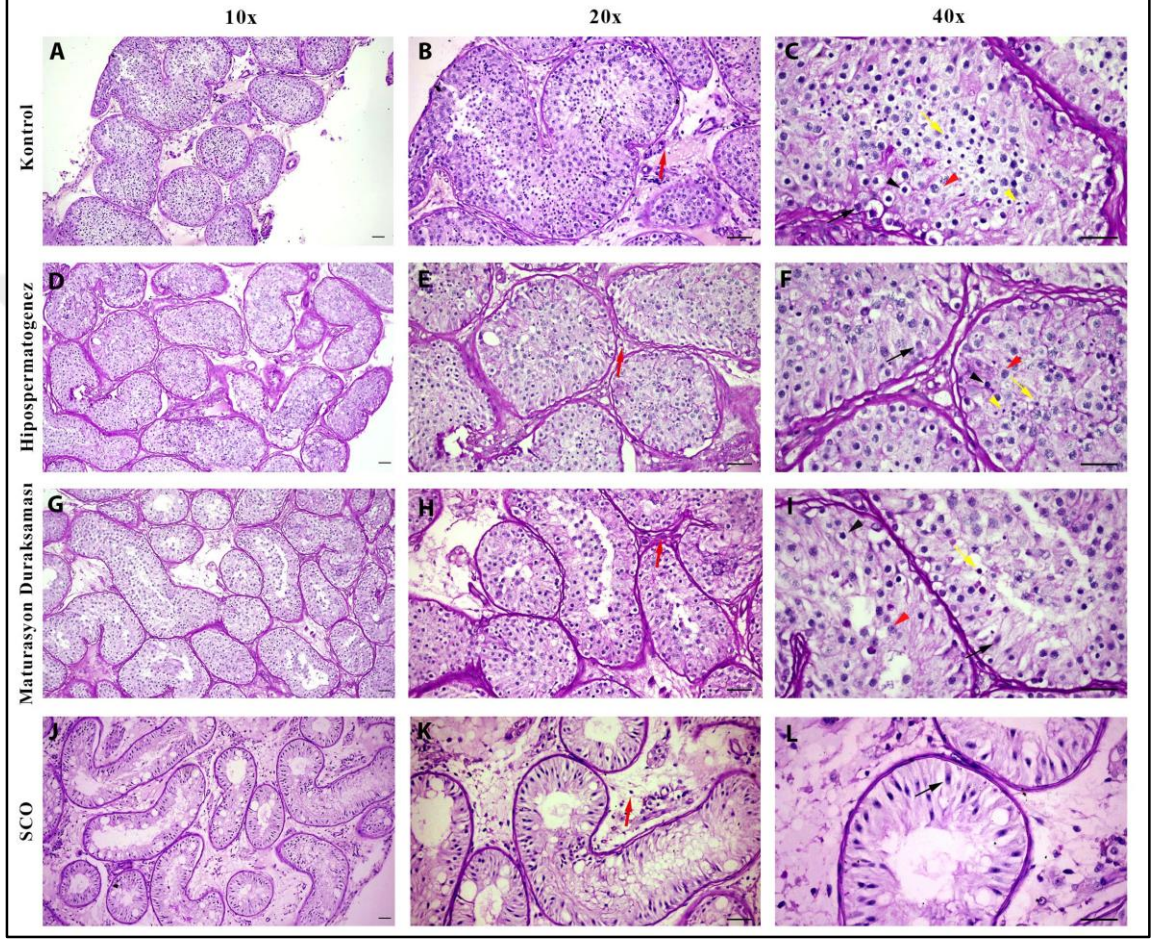


Şekil 4.2. Masson trikrom boyanması. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir.

4.1.3. Periyodik Asit-Shiff Boyanması

PAS boyası, genel olarak dokudaki polisakkaritleri belirlemek amacı ile kullanılan boyama yöntemidir. Periyodik asit ve şekerlerdeki komşu dioller arasındaki oluşan bir çift aldehit oluşur. Bu aldehitler Schiff ayracı ile tepkime verip mor-magenta oluşturur. PAS boyası, zıt boyama olan hematoksilin ile beraber boyandığında glikoproteinler (akrozomlar) mor renkte gözlemlenirken, nükleuslar mavi renkte boyanır (Şekil 4.3.). Testis örneklerinde PAS pozitif boyanmış olan bazal membran yapısı ve tunika albuginea gözlemlendi. Kontrol grubuna ait kesitlerde düzgün bir seminifer tübül duvarı, Sertoli hücreleri, belirgin spermatogoniumları ve spermatogenik seri hücreleri izlendi. Hipospermatogenez grubunda kontrol grubuna çok benzer şekilde, düzgün seminifer tübül duvarı, spermatogenik seri ve Sertoli hücreleri gözlemlendi. Maturasyon duraksaması ve

SCO gruplarında, hematoksilin eozin boyanmasındaki gözlemlere benzer olarak tamamlanmamış spermatogenik seri ve düzgün bazal membran yapısı gözlemlendi. Gruplara ait PAS boyanmalarına ait görüntüler Şekil 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.3. Periyodik asit-Schiff boyanması. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir.

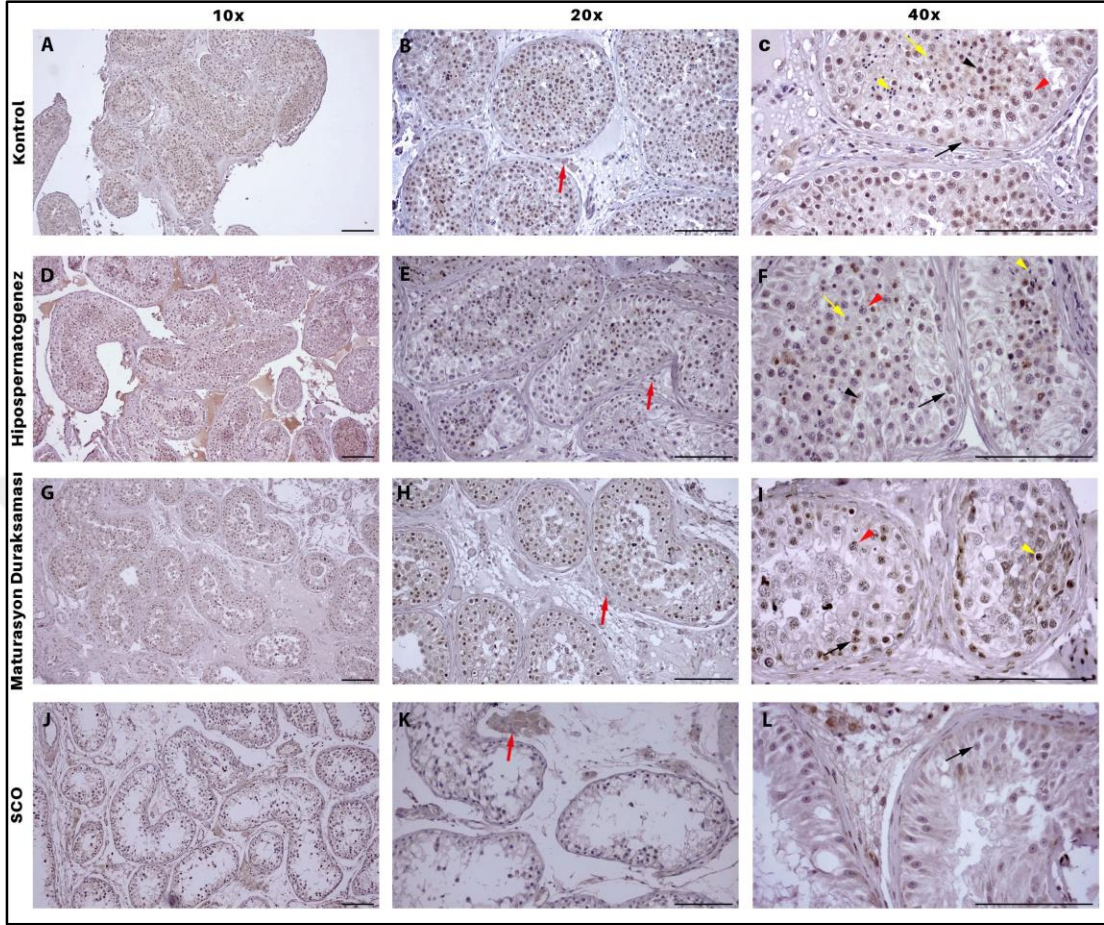
4.2. İmmünohistokimya: Kisspeptin ve KISS1R Proteinlerinin Ekspresyon ve Lokalizasyonlarının Değerlendirilmesi

Kontrol ve hasta gruplarında Kisspeptin ve KISS1R proteinlerinin ekspresyon paternleri değerlendirildi. Bu kapsamda kontrol ve NOA gruplarındaki Leydig hücrelerinde her iki protein için de yoğun ekspresyon dikkat çekici oldu. Tübül içi ekspresyonlarda germ hücreleri ve Sertoli hücre nükleusları için HSCORE metodu ile değerlendirmeler yapıldı.

