

T.C.

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**SİKLOFOSFAMİD ARACILIĞIYLA RAT AZOSPERMİ
MODELİNE ABALOPARATİTE’NİN TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Tunahan YAPICI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Manisa
2025

T.C.

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**SİKLOFOSFAMİD ARACILIĞIYLA RAT AZOSPERMİ
MODELİNE ABALOPARATİTE’NİN TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Tunahan YAPICI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Manisa
2025

ÖNSÖZ

İnfertilite günümüzün en büyük sağlık sorunlarından bir tanesidir. İnfertilite tanısında pek çok branş multidisipliner çalışarak tanı ve tedavi yöntemleri kullanmaktadır. Ancak yine günümüzün en büyük problemlerinden olan kanser ve otoimmün hastalıklar ile bunların tedavilerinde kullanılan ilaçların yan etkileri ne yazık ki tam olarak aşılamamaktadır. Pek çok tedavi seçeneği olsa da büyük sağlık problemleriyle savaşılan hastalar için bir de infertilite problemleri ve gelecek kaygısı eklenmesi oldukça dikkat çeken bir klinik tablodur.

Abaloparatid (ABL) parathormonun reseptör analogudur. Parathormon gibi pek çok metabolik olayda görev yapar. Parathormon reseptörü üzerinden hücrel yolaklara etki eder. Bu da bize infertilite sebeplerinden biri olan siklofosfamid (SF) kullanımında abaloparatidin koruyucu rolü olabileceğini düşündürmüştür. Parathormon ve türevlerinin infertilite ve hücrel sağ kalım etkileri bizi bu arayışa itmiştir.

Bu çalışmada siklofosfamid ile indüklenmiş erkek infertilitesi hastalığının hayvan modelinde abaloparatid uygulamasının çeşitli hücrel yollar üzerinden tedavi edici etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, hayvanlardan alınan testis dokularında CREB, PCNA, HSPA4 ve REC8 gibi moleküllerin düzeyi tespit edilmiştir. Bu çalışmada sonuç olarak abaloparatid isimli preparatın antineoplastik ilaç uygulamaları ilişkili erkek infertilitesi hastalığı tedavisinde etkili olabileceği görülmüştür. Beklentimiz yeni çalışmalarla abaloparatidin bu patofizyolojik süreçte profilaktik kullanımı, hastalık sonrası kullanımı ve doz seçimleri ile klinik pratikte işe yarayabilecek verilerin elde edilmesidir.

TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık eğitimim boyunca öğrettikleri değerli bilgiler, yol ve yöntemler için ve maddi manevi her anlamda rehberlik ettikleri için başta tez danışmanı hocam sayın Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN'e (en çok da sabırları için) olmak üzere saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER, Prof. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU ve Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ 'a,

Eğitim sürecim boyunca birlikte güzel vakitler geçirdiğim Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan sevgili eşim Uzm. Dr. Nurbanu AYGÜNDÜZ YAPICI'ya, bana her anlamda destek olan başta rahmetli babam Şükrü YAPICI olmak üzere bütün aileme ve dostlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne tez projesini maddi olarak destekledikleri için teşekkür ederim.

İçindekiler Tablosu

ÖNSÖZ.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLO DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	4
2.1.1. Spermatogenez	5
2.2. İnfertilite	5
2.2.1. Tanım	5
2.2.2. İnsidans.....	5
2.2.3. Erkek İnfertilite Patolojisi	5
2.3. Siklofosfamid	6
2.3.1. Siklofosfamide Bağlı Erkek İnfertilitesi.....	8
2.3.2. Siklofosfamid Tedavisi Alan Erkek Hastalar İçin Fertilite Koruma Stratejileri	10
2.4. Abaloparatid	12
2.4.1. Abaloparatid'in Sentetik Bir PTHrP Analogu Olarak Genel Bakışı	12
2.4.2. Etki Mekanizması	13
2.4.3. Terapötik Uygulamalar ve Klinik Etkinlik.....	15
2.4.4. Endikasyon Dışı ve Gelişmekte Olan Kullanımların Keşfi.....	15
2.4.5. Önerilen Dozaj ve Uygulama Yolu	15
2.4.6. Yan Etkiler.....	16
2.4.7. Ciddi Uyarılar ve Kontrendikasyonlar	16
2.4.8. Özel Popülasyonlar ve Hususlar	17
2.4.9. Gelecek Yönelimler	18
2.5. CREB	18
2.5.1. CREB Yaygın Bir Transkripsiyon Faktörüdür.....	18
2.5.2. Hücrel Yolaklara Etkisi	19
2.5.3. Erkek Üreme Sistemi ile İlişkisi.....	20
2.6. PCNA.....	22
2.6.1. Moleküler Yapı ve İşlevi.....	22
2.6.2. DNA Replikasyonu, Onarımı, Rekombinasyonundaki Rolü	22
2.6.3. PCNA'nın Erkek Üreme Sistemindeki ve Spermatogenezdeki Rolü	22

2.7. HSPA4	26
2.7.1. HSPA4 Çok Fonksiyonlu Bir Şaperon	26
2.7.2. Temel Hücresel Roller: Protein Katlanması, Stres Yanıtı ve Protein Kalitesi Kontrolü	27
2.7.3. Düzenleme ve İfade Kalıpları	27
2.7.4. HSPA4'ün Erkek Üreme Sağlığındaki Kritik Rolü	27
2.8. REC8	31
2.8.1. Tanım ve Moleküler Özellikler.....	31
2.8.2. Mayozda REC8	31
2.8.3. REC8 ve Erkek Fertilitesi	33
2.9. GAPDH.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Hayvanların Alınması, Barındırılması	35
3.2. Çalışmanın Tasarımı.....	35
3.3. Yöntem.....	36
3.3.1. Parafin Takip-Kesit Alma İşlemi-Hematoksilen Eozin Boyama	36
3.3.2. İmmünohistokimya.....	39
3.3.3. Western Blotlama	40
3.4. İstatistiksel Analiz.....	48
4. BULGULAR.....	50
4.1. Sıçanların Vücut ve Testis Ağırlıkları Bulguları.....	50
4.2. Histokimya Bulguları.....	56
4.2.1. H&E Bulguları	56
4.2.2. İmmünohistokimya Bulguları	61
4.3. Western Blot Bulguları	73
5. TARTIŞMA.....	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	84
7. ÖZET	86
8. İNGİLİZCE ÖZET	87
9. KAYNAKLAR	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABL	Abaloparatid
Å	Armstrong
ASA	Anti Sperm Antikor
BSA	Sığır Serum Albumin
DEHAM	Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CaM	Kalmodulin
CBR	CREB Bağlayıcı Protein
CFTR	Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Düzenleyicisi
CREB	cAMP Response Element ilişkili Protein
CREM	CREB modölatör protein
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Açık Alan Testi
GnRHa	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonistleri
GPCR	G Protein Kenetli Reseptör
Gs	G Stimulan
HE	Hemotoksilen Eozin

HHG	Hipotalamik Hipofiz Gonadal Aks
HSP	Isı Şok Proteini
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IUI	Intra Uterin İnseminasyon
İVF	İn Vivo Fertilizasyon
İL-10	İnterlökin 10
kDA	Kilo Dalton
LH	Luteinize Edici Hormon
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NER	Nükleotit Kesip Çıkarıp Onarma
PBS	Posphate Buffer Solution (Fosfat Buffer Solüsyonu)
PCNA	Proliferatif Hücre Çekirdek Antijeni
PKA	Protein Kinaz A
PTH1R	Paratiroid Hormon 1 Reseptörü
PTHrP	Paratiroid Hormon İlişkili Proteinin
SARSCoV2	Ciddi Akut Solunum Yolu Sendromu Corona Virüs 2
SH	Sertoli Hücresi
SF	Siklofosfamid

SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SMK	Yapısal Kromozom Bakımı
Spga	Spermatogonyum
TA	Testis Ağırlığı
TBS	Tris Tamponlu Salin
TBST	Tween 20'li Tris Tamponlu Salin
UV	Ultraviyole
VA	Vücut Ağırlığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: PTH ile PKA ve CREB ilişkisi (40).....	13
Şekil 2: PTH1R ile Osteoklast ve Osteoblast (41).....	14
Şekil 3: CREB ve Anti-inflamasyon (49).....	19
Şekil 4: PTH ve CREB ile Antiapoptoz Etki (57).....	21
Şekil 5: PCNA ve Hücre Siklusu (71)	26
Şekil 6: Mayoz ve Rec8 ilişkisi (16)	34
Şekil 7: Deney Hayvanları Laboratuvarı	35
Şekil 8: İmmunohistokimya Uygulaması.....	40
Şekil 9: Protein Miktarları.....	42
Şekil 10: Jel Örnek Yükleme ve Elektroforez	45
Şekil 11: Transfer İşlemi	46
Şekil 12: Ponceau Boyaması.....	46
Şekil 13: Transfer Sonrası Membranlar.....	48
Şekil 14: Rat Vücut Ağırlıkları Değişimi	51
Şekil 15: 1. Gün ve 56. Gün Ağırlık Değişimleri	52
Şekil 16: 56. Gün Sağ Testis Ağırlıkları.....	53
Şekil 17: Total Ağırlık/Testis Ağırlığı (Tİ).....	54
Şekil 18: Testis İndeks.....	55
Şekil 19: Rat Testis H&E boyaması (Transvers Kesit).....	58
Şekil 20: Johnsen Skorları.....	59
Şekil 21: Johnson Skorları Dağılımları	60
Şekil 22: Anti CREB İmmunohistokimyası Boyanma Yüzdesi.....	62
Şekil 23: Anti CREB İmmunohistokimyası.....	63
Şekil 24: Anti PCNA İmmunohistokimyası Boyanma Yüzdesi.....	65
Şekil 25: Anti PCNA İmmunohistokimyası.....	66
Şekil 26: Anti HSPA4 İmmunohistokimyası Boyanma Yüzdesi	68
Şekil 27: Anti HSPA4 İmmunohistokimyası	69
Şekil 28: Anti REC8 İmmunohistokimyası Boyanma Yüzdesi	71
Şekil 29: Anti REC8 İmmunohistokimyası	72
Şekil 30: GAPDH (housekeeping) antikor UVP görüntüleme sonucu	73
Şekil 31: CREB antikor UVP görüntüleme.....	74
Şekil 32: PCNA antikor UVP görüntüleme.....	74
Şekil 33: HSPA4 antikor UVP görüntüleme.....	74
Şekil 34: REC8 antikor UVP görüntüleme	75