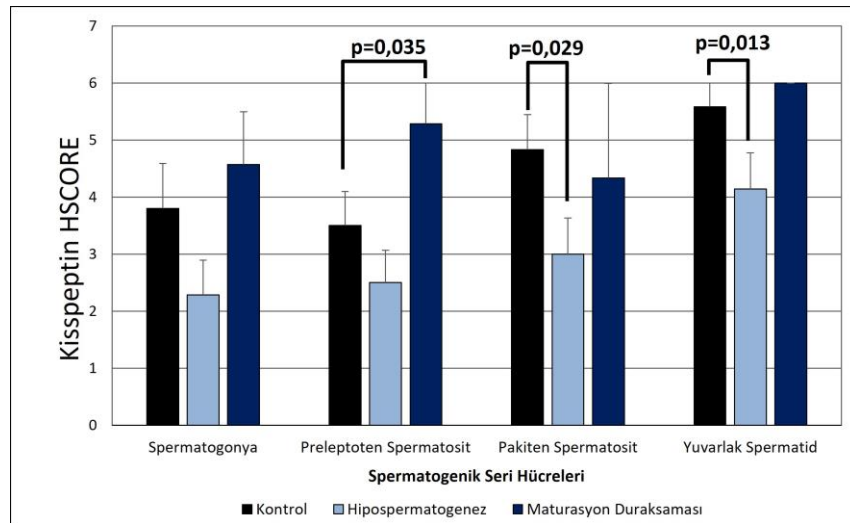
Tüm kontrol ve hasta grupları değerlendirildiğinde uzayan spermatidlerde Kisspeptin ve KISS1R ekspresyonu görülmedi.

4.2.1. Seminifer Tübül içindeki Spermatogenik Seride Kisspeptin Protein Ekspresyonunun HSCORE Yöntemi İle Değerlendirilmesi

Spermatogonyumlarda Kisspeptin ekspresyonu kontrol grubunda ve hipospermatogenez grubunda nüklear boyanma paterni gösterirken, maturasyon duraksaması grubunda nüklear ve sitoplazmik boyanmalar olduğu izlendi. Kisspeptin ekspresyonu preleptoten ve pakiten spermatositlerde kontrol ve hipospermatogenez grubunda nüklear boyanma şeklindeydi. Bununla birlikte maturasyon duraksaması grubunda gerek nüklear gerekse sitoplazmik boyanmalar izlendi. Yuvarlak spermatidlerdeki Kisspeptin ekspresyonu kontrol ve hipospermatogenez grubunda sadece nüklear boyanma şeklinde iken, maturasyon duraksaması grubunda sadece sitoplazmik boyanma gözlemlendi (Şekil 4.4, 4.5).



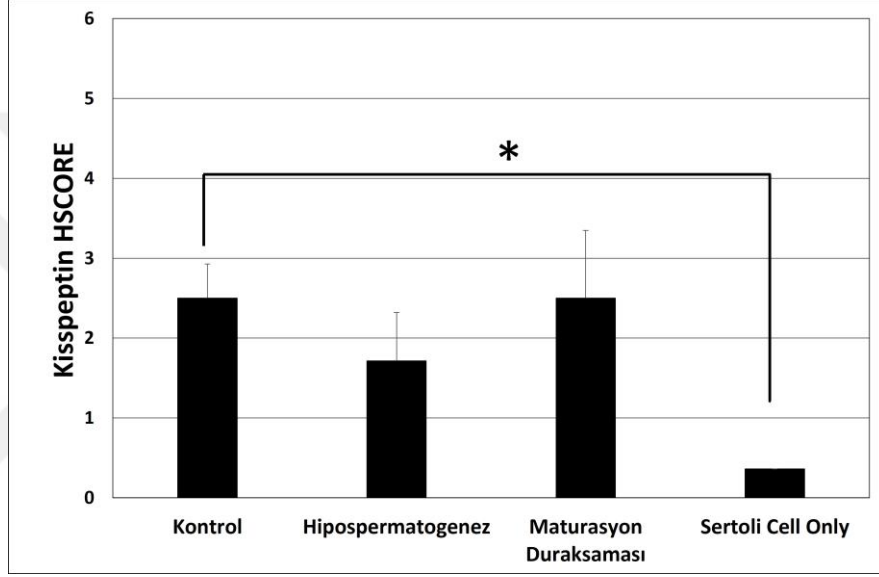
Şekil 4.4. İmmünohistokimyasal olarak Kisspeptin proteininin ekspresyonu. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir.



Şekil 4.5. Kisspeptinin seminifer tübül içindeki germ hücrelerine ait HSCORE analizi.

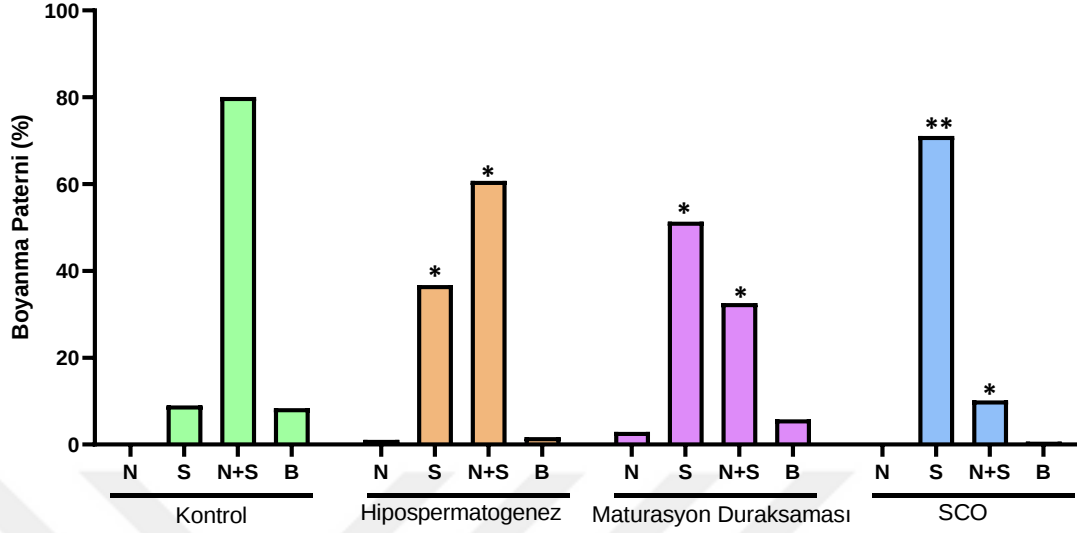
4.2.2. Sertoli hücrelerindeki Kisspeptin Protein Ekspresyonunun HSCORE Yöntemi İle Değerlendirilmesi

Sertoli hücrelerinde Kisspeptin ekspresyonu kontrol, hipospermatogenez ve maturasyon duraksaması gruplarında daha çok nüklear lokalizasyon şeklindeydi. SCO grubundaki hastaların testis dokularına ait Sertoli hücre nükleuslarında ise Kisspeptin ekspresyonunda anlamlı bir azalış izlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kisspeptinin Sertoli hücrelerindeki HSCORE analizi (* $p<0,001$).