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Siklofosfamidin Temel Özellikleri.....	8
Tablo 2: Siklofosfamid Testis Toksisitesi.....	10
Tablo 3: Parafin Takip Protokolü	37
Tablo 4: Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü	38
Tablo 5: Standartlar	41
Tablo 6: Seperating Jel Formülü	43
Tablo 7: Stacking Jel Formülü	44
Tablo 8: Primer Antikorlar ve Dilüsyonları	47
Tablo 9: 1. Gün ve 56. Gün Hayvan Ağırlıkları.....	51
Tablo 10: 56. Gün Sağ Testis Ağırlıkları.....	52
Tablo 11: Testis/Total Ağırlık ve Testis İndeks.....	54
Tablo 12: Johnsen Skorları.....	59



1. GİRİŞ

İnfertilite, bir çiftin 12 aylık korunmasız cinsel ilişkisinden sonra hamileliğin gerçekleşmemesi olarak tanımlanmakta, erkeğe ve kadına bağlı nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü Dünya çapında çiftlerin %9' unun doğurganlık sorunlarıyla mücadele ettiğini ve erkek faktörünün bunun %50' sine katkıda bulunduğunu tahmin etmektedir. İnfertiliteye neden olan erkek faktörünün pek çok nedeni bulunmaktadır (2).

Son 15-20 yılda üreme çağındaki erkeklerde bazı yaygın kanserlerin tedavisindeki çarpıcı başarı, ileri dönemlerde testisler gibi normal dokulara verilen zarar nedeniyle endişenin artmasına yol açmıştır. Kemoterapi ve radyasyon tedavisi, tek başlarına veya kombinasyon halinde yaygın olarak kullanılması, germ hücresi tükenmesine ve sperm sayısının azalmasına bağlı infertiliteye neden olmaktadır. Bu amaç için testis hasarının patofizyolojisini ve klinik ekspresyonunu anlamak önemlidir. İlaç türü (özellikle alkilleiyici ajanlar), tedavi süresi, tedavi yoğunluğu ve ilaç kombinasyonu testis hasarının kapsamını ve süresini belirlemede önemli değişkenlerdir (3).

Siklofosfamid yaygın olarak kullanılan antineoplastik ve immünosupresif ilaçlardan biridir. Siklofosfamid, diğer antineoplastik ajanlarla birlikte meme, lenfoid ve pediatrik maligniteler dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Siklofosfamidin toksik etkileri arasında kemik iliği baskılanması, kardiyak toksisite, hemorajik sistit gözlenmektedir (4). Siklofosfamid tedavisi uygulanan erkeklerde gözlenen önemli bir yan etkilerden birisi spermatogonyal hücre harabiyetine bağlı infertilitenin ortaya çıkmasıdır (5).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda siklofosfamidin testis üzerine toksik etkileri incelenmiş ve çeşitli ilaç tedavileri ile gonadal toksite önlenmeye çalışılmaktadır. PTH1R'nin, hem epididim ve hemde testiste eksprese edildiği Kabakulak virüsü veya Lipopolisakkarit kaynaklı enflamatuvar yanıtları hafiflettiği ve hem fare modelinde hem de insan örneklerinde sperm fonksiyonlarını önemli ölçüde iyileştirdiği ileri sürülmektedir (6–8).

Abaloparatid, osteoporoz tedavisi için geliştirilen insan paratiroid hormon-ilışkili proteinin (PTHrP) (1-34) araştırma analogudur. Abaloparatidin amino asit dizisi, ilk 20 amino asitteki PTHrP ile aynıdır, kalan amino asitlerin yarısından fazlası farklıdır. Hayvanlarda ve insanlarda yapılan bazı çalışmalar

abaloparatidin, teriparatide kıyasla kemik Emilimi üzerinde azaltılmış etkileri olan güçlü bir anabolik aktivite sunduğunu bildirmiştir (6–9).

Abaloparatidin proteinkinaz A ve cAMP response element-binding protein (CREB) aktivitesine neden olduğu bildirilmiş olmasına rağmen testis üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir (10). Memelilerde spermin normal üretimi için FSH' nin Sertoli hücrelerine (SH) bağlanması gerekir. cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein yani CREB, FSH' nin gen ifadesinde neden olduğu değişikliklerin başlıca aracısıdır (11). CREB' in testis üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Glioma hücre proliferasyonda CREB' in rol oynadığı ve Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) üzerinden etki yaptığı ileri sürülmektedir (12).

PCNA nükleik asit metabolizmasında önemli roller oynadığı, DNA replikasyonu sağladığı ve DNA eksizyon onarımında yer aldığı bilinmektedir. PCNA spermatogonyal kök hücreler için bir proliferasyon markerı olarak kabul edilmektedir. PCNA ekspresyonu, hücrede G1/S fazında artmakta ve G2/M fazında azalmaktadır (13). Daha önce yapılan çalışmada siklofosfamid uygulaması sonrasında PCNA ekspresyonun germ hücrelerinde azaldığı, sinaptik asit uygulamasının ise PCNA ekspresyonun arttığı ve spermatogonyum sayısının normale yaklaştığı gösterilmiştir (14,15).

Mayoz bölünmenin spesifik markerı ve kromozomal adhesive protein kompleksi olan REC8 mayoz homolog kromozomların eşleşmesi ve ayrılmasını sağlamaktadır. REC8 mayoz bölünme sırasında homolog kromozomların eşleştirilmesi ve rekombinasyonu sırasında kromozomal mimariyi modüle etmedeki işlevi açısından analiz edilmiştir (16). Bu çalışmada REC8 ekspresyonu, abaloparatidin spermatogenezis üzerine koruyucu etkisini mayoz bölünme sağlığı üzerinden belirlemek amacıyla kullanılacaktır.

Isı şoku proteinleri (HSP'ler) içeren kompleksler, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması ve birleştirilmesini ve sitozol, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi farklı hücresel bölmelerde şaperonların ana bileşenlerini temsil eder. Yetişkin farede HSPA4 mRNA çoğu dokuda saptanır ve en yüksek ifade testis, yumurtalık ve dalakta bulunur. HSPA4 eksikliğinde spermatogenezde ve sperm motilitesinde bozulmaya neden olduğu, spermatogenez mayotik profaz aşamasında durdurduğu, testiste birçok spermatosit pakiten aşamasında dejenere olduğu ve seminifer tübüllerin

çoğunda yuvarlak ve uzun spermatidler olmadığı bildirilmiştir. HSPA4 sperm kalitesi ile ilişkili protein olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada sperm kalitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır (17,18).



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi testisler, bir kanal (duktal) sistemi ve cinsel aksesuar organlardan oluşur. Cinsiyet aksesuar organları (örneğin seminal veziküller, prostat ve bulboüretral bezler) tarafından oluşturulan sıvılarla birlikte testisler tarafından sperm üretimi, spermatozoaların hayatta kalmasını destekleyen ve canlı spermin kadın üreme sistemine iletilmesi için üreme kanallarından (örneğin epididim, vas deferens, ejakülasyon kanalı ve üretra) hareket edebilecekleri bir ortam sağlayan bir salgı üretir (19).

Testisler hem endokrin hem de ekzokrin işlevi olan erkek cinsiyet bezleridir. Testisler skrotumda bulunan ve skrotal septumla ayrılmış oval şekilli üreme yapılarıdır. Testislerin şekli fasulye şeklindedir ve 3 cm x 5 cm uzunluğunda ve 2 cm ile 3 cm genişliğindedir. Skrotumdan palpe edildiğinde, testisler pürüzsüz ve yumuşaktır. Spermatik kordon, testislerin üst kısmını askıya alır. Alt uçta, testisler gubernakulumun bir parçası olan skrotal ligament ile skrotuma bağlanır. Genellikle sol testis, sağ testisten biraz daha aşağıda yer alır.