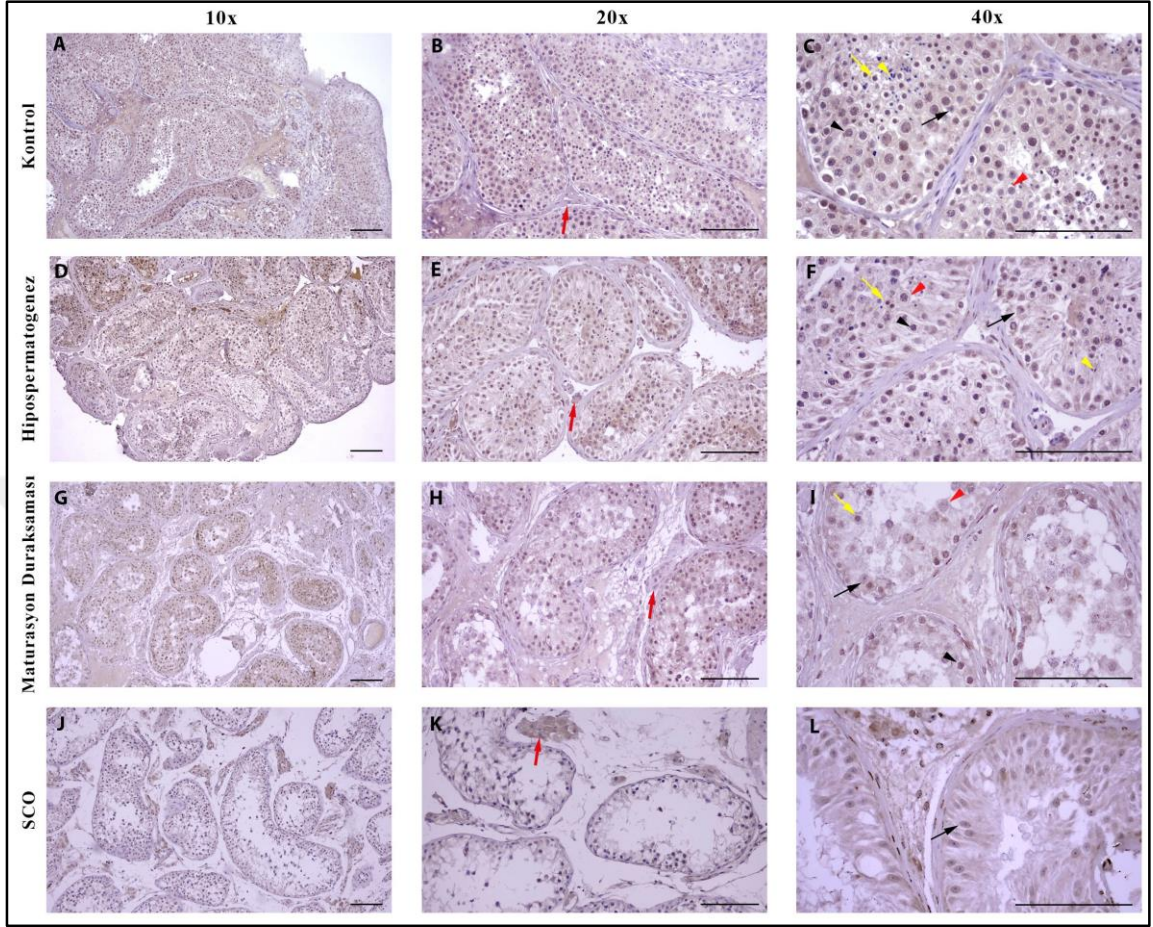
SCO sendromu tipik olarak tübüllerde sadece Sertoli hücrelerinin bulunması olarak tanımlanmaktadır. Çok sık görülmemekle birlikte bu patolojideki hastaların seminifer tübüllerinde birkaç tane germ hücresi görülmektedir. İlginç bir şekilde SCO tanısı konulan 3 hastanın immünohistokimya boyanmasında, negatif boyanan Sertoli hücrelerinin aksine, pozitif Kisspeptin ekspresyonu gösteren spermatogonial hücreler gözlemlendi (Şekil 4.7).



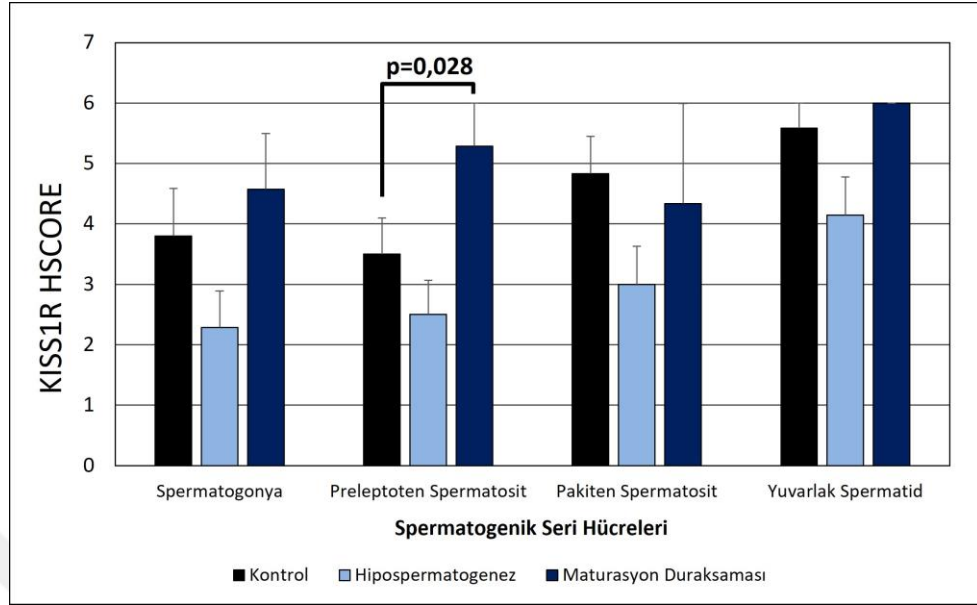
Şekil 4.8. Kisspeptin proteinin Leydig hücrelerindeki ekspresyon paterni (H: Hipospermatogenez, MA: Maturasyon duraksaması, SCO: Sertoli Cell Only; N: nüklear; S:sitoplazmik; N+S: nüklear ve sitoplazmik, B: boyanmayan) (*p<0,05; **p<0,001).

4.2.4. Seminifer Tübül içindeki Spermatogenik Seride KISS1R Protein Ekspresyonunun HSCORE Yöntemi İle Değerlendirilmesi

KISS1R proteini, spermatogoniumlarda kontrol ve hipospermatogenez grubunda gerek sitoplazmik gerekse nüklear ekspresyon gösterirken maturasyon duraksaması grubunda sadece nüklear, sadece sitoplazmik veya her iki paternde de boyanmalar gösterdi. Preleptoten, pakiten ve yuvarlak spermtidlerde kontrol ve hipospermatogenez grubunda izlenen nüklear ve sitoplazmik boyanma paterni, maturasyon duraksaması grubunda daha çok sadece nüklear boyanma şeklinde idi (Şekil 4.9, 4.10).



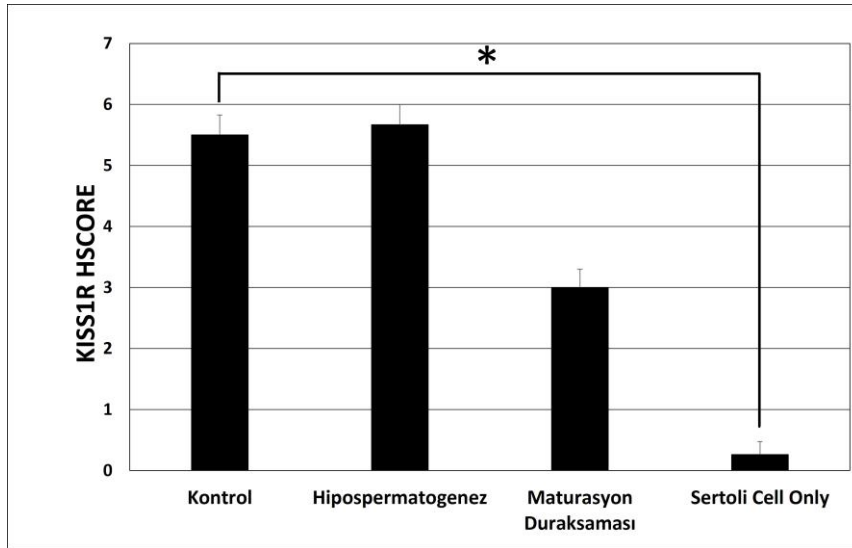
Şekil 4.9. İmmünohistokimyasal olarak KISS1R proteininin ekspresyonu. Kırmızı ok, Leydig hücreleri; siyah ok, Sertoli hücreleri; kırmızı ok başı, preleptoten spermatosit; siyah ok başı, pakiten spermatosit; sarı ok başı, uzayan spermatid; sarı ok, yuvarlak spermatidleri işaret etmektedir. Skala bar görüntüleri 50µm'yi göstermektedir.



Şekil 4.10. KISS1R'nin seminifer tübül içindeki germ hücrelerine ait HSCORE analizi.