Çift katlı tunika vajinalis, epididim ve spermatik kordonun bağlandığı arka ve üst sınırlar hariç testisleri sarar. Tunika vajinalisin iç veya viseral tabakası, epididim, testisler ve vas deferense yakındır. Testislerin arka lateral yüzeyinde, testisler ile epididim gövdesi arasında epididim sinüsü olarak bilinen küçük bir boşluk bulunur. Tunika vajinalisin derinlerinde, testisleri kaplayan dayanıklı bir lifli örtü olan tunika albuginea bulunur.

Epididim oldukça kıvrımlı ve sıkıca sıkıştırılmış, küçük, kavisli, uzun bir yapıdır. Düz bir çizgi halinde açıldığında, uzunluğunun yaklaşık 6 metre olduğu tahmin edilmektedir. Epididim, testisin arka sınırında bulunur ve baş (kaput), gövde (korpora) ve kuyruk (kauda) olmak üzere üç bölümden oluşur. Epididimin başı, testislerin üst kutbunda yer alır ve testis kanallarından gelen seminal sıvıyı alır. Daha sonra spermin epididimin distal kısmına geçmesine izin verir. Uzunluğu nedeniyle, epididim kanalları spermin depolanması ve olgunlaşması için geniş bir alana sahiptir (20).

2.1.1. Spermatogenez

Spermatogenez, ilkel germ hücrelerini döllenme yeteneğine sahip olgun spermatozoaya dönüştüren karmaşık ve titizlikle düzenlenmiş bir süreçtir (21).

Sıçanlarda 2 adet testis kabaca 3 gramdır. Ve 45 günden itibaren yetişkinlik boyunca ortalama günde 50-400 milyon sperm üretilebilir. Bu da göstermektedir ki spermatogenez oldukça karmaşık ve verimli bir yoldur (22).

2.2. İnfertilite

2.2.1. Tanım

İnfertilite, bir çiftin 12 aylık korunmasız cinsel ilişki denemelerinden sonra hamile kalamamasıdır. Erkek faktörlerinin infertilite vakalarının %30-50'sinde etkili olduğu tahmin edilmektedir. İnfertilite veya düşük doğurganlık, diğerlerinin yanı sıra testis fonksiyon bozukluğu, endokrinopatiler, yaşam tarzı faktörleri (tütün ve obezite gibi), konjenital anatomik faktörler, gonadotoksik maruziyetler ve yaşlanmadan kaynaklanabilir (23).

Erkek infertilitesinin çoğu nedeni tedavi edilebilir ve birçok tedavinin amacı doğal olarak gebe kalma yeteneğini geri kazanmaktır. Spermatogenez süreci insan üremesi için gereklidir (24).

2.2.2. İnsidans

İnfertilitenin dünya çapında 186 milyon insanı etkilediği tahmin edilmektedir. Erkek infertilitesi, tüm küresel çocuksuzluk vakalarının yarısından fazlasına katkıda bulunur (25).

Tüm çiftlerin ise %15'ini etkiler (26).

2.2.3. Erkekte İnfertilite Patolojisi

İnfertilite nedenleri kadınlarda veya erkeklerde, hatta bazen her ikisinde de bulunabilir. Kadın üreme fonksiyonu, üreme organlarının normal işlevini (genital etiyoloji), hastalıkları (ekstragenital etiyoloji) etkileyen doğuştan gelen veya edinilmiş durumlar veya psikolojik faktörler nedeniyle bozulabilir. Erkek infertilitesi için üç olası neden kategorisi vardır, yani obstrüktif olmayan etiyoloji (sorunun sperm üretimi olduğu), obstrüktif etiyoloji (sorunun spermin genital sistemden taşınması olduğu), koital infertilite ise ereksiyonu ve boşalmayı

engelleyen bozukluklardan kaynaklanır. Vakaların %10-15'inde infertilite etiyolojisi idiyopatik olarak tespit edilmektedir (27).

Her iki cinsiyetin doğurganlığını etkileyen faktörler hipogonadotrofik hipogonadizm, hiperprolaktinemi, siliyer fonksiyon bozuklukları, kistik fibroz, enfeksiyonlar, sistemik hastalıklar ve yaşam tarzı ile ilgili faktörler ve hastalıklardır. Erken yumurtalık yetmezliği, polikistik over sendromu, endometriozis, rahim fibroidleri ve endometrial polipler kadın infertilitesinde rol oynayabilir. Erkek infertilitesi testis ve testis sonrası eksikliklerden kaynaklanabilir. Yıllar boyunca gözlenen sperm azalması, endokrin sistemi bozucu kimyasallar ilgili olabilecek diğer faktörlerdir.

-Testis eksikliği (Testicular deficiency)

Testis disfonksiyonu, bozulmuş spermatogenezin en sık görülen nedenidir. Testis disfonksiyonu ayrıca doğuştan, edinsele veya idiyopatik testis yetmezliği olarak alt bölümlere ayrılabilir.