4.2.5. Sertoli hücrelerinde KISS1R Protein Ekspresyonunun HSCORE Yöntemi İle Değerlendirilmesi

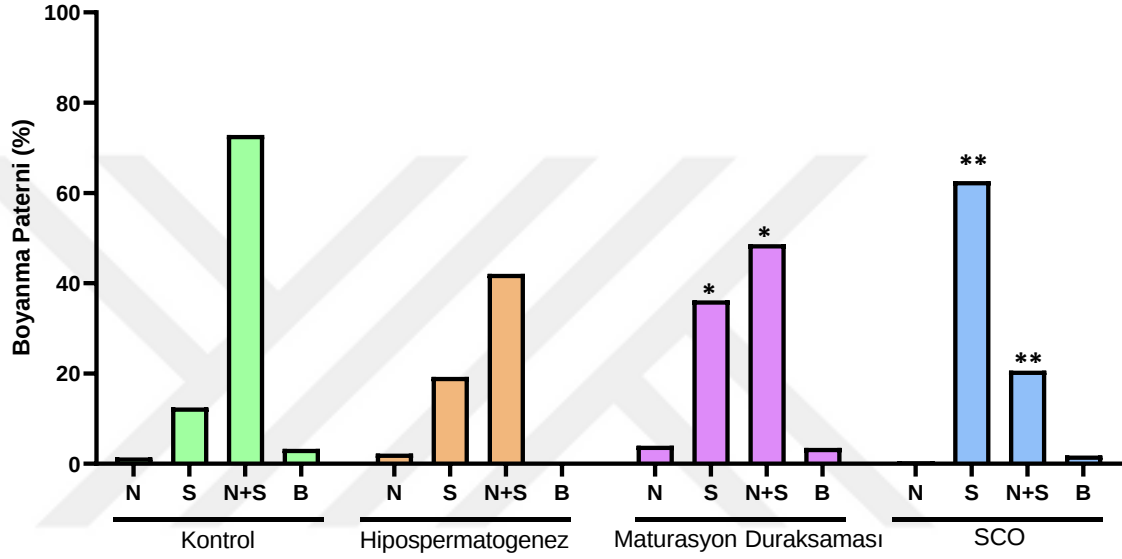
KISS1R ekspresyonu, Sertoli hücrelerinde kontrol, hipospermatogenez ve maturasyon gruplarında daha çok nükleer lokalizasyon şeklindeydi. SCO grubundaki hastaların Sertoli hücrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı derece azalış gösteren KISS1R ekspresyonu dikkat çekti ($p < 0,001$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kisspeptin ve KISS1R'nin Sertoli hücre nükleuslarına ait HSCORE analizi (* $p < 0,001$).

4.2.6. Leydig Hücrelerindeki Kisspeptin ve KISS1R Proteinlerinin Ekspresyonu

Kontrol grubunda Leydig hücrelerinde belirgin sitoplazmik ve nüklear KISS1R ekspresyon vardı. Hipospermatogenez grubunda, kontrol grubu ile benzer olup hem sitoplazmik hem nüklear görülmesine karşın SCO hücre grubunda sadece sitoplazmik boyanma paterni gözlemlendi (Şekil 4.9, Şekil 4.11, Tablo 4.1).



Şekil 4.12. KISS1R proteinin Leydig hücrelerindeki ekspresyon paterni (H: Hipospermatogenez, MA: Maturasyon duraksaması, SCO: Sertoli Cell Only; N: nüklear; S:sitoplazmik; N+S: nüklear ve sitoplazmik, B: boyanmayan) (*p=<0,05, **p=<0,001).

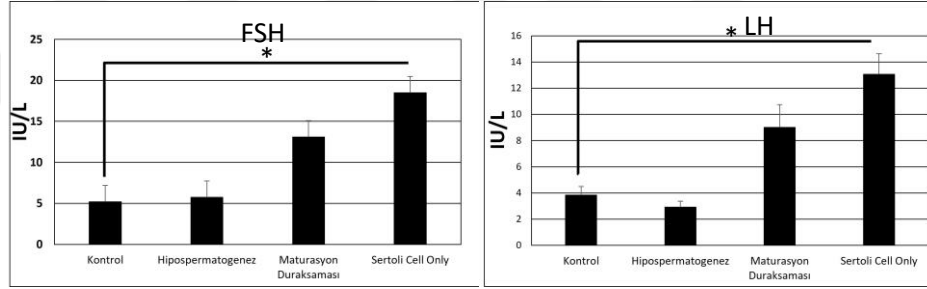
Kisspeptin reseptörü açısından sitoplazmik boyanma izlenen Leydig hücrelerinin yüzdesi, kontrol grubuna kıyasla maturasyon duraksaması ve SCO gruplarında artmıştı (p=0,045, p=<0,001, sırasıyla). Bununla birlikte nüklear ve sitoplazmik boyanma gözlenen Leydig hücre oranı, kontrol grubuna kıyasla maturasyon duraksaması ve SCO gruplarında daha düşüktü (p=0,039, p=<0,001, sırasıyla).

Tablo 4.1. Kisspeptin ve KISS1R proteinlerinin hücresel lokalizasyonunu gösteren tablo (N:nüklear, S:sitoplazmik, -: immüno reaksiyon yok).

Gruplar Spermatogenik Hücreler	Kontrol		Hipospermatogenez		Maturasyon Duraksaması		SCO	
	Kisspeptin	KISS1R	Kisspeptin	KISS1R	Kisspeptin	KISS1R	Kisspeptin	KISS1R
Spermatogonia	N	N+S	N	N+S	N+S	N/S/N+S		
Preleptoten Spermatosit	N	N+S	N	N+S	N/S	N		
Pakiten Spermatosit	N	N+S	N	N+S	N/S	N		
Yuvarlak Spermatid	N	N+S	N	N+S	S	N		
Uzayan Spermatid	-	-	-		-	-		
Sertoli Hücresi	N	N	N	N	N	N	N	
Leydig Hücresi	N+S	N+S	N+S	N+S	N+S/S	N+S/S	SCO	

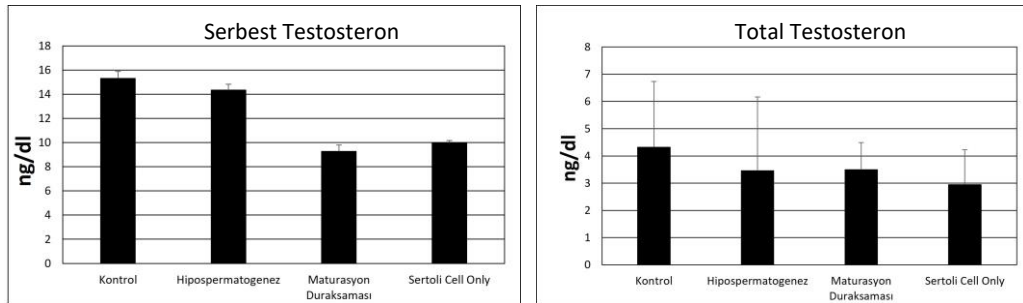
4.3. Steroid Hormon Değerlendirmeleri

SCO grubunda FSH ve LH hormon düzeyleri kontrole kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,001$).



Şekil 4.13. FSH ve LH Hormon Ölçüm Grafikleri (* $p<0,001$).

Serbest ve total testosteron steroid hormon seviyeleri, kontrol grubu, hipospermatogenez, maturasyon duraksaması ve SCO grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı.



Şekil 4.14. Total Testosteron ve Serbest Testosteron Hormon Ölçüm Grafikleri.

5. TARTIŞMA

Spermatogenez, HPG eksenini boyunca endokrin, parakrin ve otokrin modulatorlerinin kontrolü altında, mitotik, mayotik ve farklılaşma olaylarının koordinasyonlu bütünlüğünü gerektiren karmaşık bir süreçtir. Spermatogenez, mitotik hücre bölünmesi yoluyla spermatogonial kök hücrelerin spermatositlere farklılaşmasını ve mayotik hücre bölünmesi ile primer spermatositlerden haploid spermatidlerin üretilmesi süreçlerini içerir. Spermatidler daha sonra spermiogenez adı verilen spermatogenezin son aşamasında spermatozoaya dönüşür (Nishimura ve L'Hernault, 2017). Spermatozoa, 1677'de Antonie van Leeuwenhoek tarafından keşfedildiğinden beri pek çok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Spermatogenezde 2300'den fazla gen keşfedilmiştir (Perrino ve ark., 1987). Bu genlerdeki mutasyonlar infertiliteye neden olabilmektedir. İnfertilite nedenlerinden birisi olan azoospermi, ejakülatta sperm yokluğu olarak tanımlanır, ancak azoospermi tanısı konmuş erkeklerin testis fenotipi, tam spermatogenezden germ hücrelerinin farklı aşamalarda duraksamış maturasyonuna ve tübüllerin tamamen dejenerasyonuna kadar değişken olabilir (Soraggi ve ark., 2021).