Edinsel testis yetmezliği travma, testis torsiyonu, orşit, eksojen faktörler (örneğin ilaçlar), endojen faktörler (örneğin, sistemik hastalıklar, varikosel) veya testis vasküler anatomisine zarar verebilecek ameliyattan kaynaklanabilir.

-Testis sonrası bozukluk

Testis sonrası bozukluk, boşalma disfonksiyonu veya sperm iletiminin tıkanmasından kaynaklanır. Obstrüksiyon epididim, vas deferens veya bulunabilir ve edinsele veya konjenital olabilir (28).

2.3. Siklofosfamid

Siklofosfamid, nitrojen mustard sınıfına ait bir alkilleyici ajan olarak sınıflandırılır. Bu ilaç doğrudan aktif formda olmayan bir ön ilaçtır ve terapötik etkilerini gösterebilmesi için metabolik aktivasyona ihtiyaç duyar (29).

Bu aktivasyon süreci esas olarak karaciğerde gerçekleşir ve sitokrom P450 enzim sistemi, özellikle CYP2B6, bu dönüşümde anahtar rol oynar.

Metabolik aktivasyon sonucunda siklofosfamid, 4-hidroksisiklofosfamid ve aldofosfamid gibi aktif metabolitlere dönüşür. Bu ara metabolitler daha sonra, ilacın başlıca sitotoksik ajanı olan fosforamid hardalına ve toksik yan etkilerinden, özellikle hemorajik sistitten büyük ölçüde sorumlu olan akroleine ayrışır (30).

Siklofosfamidin aktif metaboliti olan fosforamid hardalı, antineoplastik etkisini DNA' yı alkilleme yoluyla gösterir. Bu süreç, DNA'daki guanin bazlarının N7 pozisyonuna alkil gruplarının eklenmesini içerir, bu da DNA sarmalları arasında çapraz bağların oluşumuna yol açar (31). Bu DNA çapraz bağları, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu gibi hücresel süreçleri kritik şekilde bozar ve sonuç olarak hızla bölünen hücrelerde apoptozu (programlanmış hücre ölümü) tetikler (30).

Siklofosfamid, hücre döngüsünün belirli bir fazına özgü değildir, yani hücrelerin bölünme döngüsünün herhangi bir aşamasında etki edebilir.

Bu temel etki mekanizması, siklofosfamidin kemik iliği (miyelosüpresyona yol açan), saç folikülleri (alopesiye neden olan) ve testislerdeki sürekli bölünen germ hücreleri gibi diğer hızla çoğalan normal dokular üzerindeki önemli toksisitesini açıklar. Hücre döngüsü fazına özgü olmaması, spermatogenez gibi sürekli hücre bölünmesi ve farklılaşması içeren süreçler üzerindeki geniş sitotoksik etkisini daha da artırır. Bu durum, kemoterapinin doğasında bulunan bir zorluğu ortaya koyar: seçici toksisiteyi sağlarken, sağlıklı, proliferatif dokulara verilen ikincil hasarı en aza indirme ihtiyacı bulunmaktadır.

Siklofosfamid, onkolojide çeşitli malign lenfomaların (Ann Arbor evreleme sistemine göre evre III ve IV Hodgkin, Non-Hodgkin, lenfositik, küçük lenfositik, Burkitt), multipl miyelom, meme kanseri, yaygın nöroblastomlar, retinoblastoma, yumurtalık adenokarsinomları ve mikozis fungoides tedavisinde yaygın olarak kullanılır. (**Tablo 1**)

Antineoplastik uygulamalarının yanı sıra, siklofosfamid, sistemik lupus eritematozus (SLE), vaskülit, miyozit, sistemik skleroz, Sjögren sendromu ve nadiren romatoid artrit gibi şiddetli otoimmün hastalıklar (**Tablo 1**) için kritik bir immünosüpresif ajandır. Ayrıca, transplantasyon öncesinde transplant reddini ve graft-versus-host komplikasyonlarını önlemek amacıyla bir immünosüpresan olarak da reçete edilir (31).