Obstrüktif olmayan azoospermi, spermatogenez yetmezliğe yol açan konjenital faktörlerle açıklanır. NOA'nın nedeni hakkında bilgi çok sınırlı olmakla birlikte bu hastaların yaklaşık %50-80'inin tanımlanabilir bir nedeni yoktur ve yüksek genetik heterojenite içermektedir (Pena ve ark., 2020; Kasak ve Laan, 2021). Bununla birlikte spermatogenez yetmezliğinin, erkek infertilitesinde önemli bir neden olduğu bilinmektedir (Cham ve ark., 2021).

Kisspeptin sistemi, hipofiz gonadotropinlerini ve gonadal seks steroidinin üretiminde temel rol oynayan GnRH'nin salgılanması için hipotalamik nöronların yukarıdaki ana pozitif modulatördür (Meccariello ve ark., 2020). Kisspeptin ve reseptörü KISS1R, hem hayvan modellerinde hem de insanlarda puberte başlangıcı, cinsiyet olgunlaşması, üreme ve cinsiyet-steroid geri bildirim mekanizmalarının merkezi kontrolünde önemli rol oynar (Meccariello ve ark., 2020). Kisspeptin/KISS1R sistemi, üreme sistemi üzerindeki etkisinden dolayı son yıllarda oldukça üzerinde durulan ve her geçen gün araştırmaların giderek arttığı bir sistem olmuştur. Kisspeptin sinyalizasyonu, pek çok türde Leydig

hücrelerinin fizyolojisi ve steroid biyosentezi, spermatogenezin ilerlemesi ve spermatozoa fonksiyonları ile ilgili işlevlerinin bilinmesine karşın, insan testisindeki rolü hala bilinmemektedir (Meccariello ve ark., 2020). Biz de mevcut çalışmamızda sağlıklı testis dokuları yanısıra NOA tanısı almış hastalara ait insan testis dokularında Kisspeptin/KISS1R proteinlerinin, somatik ve germ hücrelerindeki varlığını, ekspresyon paternlerini ve olası farklılıkları ortaya koyduk. Çalışmamızda, histopatolojik olarak tanısı konulan, hipospermatogenez, maturasyon duraksaması ve SCO patolojilerine sahip NOA hastalarından alınan insan testis dokuları değerlendirilmiştir.

2014 yılında Hsu ve arkadaşlarının yaşa bağlı olarak farelerde yapmış çalışmada, interstisyumdaki Leydig hücrelerinde Kisspeptinin güçlü şekilde eksprese edildiği fakat KISS1R'nin Leydig hücrelerinin sadece %12'sinde bulunduğu ve KISS1R'nin ayrıca spermatid ve olgun spermatozoa gibi germ hücreleri tarafından da eksprese edildiğini göstermiştir (Hsu ve ark., 2014). Wang ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada ise Kisspeptin ve reseptörünün ekspresyonu interstisyumdaki Leydig hücrelerinde yoğun şekilde gösterilmiştir (Wang ve ark., 2015). Bizim bulgularımızda da insan testis dokularındaki Leydig hücrelerinde gerek Kisspeptin gerekse KISS1R ekspresyonu belirgin bir şekilde izlenmiştir.

Çalışmamızda Kisspeptin ve reseptörünün kontrol grubundaki testis dokularında yoğun ekspresyonuna karşın, maturasyon duraksaması grubunda bazı hücrelerde sitoplazmik bazı hücrelerde gerek sitoplazmik gerekse nüklear, SCO grubunda ise çoğunlukla sitoplazmik boyanma paterni gösterdiği izlenmiştir. Bulgularımıza göre NOA patolojisine sahip hastaların testis dokularında, kontrol dokularına kıyasla Leydig hücrelerinde izlenen değişen ekspresyon paterni dikkat çekici olmuştur. Leydig hücrelerinde Kisspeptin ekspresyon seviyesinin patoloji şiddeti arttıkça (Johnsen skorun azalması) azalış göstermesi, spermatogenezin devamı için gerekli olduğu düşündürmesinin yanı sıra aynı zamanda tümör baskılayıcı bir gen olması testisteki eksikliğin fonksiyon bozukluğunu tetiklemesi yönündeki fikri de güçlendirmektedir.

Kisspeptin ve KISS1R insan spermatozoasında tespit edilmiş ve spermatozoanın motilitesini, spermatozoanın ileri yönlü hareketini ve hiperaktivasyonu etkilediği raporlanmıştır (Pinto ve ark., 2012). Kisspeptinin dişilerde fallop tüplerinde mevcut

olduğunu gösteren çalışmalar, Kisspeptinin kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve/veya fertilizasyon süreçlerine katılabileceğini düşündürmektedir (Hsu ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda açıklanamayan infertilite tanısı konulan kadınlarda serum ve foliküler sıvıdaki Kisspeptin seviyelerinin klinik gebelik oranları ile doğrudan ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Rehman ve ark., 2020). Kadınlarda Kisspeptinin üreme sistemindeki önemine ilişkin çalışma bulgularına karşın, erkek infertilitesindeki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Çalışmamızla birlikte Kisspeptin ve KISS1R proteinlerinin insan testis dokularında seminifer tübül içi ve interstisyel alandaki lokalizasyonu ilk defa tanımlanmıştır. Bununla birlikte, NOA patolojisine sahip hastalardaki ekspresyon ve lokalizasyon paterni de ilk kez gösterilmiştir.

Yetişkin erkek *Macaca mulatta*'da (maymun), KP-10'un periferik uygulaması, GnRH antagonisti ile ön tedavi görmüş erkeklerde hCG ile indüklenen testosteron seviyelerini önemli ölçüde güçlendirmiştir (Irfan ve ark., 2014). Kisspeptinin testosteron seviyelerini arttırması vücuttaki intratestiküler rolünü düşündürmektedir. Aynı maymunlar üzerinde yapılan diğer bir çalışmada Kisspeptinin testosteron üretiminde hiçbir rolü olmadığını ifade edilmiştir (Tariq ve Shabab, 2017). Bunun yanı sıra Kisspeptin sinyalinin spermatogenez veya steroidogenez ile ilgili temel bir işlevi olmadığını belirleyen çalışmalar da vardır (Mei ve ark., 2013). Literatür bilgileri, Kisspeptinin türler arasında testis işlevleri açısından farklılıklar olduğunu belirtmektedir. Bu durum, büyük olasılıkla Kisspeptinin amino asit dizisinin organizasyonundaki farklılıklara ve farklı türler arasındaki reseptörlerin özgüllüklerine bağlı olabilir. Bu nedenle, Kisspeptin ve KISS1R sisteminin lokal testiküler fonksiyonları, her türde benzersiz intratestiküler yerleşimler gösterdiği için fonksiyonları bakımından karışıklıklara sahip olabilir (Samir ve ark., 2018).

Biyobelirteçler, hastalığın tanısı, takibi, seyri ve tedavi geliştirme sürecinin iyileştirilmesinde kritik rol oynar. Ölçülebilir biyolojik süreçler ve klinik sonuçlar arasındaki ilişkiyi anlamak, tüm hastalıklar için tedavi seçeneklerini genişletmek ve normal, sağlıklı fizyoloji anlayışımızı derinleştirmek için hayati önem taşımaktadır. SCO sendromu seminifer tübüllerde sadece Sertoli hücresinin bulunması olarak tanımlansa da yine de bu sendroma sahip hastaların tübüllerinde germ hücreleri ile nadir de olsa

karşılaşılabılır. Standart patoloji laboratuvarlarında yapılan doku takiplerinde ve tanımlanmasında sıklıkla başvuru hematoksin eozin, PAS, Masson Trikrom boyanmaları ile az sayıda bulunan germ hücreleri, Sertoli hücrelerinden çoğu zaman ayırt edilemez. Bulgularımızda SCO tanısı almış 3 hastanın seminifer tübülünde bulunan nadir gözlenen germ hücrelerinin Kisspeptin ile işaretlenmesi, Kisspeptinin klinikte sadece hormonal aksın indükleyici olarak değil aynı zamanda biyobelirteç olarak da kullanılabileceğinin göstergesidir.