Tablo 1: Siklofosfamidin Temel Özellikleri

Özellik/Kullanım Alanı	Açıklama
Kimyasal Sınıf	Nitrojen Mustard Alkilleyici Ajan
Etki Mekanizması	Ön ilaç olarak karaciğerde metabolik aktivasyon; aktif metabolitler (fosforamid hardalı) DNA'yı çapraz bağlar (guanin N7 pozisyonunda), replikasyon ve transkripsiyonu inhibe eder, apoptozu indükler. Hücre döngüsü fazına özgü değildir.
Başlıca Kanser Endikasyonları	Lenfomalar (Hodgkin, Non-Hodgkin), Multipl Miyelom, Meme Kanseri, Yumurtalık Kanseri, Nöroblastomlar, Retinoblastoma, Mikozis Fungoides, Ewing Sarkomu.
Otoimmün Hastalık Endikasyonları	Sistemik Lupus Eritematozus (SLE), Vaskülit, Miyozit, Sistemik Skleroz, Sjögren Sendromu, (nadiren) Romatoid Artrit, Nefrotik Sendrom (31)

2.3.1. Siklofosfamide Bağlı Erkek İnfertilitesi

Siklofosfamidin erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkileri, karmaşık patofizyolojik mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkar ve infertiliteye yol açan çeşitli klinik belirtilerle kendini gösterir.

2.3.1.1. Doğrudan Testis Toksisitesi

Siklofosfamid, erkek gonadal dokularında germ hücrelerine doğrudan hasar vererek sperm sayısında önemli bir azalmaya neden olur. Sitotoksik etkileri, germ hücrelerinin (spermatogonia ve spermatositler) proliferasyonunu engellemeyi ve germ hücre apoptozunu belirgin şekilde artırmayı içerir. Bu durum, PCNA ve PLZF ekspresyonunda azalma ile Bax ve TUNEL-pozitif hücrelerde artışla kanıtlanmıştır (32). Diferansiye spermatogonia (A1–A4 ve B spermatogonia) ve erken preleptoten hücreler, SF'ye karşı en hassas testis hücreleri olarak tanımlanmıştır (33). Yüksek kümülatif SF dozları (örn. 10

g/m2'yi aşan) spermatogenezin derinlemesine bozulmasına ve şiddetli germ hücre kaybına (**tablo 2**) yol açabilir (32).

Bu ilacın aktif olarak bölünen, diferansiye germ hücrelerine seçici toksisitesi, kök spermatogonya popülasyonunun bir kısmını korurken, spermatogenik duraklamanın ve ardından oligospermi veya azosperminin karakteristik paternini açıklar. Bu hücrelerin sürekli mitotik aktivitesi, onları hızla bölünen hücrelerde apoptozu indükleyen bir alkilleyici ajan için başlıca hedefler haline getirir (30). Hücresel hassasiyetin bu nüanslı anlayışı, infertilitenin şiddetini ve potansiyel geri dönüşümlülüğünü tahmin etmek için kritik öneme sahiptir.

Germ hücrelerinin ötesinde, SF testisteki somatik hücrelere, özellikle Leydig hücrelerine ve Sertoli hücrelerine de zarar verir. Testosteron üretiminden sorumlu olan Leydig hücrelerindeki hasar, doğrudan testosteron seviyelerinin düşmesine katkıda bulunur. SF ayrıca, gelişmekte olan germ hücrelerini bağışıklık sisteminden koruyan kritik bir immünolojik bariyer olan kan-testis bariyerinin bütünlüğünü de bozabilir (32).

Somatik destek hücrelerine verilen hasar, başlangıçtaki sitotoksik hasardan germ hücreleri sağ kalsa veya iyileşmeye başlasa bile, sağlıklı spermatogenez için gerekli olan temel mikroçevrenin ciddi şekilde bozulduğu anlamına gelir. Kan-testis bariyerinin bozulması özellikle önemlidir. Çünkü daha önce izole edilmiş germ hücre antijenlerini bağışıklık sistemine maruz bırakarak sperme karşı otoimmün yanıtları başlatabilir veya şiddetlendirebilir. Bu durum, SF'nin etkisinin doğrudan germ hücre öldürmenin ötesine geçerek tüm testis ekosisteminin sistemik bir bozulmasına yol açtığını göstermektedir.

2.3.1.2. Hormonal Aks Disregülasyonu

SF, erkek gonadal fonksiyonlarını düzenleyen hipotalamik-hipofiz-gonadal (HHG) aksının hassas dengesini bozar. Bu bozulma, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) üretim ve salgılanmasında değişiklikler olarak kendini gösterir ve sonuç olarak testosteron seviyelerinde azalmaya ve spermatogenezin bozulmasına yol açar. SF ayrıca, testosteron sentezinin azalmasına daha fazla katkıda bulunan 3-hidroksisteroid dehidrogenaz ve 17-hidroksisteroid dehidrogenaz gibi testiküler steroidojenik enzimlerin aktivitesini de azaltır.