Çalışmamızda Ramasamy ve arkadaşlarının bulgularına benzer şekilde FSH steroid hormon seviyelerindeki anlamlı artışı SCO grubunda gözlemledik (Ramasamy ve ark., 2009). Fakat maturasyon duraksaması grubunda FSH seviyesinde yükselme olsa da bulgumuz istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Kisspeptin ve KISS1R puberte başlangıcı, cinsiyet olgunlaşması gibi üreme sisteminin gelişimi ve normal fonksiyonlarının devamı için önemli bir fonksiyona sahip olmakla birlikte türler arası görev ve lokalizasyon farklılıkları göstermesi çalışmaları zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte Kisspeptin ve KISS1R'nin testis gelişimi ve steroidogeneze doğrudan dahil olup olmadığını belirlemek için daha fazla araştırma gereklidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Önemli bir infertilite nedeni olan NOA durumu her yaşta erkekte görülen, infertiliteye ve testiste fonksiyon bozukluğuna neden olabilecek, etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış çok yönlü bir hastalıktır. Obstrüktif olmayan azoospermi etiyolojisinin saptanması ve tedavi protokollerinin geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar genellikle insan materyali ile çalışmadaki zorluklardan dolayı deney hayvanları modellerinde yapılmaktadır. Kisspeptin ile ilgili olarak son yıllarda oldukça dikkat çekici bulgular olmasına rağmen, Kisspeptin/KISS1R sinyal yolları ve mutasyon sonuçları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızla beraber Kisspeptin ve KISS1R proteinlerinin insan testis dokularındaki lokalizasyonları ilk defa tanımlanmış olup, bu proteinlerin NOA hastalarında gerek seminifer tübül içinde gerekse interstisyel alanda değişen ekspresyon düzeyleri yine ilk defa tanımlanarak ortaya konulmuştur.

Kisspeptinin, SCO sendromuna sahip hastalardaki nadir olarak görülen germ hücrelerinin işaretlemesi, klinik durumun histopatolojik olarak teşhisinde biyobelirteç olarak klinikte kullanılabileceğini destekler niteliktedir. Daha ileri çalışmalar ile steroidogenez, spermatogenez, akrozom reaksiyonu, kapasitasyon ve fertilizasyondaki olası rolünü ve öneminin anlaşılmasının yanısıra, bir tedavi seçeneği olabileceği ve/veya fertilite/infertilite ile ilişkili olarak bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı ortaya konulabilir.

KAYNAKLAR

- Abbara, A., Clarke, S. A. ve Dhillon, W. S. 2018. Novel Concepts for Inducing Final Oocyte Maturation in In Vitro Fertilization Treatment. *Endocr Rev* 39(5): 593-628.
- Abbara, A., Narayanaswamy, S., Izzi-Engbeaya, C., Comninou, A. N., Clarke, S. A., Malik, Z., Papadopoulou, D., Clobentz, A., Sarang, Z., Bassett, P., Jayasena, C. N. ve Dhillon, W. S. 2018. Hypothalamic Response to Kisspeptin-54 and Pituitary Response to Gonadotropin-Releasing Hormone Are Preserved in Healthy Older Men. *Neuroendocrinology* 106(4): 401-410.
- Abdelkareem, A. O., Alotaibi, F. T., AlKusayer, G. M., Ait-Allah, A. S., Rasheed, S. M., Helmy, Y. A., Allaire, C., Peng, B., Yong, P. J. ve Bedaiwy, M. A. 2020. Immunoreactivity of Kisspeptin and Kisspeptin Receptor in Eutopic and Ectopic Endometrial Tissue of Women With and Without Endometriosis. *Reprod Sci* 27(9): 1731-1741.
- Ajmal, N., Khan, S. Z. ve Shaikh, R. 2019. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and genetic predisposition: A review article. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* X 3: 100060.
- Akerman, J. P., Hayon, S. ve Coward, R. M. 2020. Sperm Extraction in Obstructive Azoospermia: What's Next? *Urol Clin North Am* 47(2): 147-155.
- Amann, R. P., Hammerstedt, R. H. ve Veeramachaneni, D. N. 1993. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reprod Fertil Dev* 5(4): 361-381.
- Arafah, M., Rashid, S. ve Akhtar, M. 2021. Endometriosis: A Comprehensive Review. *Adv Anat Pathol* 28(1): 30-43.
- Araujo, B. S., Barakat, M. C. P., Dos Santos Simoes, R., de Oliveira Nunes, C., Maciel, G. A. R., Lobo, R. A., Soares-Jr, J. M. ve Barakat, E. C. 2020. Kisspeptin Influence on Polycystic Ovary Syndrome-a Mini Review. *Reprod Sci* 27(2): 455-460.
- Avidor-Reiss, T. 2018. Rapid Evolution of Sperm Produces Diverse Centriole Structures that Reveal the Most Rudimentary Structure Needed for Function. *Cells* 7(7).
- Baker, K. ve Sabanegh, E., Jr. 2013. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results. *Clinics (Sao Paulo)* 68 Suppl 1: 61-73.
- Bednarska, S. ve Siejka, A. 2017. The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What's new? *Adv Clin Exp Med* 26(2): 359-367.
- Beke, A. 2019. Genetic Causes of Female Infertility. *Exp Suppl* 111: 367-383.

- Bellve, A. R. ve Zheng, W. 1989. Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J Reprod Fertil* 85(2): 771-793.
- Brailoiu, G. C., Dun, S. L., Ohsawa, M., Yin, D., Yang, J., Chang, J. K., Brailoiu, E. ve Dun, N. J. 2005. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol* 481(3): 314-329.
- Bull, J. R., Rowland, S. P., Scherwitzl, E. B., Scherwitzl, R., Danielsson, K. G. ve Harper, J. 2019. Real-world menstrual cycle characteristics of more than 600,000 menstrual cycles. *NPJ Digit Med* 2: 83.
- Cham, T. C., Chen, X. ve Honaramooz, A. 2021. Current progress, challenges, and future prospects of testis organoids. *Biol Reprod* 104(5): 942-961.
- Clarke, H., Dhillo, W. S. ve Jayasena, C. N. 2015. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinol Metab (Seoul)* 30(2): 124-141.
- Clarkson, J. ve Herbison, A. E. 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147(12): 5817-5825.
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52(1): 198-236.
- Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., Haugen, T. B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M. T. ve Vogelsong, K. M. 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16(3): 231-245.
- Dang, J., Jin, Z., Liu, X., Hu, D. ve Wang, Z. 2015. Human cord blood mononuclear cell transplantation for the treatment of premature ovarian failure in nude mice. *Int J Clin Exp Med* 8(3): 4122-4127.
- Das, L., Parbin, S., Pradhan, N., Kausar, C. ve Patra, S. K. 2017. Epigenetics of reproductive infertility. *Front Biosci (Schol Ed)* 9: 509-535.
- De Rooij, D. G., Van Dissel-Emiliani, F. M. ve Van Pelt, A. M. 1989. Regulation of spermatogonial proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 564: 140-153.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J. C., Matsuda, F., Chaussain, J. L. ve Milgrom, E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10972-10976.
- Dhillo, W. S., Chaudhri, O. B., Patterson, M., Thompson, E. L., Murphy, K. G., Badman, M. K., McGowan, B. M., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M. A. ve Bloom, S. R. 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90(12): 6609-6615.

- Ehmcke, J., Simorangkir, D. R. ve Schlatt, S. 2005. Identification of the starting point for spermatogenesis and characterization of the testicular stem cell in adult male rhesus monkeys. *Hum Reprod* 20(5): 1185-1193.
- Franca, L. R., Hess, R. A., Dufour, J. M., Hofmann, M. C. ve Griswold, M. D. 2016. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4(2): 189-212.
- Garcia-Galiano, D., Pinilla, L. ve Tena-Sempere, M. 2012. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. *J Neuroendocrinol* 24(1): 22-33.
- Gaytan, F., Garcia-Galiano, D., Dorfman, M. D., Manfredi-Lozano, M., Castellano, J. M., Disen, G. A., Ojeda, S. R. ve Tena-Sempere, M. 2014. Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion. *Endocrinology* 155(8): 3088-3097.
- George, J. T. ve Seminara, S. B. 2012. Kisspeptin and the hypothalamic control of reproduction: lessons from the human. *Endocrinology* 153(11): 5130-5136.
- George, J. T., Veldhuis, J. D., Roseweir, A. K., Newton, C. L., Faccenda, E., Millar, R. P. ve Anderson, R. A. 2011. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J Clin Endocrinol Metab* 96(8): E1228-1236.
- Grachev, P., Li, X. F., Hu, M. H., Li, S. Y., Millar, R. P., Lightman, S. L. ve O'Byrne, K. T. 2014. Neurokinin B signaling in the female rat: a novel link between stress and reproduction. *Endocrinology* 155(7): 2589-2601.
- Greives, T. J., Mason, A. O., Scotti, M. A., Levine, J., Ketterson, E. D., Kriegsfeld, L. J. ve Demas, G. E. 2007. Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology* 148(3): 1158-1166.
- Griswold, M. D. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9(4): 411-416.
- Guimaraes, T., Lopes, G., Ferreira, P., Leal, I. ve Rocha, A. 2012. Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Anim Reprod Sci* 136(1-2): 85-89.
- Habert, R., Lejeune, H. ve Saez, J. M. 2001. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 179(1-2): 47-74.
- Haider, S. G. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233: 181-241.
- Hendriks, S., Dancet, E. A., Meissner, A., van der Veen, F., Mochtar, M. H. ve Repping, S. 2014. Perspectives of infertile men on future stem cell treatments for nonobstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online* 28(5): 650-657.

- Hoeger, K. M., Dokras, A. ve Piltonen, T. 2021. Update on PCOS: Consequences, Challenges, and Guiding Treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 106(3): e1071-e1083.
- Holstein, A. F. ve Weiss, C. 1967. [On the effect of the smooth musculature in the tunica albuginea in the testes of rabbits; measurement of the interstitial pressure]. *Z Gesamte Exp Med* 142(4): 334-337.
- Hrabovszky, E., Ciofi, P., Vida, B., Horvath, M. C., Keller, E., Caraty, A., Bloom, S. R., Ghatei, M. A., Dhillo, W. S., Liposits, Z. ve Kallo, I. 2010. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 31(11): 1984-1998.
- Hsu, M. C., Wang, J. Y., Lee, Y. J., Jong, D. S., Tsui, K. H. ve Chiu, C. H. 2014. Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. *Reproduction* 147(6): 835-845.
- Hu, K. L., Zhao, H., Chang, H. M., Yu, Y. ve Qiao, J. 2017. Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in the Ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 365.
- Hu, K. L., Zhao, H., Min, Z., He, Y., Li, T., Zhen, X., Ren, Y., Chang, H. M., Yu, Y. ve Li, R. 2019. Increased Expression of KISS1 and KISS1 Receptor in Human Granulosa Lutein Cells-Potential Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod Sci* 26(11): 1429-1438.
- Huckins, C. ve Clermont, Y. 1968. Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. *Arch Anat Histol Embryol* 51(1): 341-354.
- Hung, A. J., King, P. ve Schlegel, P. N. 2007. Uniform testicular maturation arrest: a unique subset of men with nonobstructive azoospermia. *J Urol* 178(2): 608-612; discussion 612.
- Hur, C. ve Falcone, T. 2021. Robotic treatment of bowel endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 71: 129-143.
- Inhorn, M. C. ve Patrizio, P. 2015. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update* 21(4): 411-426.
- Irfan, S., Ehmcke, J., Shahab, M., Wistuba, J. ve Schlatt, S. 2016. Immunocytochemical localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the primate testis. *J Med Primatol* 45(3): 105-111.
- Irfan, S., Ehmcke, J., Wahab, F., Shahab, M. ve Schlatt, S. 2014. Intratesticular action of kisspeptin in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Andrologia* 46(6): 610-617.

- Irwig, M. S., Fraley, G. S., Smith, J. T., Acohido, B. V., Popa, S. M., Cunningham, M. J., Gottsch, M. L., Clifton, D. K. ve Steiner, R. A. 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80(4): 264-272.
- Jayasena, C. N., Nijher, G. M., Narayanaswamy, S., De Silva, A., Abbara, A., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Bridges, N. ve Dhillon, W. S. 2014. Age-dependent elevations in plasma kisspeptin are observed in boys and girls when compared with adults. *Ann Clin Biochem* 51(Pt 1): 89-96.
- Johnsen, S. G. 1970. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1(1): 2-25.
- Johnson, L., Amann, R. P. ve Pickett, B. W. 1980. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am J Vet Res* 41(8): 1190-1196.
- Kasak, L. ve Laan, M. 2021. Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Hum Genet* 140(1): 135-154.
- Kauffman, A. S., Gottsch, M. L., Roa, J., Byquist, A. C., Crown, A., Clifton, D. K., Hoffman, G. E., Steiner, R. A. ve Tena-Sempere, M. 2007. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148(4): 1774-1783.
- Kawamura, K., Kawamura, N. ve Hsueh, A. J. 2016. Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Curr Opin Obstet Gynecol* 28(3): 217-222.
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H. ve Maeda, K. 2005. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146(10): 4431-4436.
- Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks, D. J., Phillips, K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E. ve Welch, D. R. 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88(23): 1731-1737.
- Lee, S. Y., Koo, Y. J. ve Lee, D. H. 2021. Classification of endometriosis. *Yeungnam Univ J Med* 38(1): 10-18.
- Lehman, M. N., Coolen, L. M. ve Goodman, R. L. 2010. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151(8): 3479-3489.
- Luciano, A. A., Lanzone, A. ve Goverde, A. J. 2013. Management of female infertility from hormonal causes. *Int J Gynaecol Obstet* 123 Suppl 2: S9-17.

- Makri, A., Msaouel, P., Petraki, C., Milingos, D., Protopapas, A., Liapi, A., Antsaklis, A., Magkou, C. ve Koutsilieris, M. 2012. KISS1/KISS1R expression in eutopic and ectopic endometrium of women suffering from endometriosis. *In Vivo* 26(1): 119-127.
- Marques, C. J., Francisco, T., Sousa, S., Carvalho, F., Barros, A. ve Sousa, M. 2010. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 94(2): 585-594.
- Marques, P., Skorupskaite, K., George, J. T. ve Anderson, R. A. 2000. Physiology of GnRH and Gonadotropin Secretion. *Endotext*. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce et al. South Dartmouth (MA).
- Marques, P. I., Fernandes, S., Carvalho, F., Barros, A., Sousa, M. ve Marques, C. J. 2017. DNA methylation imprinting errors in spermatogenic cells from maturation arrest azoospermic patients. *Andrology* 5(3): 451-459.
- Martin-du Pan, R. C. ve Campana, A. 1993. Physiopathology of spermatogenic arrest. *Fertil Steril* 60(6): 937-946.
- Meccariello, R., Fasano, S. ve Pierantoni, R. 2020. Kisspeptins, new local modulators of male reproduction: A comparative overview. *Gen Comp Endocrinol* 299: 113618.
- Mei, H., Doran, J., Kyle, V., Yeo, S. H. ve Colledge, W. H. 2013. Does Kisspeptin Signaling have a Role in the Testes? *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 198.
- Meier, R. K. 2018. Polycystic Ovary Syndrome. *Nurs Clin North Am* 53(3): 407-420.
- Meo, S. A., Arif, M., Rashied, S., Khan, M. M., Vohra, M. S., Usmani, A. M., Imran, M. B. ve Al-Drees, A. M. 2011. Hypospermatogenesis and spermatozoa maturation arrest in rats induced by mobile phone radiation. *J Coll Physicians Surg Pak* 21(5): 262-265.
- Merritt, B. A., Behr, S. C. ve Khati, N. J. 2020. Imaging of Infertility, Part 1: Hysterosalpingograms to Magnetic Resonance Imaging. *Radiol Clin North Am* 58(2): 215-225.
- Messenger, S. 2005. Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *J Neuroendocrinol* 17(10): 687-688.
- Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A., Michalovich, D., Moore, D. J., Calamari, A., Szekeres, P. G., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J. E., Middleton, S. E., Darker, J. G., Larminie, C. G., Wilson, S., Bergsma, D. J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K. L. ve Harrison, D. C. 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276(31): 28969-28975.

- Mut, A., Erel, C. T., Inan, D. ve Oner, Y. O. 2021. Serum kisspeptin levels correlated with anti-mullerian hormone levels in women with and without polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 37(5): 462-466.
- Nakamura, S., Miyado, M., Saito, K., Katsumi, M., Nakamura, A., Kobori, Y., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Yoshida, A., Okada, H., Hata, K., Nakabayashi, K., Okamura, K., Ogata, H., Matsubara, Y., Ogata, T., Nakai, H. ve Fukami, M. 2017. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. *Andrology* 5(4): 824-831.
- Nishimura, H. ve L'Hernault, S. W. 2017. Spermatogenesis. *Curr Biol* 27(18): R988-R994.
- O'Donnell, L., Smith, L. B. ve Rebourcet, D. 2022. Sertoli cells as key drivers of testis function. *Semin Cell Dev Biol* 121: 2-9.
- Oakley, A. E., Clifton, D. K. ve Steiner, R. A. 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 30(6): 713-743.
- Panidis, D., Rousso, D., Koliakos, G., Kourtis, A., Katsikis, I., Farmakiotis, D., Votsi, E. ve Diamanti-Kandarakis, E. 2006. Plasma metastin levels are negatively correlated with insulin resistance and free androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 85(6): 1778-1783.
- Pena, V. N., Kohn, T. P. ve Herati, A. S. 2020. Genetic mutations contributing to non-obstructive azoospermia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 34(6): 101479.
- Perrino, F. W., Rein, D. C., Bobst, A. M. ve Meyer, R. R. 1987. The relative rate of synthesis and levels of single-stranded DNA binding protein during induction of SOS repair in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 209(3): 612-614.
- Pinto, F. M., Cejudo-Roman, A., Ravina, C. G., Fernandez-Sanchez, M., Martin-Lozano, D., Illanes, M., Tena-Sempere, M. ve Candenas, M. L. 2012. Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *Int J Androl* 35(1): 63-73.
- Qin, C., Li, J. ve Tang, K. 2018. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology* 159(9): 3458-3472.
- Ramasamy, R., Lin, K., Gosden, L. V., Rosenwaks, Z., Palermo, G. D. ve Schlegel, P. N. 2009. High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 92(2): 590-593.
- Ramphul, K. ve Mejias, S. G. 2021. Sertoli-Cell-Only Syndrome. *StatPearls*. Treasure Island (FL).