Bu hormonal dengesizlik sadece testis hasarının bir belirtisi olmakla kalmaz, aynı zamanda bozulmuş spermatogenezi aktif olarak şiddetlendirir ve katkıda bulunur (32). Örneğin, kadınlarda kemoterapiye bağlı folikül tükenmesi, FSH'de artışa yol açar, bu da daha fazla folikül yıkımını hızlandırabilir (34). Bu mekanizma yumurtalık fonksiyonu için tanımlanmış olsa da hormonal geri bildirimin hasarı pekiştirme prensibi benzerdir. Leydig hücrelerine doğrudan verilen hasar, germ hücre gelişimi için kritik bir hormon olan testosteronu azaltır. Bu durum, HHG aksının daha geniş çaplı bozulmasıyla birleştiğinde, sağlıklı spermatogenez için gerekli olan hassas hormonal sinyalleri değiştirir. Böylece, doğrudan hücresel hasar ve sistemik hormonal disregülasyonun karşılıklı olarak erkek fertilitésinin bozulmasını pekiştirdiği bir "kısır döngü" oluşur ve bu da iyileşmeyi daha zorlu hale getirir.

Tablo 2: Siklofosfamid Testis Toksisitesi

Mekanizma	Açıklama
Hedef Hücreler/Yapılar	Germ Hücreleri (spermatogonia, spermatositler, spermatitler), Sertoli Hücreleri, Leydig Hücreleri, Kan-Testis Bariyeri, HPG Aksı (32)
Spermatogenez Üzerindeki Etki	Germ hücre proliferasyonunun inhibisyonu, artmış germ hücre apoptozu, olgunlaşma duraklaması (örn. pakiten spermatositler), sperm sayısında azalma (oligospermi/azospermi), bozulmuş sperm motilitesi/morfolojisi, spermde DNA hasarı (29)
Hormonal Etkiler	Testosteron seviyelerinde azalma, LH/FSH salgılanmasında değişiklik, testiküler steroidojenik enzim aktivitesinde azalma (32)
Temel Moleküler Mekanizmalar	DNA alkilasyonu ve çapraz bağlanması, apoptoz indüksiyonu, oksidatif stres, HPG aksının bozulması (30)
Risk Faktörleri (Doz/Süre/Yaş)	Kümülatif doz (>10 g/m ²), tedavi süresi (>90 gün), ileri yaş, pubertal sonrası durum (29)

2.3.2. Siklofosfamid Tedavisi Alan Erkek Hastalar İçin Fertilite Koruma Stratejileri

Siklofosfamid tedavisi gören erkek hastalar için fertilite koruma, tedavinin potansiyel infertilite etkilerini azaltmak amacıyla kritik öneme sahiptir.

Bu bağlamda, sperm kriyoprezervasyonu en yerleşik ve etkili yöntem olarak öne çıkarken, GnRH analogları gibi yardımcı stratejiler de araştırılmaktadır.

2.3.2.1. Sperm Kriyoprezervasyonu (Sperm Bankacılığı)

Sperm kriyoprezervasyonu, erkek hastalar için kadınlara sunulan seçeneklere kıyasla en yerleşik, genellikle daha kolay ve daha uygun maliyetli fertilitite koruma yöntemidir. Tedavinin DNA hasarına yol açan etkilerini önlemek amacıyla, herhangi bir kemoterapi veya pelvik radyoterapi başlamadan önce sperm bankacılığının yapılması zorunludur. Kriyoprezerve edilmiş sperm daha sonra çözülerek intrauterin inseminasyon (IUI) veya in vitro fertilizasyon (IVF) gibi yardımcı üreme teknolojilerinde kullanılabilir.

Kanser tanısı alan genç erkeklerde, hastalık, yakın zamanda uygulanan anestezi veya stres nedeniyle sperm kalitesi (örn. düşük sayı veya motilite) düşük olsa bile, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile IVF, az sayıda canlı spermle bile yüksek gebelik şansı sunabilir (35). Siklofosamid tedavisi sonrası erkek sterilitesi riskinin yüksek ve sıklıkla tedaviden sonra yıllarca devam edebilmesi, proaktif sperm kriyoprezervasyonuna olan kritik ihtiyacı güçlendirmektedir (36).

Bu durum, erken ve proaktif müdahalenin ve kapsamlı hasta danışmanlığının kritik önemini vurgulamaktadır. "Tedavi öncesi" zamanlama hayati öneme sahiptir, bu da fertilitite koruma tartışmalarının, tedavi planlamasının ayrılmaz bir parçası olması gerektiğini, sonradan akla gelen bir düşünce olmaması gerektiğini gösterir. Düşük kaliteli örneklerle bile yüksek etkinlik, bu seçeneğin, başlangıçtaki semen parametrelerinden bağımsız olarak, neredeyse tüm uygun erkek hastalara sunulması için güçlü bir gerekçe sağlar.

2.3.2.2. GnRH