- Ramzan, M. H., Ramzan, M., Ramzan, F., Wahab, F., Jelani, M., Khan, M. A. ve Shah, M. 2015. Insight into the serum kisspeptin levels in infertile males. *Arch Iran Med* 18(1): 12-17.
- Rehman, R., Zafar, A., Ali, A. A., Baig, M. ve Alam, F. 2020. Impact of serum and follicular fluid kisspeptin and estradiol on oocyte maturity and endometrial thickness among unexplained infertile females during ICSI. *PLoS One* 15(10): e0239142.
- Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A. ve Kottler, M. L. 2008. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 20(3): 381-393.
- Rometo, A. M., Krajewski, S. J., Voytko, M. L. ve Rance, N. E. 2007. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7): 2744-2750.
- Ross MH, P. W. 2017. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*.
- Rotterdam, E. A.-S. P. C. W. G. 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81(1): 19-25.
- Rui, L. 2013. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord* 14(4): 387-407.
- Russell, L. D., Ren, H. P., Sinha Hikim, I., Schulze, W. ve Sinha Hikim, A. P. 1990. 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.
- Safran, A., Reubinoff, B. E., Porat-Katz, A., Schenker, J. G. ve Lewin, A. 1998. Assisted reproduction for the treatment of azoospermia. *Hum Reprod* 13 Suppl 4: 47-60.
- Samir, H., Nagaoka, K. ve Watanabe, G. 2018. Effect of kisspeptin antagonist on goat in vitro Leydig cell steroidogenesis. *Theriogenology* 121: 134-140.
- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Jr., Shagoury, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K. M., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U. B., Slaugenhaupt, S. A., Gusella, J. F., O'Rahilly, S., Carlton, M. B., Crowley, W. F., Jr., Aparicio, S. A. ve Colledge, W. H. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349(17): 1614-1627.
- Sharma, A., Thaventhiran, T., Minhas, S., Dhillo, W. S. ve Jayasena, C. N. 2020. Kisspeptin and Testicular Function-Is it Necessary? *Int J Mol Sci* 21(8).

- Sharma, R., Biedenharn, K. R., Fedor, J. M. ve Agarwal, A. 2013. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 11: 66.
- Sharpe, R. M. 1984. Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 30(1): 29-49.
- Smith, J. T., Popa, S. M., Clifton, D. K., Hoffman, G. E. ve Steiner, R. A. 2006. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 26(25): 6687-6694.
- Soderstrom, K. O. ve Suominen, J. 1982. Human hypospermatogenesis. Histopathology and ultrastructure. *Arch Pathol Lab Med* 106(5): 231-234.
- Soraggi, S., Riera, M., Rajpert-De Meyts, E., Schierup, M. H. ve Almstrup, K. 2021. Evaluating genetic causes of azoospermia: What can we learn from a complex cellular structure and single-cell transcriptomics of the human testis? *Hum Genet* 140(1): 183-201.
- Starc, A., Trampus, M., Pavan Jukic, D., Rotim, C., Jukic, T. ve Polona Mivsek, A. 2019. Infertility and Sexual Dysfunctions: A Systematic Literature Review. *Acta Clin Croat* 58(3): 508-515.
- Takagi, S., Itoh, N., Kimura, M., Sasao, T. ve Tsukamoto, T. 2001. Spermatogonial proliferation and apoptosis in hypospermatogenesis associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 76(5): 901-907.
- Tamrakar, S. R. ve Bastakoti, R. 2019. Determinants of Infertility in Couples. *J Nepal Health Res Counc* 17(1): 85-89.
- Tariq, A. R. ve Shabab, M. 2017. Effect of kisspeptin challenge on testosterone and inhibin secretion from in vitro testicular tissue of adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Andrologia* 49(1).
- Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Hattori, M., Nishimura, A., Ohtaki, T. ve Shintani, Y. 2004. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim Biophys Acta* 1678(2-3): 102-110.
- Teves, M. E. ve Roldan, E. R. S. 2022. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiol Rev* 102(1): 7-60.
- Treuting PM, D. S., Montine KS 2018. Comparative Anatomy And Histology A Mouse, Rat, And Human Atlas.
- Vander Borgh, M. ve Wyns, C. 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 62: 2-10.

- Wahab, F., Atika, B., Shahab, M. ve Behr, R. 2016. Kisspeptin signalling in the physiology and pathophysiology of the urogenital system. *Nat Rev Urol* 13(1): 21-32.
- Wang, J. Y., Hsu, M. C., Tseng, T. H., Wu, L. S., Yang, K. T. ve Chiu, C. H. 2015. Kisspeptin expression in mouse Leydig cells correlates with age. *J Chin Med Assoc* 78(4): 249-257.
- Witchel, S. F. ve Tena-Sempere, M. 2013. The Kiss1 system and polycystic ovary syndrome: lessons from physiology and putative pathophysiologic implications. *Fertil Steril* 100(1): 12-22.
- Wong, W. J. ve Khan, Y. S. 2021. Histology, Sertoli Cell. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Wosnitzer, M., Goldstein, M. ve Hardy, M. P. 2014. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis* 4: e28218.
- Wosnitzer, M. S. ve Goldstein, M. 2014. Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am* 41(1): 83-95.
- Xiong, Y., Liu, T., Wang, S., Chi, H., Chen, C. ve Zheng, J. 2017. Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway. *Gene* 596: 1-8.
- Yang, Y., Ma, M. Y., Xiao, C. Y., Li, L., Li, S. W. ve Zhang, S. Z. 2008. Massive deletion in AZFb/b+c and azoospermia with Sertoli cell only and/or maturation arrest. *Int J Androl* 31(6): 573-578.
- Yeh, J., Kim, B. S., Gaines, L., Peresie, J., Page, C. ve Arroyo, A. 2008. The expression of hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels in the rat ovary are dependent on the type of cell and the reproductive age of the animal: a laboratory investigation. *Reprod Biol Endocrinol* 6: 35.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L. ve van der Poel, S. 2017. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod* 32(9): 1786-1801.
- Zou, P., Wang, X., Chen, Q., Yang, H., Zhou, N., Sun, L., Chen, H., Liu, J., Ao, L., Cui, Z. ve Cao, J. 2019. Kisspeptin Protein in Seminal Plasma Is Positively Associated with Semen Quality: Results from the MARHCS Study in Chongqing, China. *Biomed Res Int* 2019: 5129263.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	GAMZE	Uyruğu	
Soyadı	ZENGİN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Afyonkarahisar Kocatepe Anadolu Lisesi	2015
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2019

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖK-DİL	60

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Maternal sirkadiyen ritim değişikliğinin testisdeki DNA metilasyonunda transgenerasyonel etkisi, araştırmacı	Akdeniz, BAP	2 yıl (2020-2021)
Gebelik ve laktasyon süreçleri boyunca sirkadiyen ritim değişikliğinin ovaryumda hücre proliferasyonu ve apoptozu üzerindeki etkilerinin araştırılması, araştırmacı	Akdeniz, BAP	2 yıl (2020-2021)
Gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca maternal sirkadiyen ritim değişikliğinin, erişkin yavru erkek sıçanlardaki davranış, gonadal DNA metilasyonu ve transkriptomu üzerindeki transgenerasyonel etkisi, araştırmacı	TÜBİTAK, 1001	9 ay (2020-2021)
Kronik etanole maruz kalan sıçanlarda asetil-L-Karnitin uygulamasının EEG üzerine etkileri, araştırmacı	Akdeniz, BAP	2022-devam

Kronik etanole maruz kalan sıçanların mide dokusunda oksidatif stres endoplazmik retikulum stres ve apopitozis üzerine asetilkarnitin uygulamasının etkileri	Akdeniz, BAP	2022-devam
--	---------------------	-------------------

Burslar-Ödüller:

TÜBİTAK 1001 Projesi Araştırmacı Bursiyer (2020 Kasım-2021 Temmuz).

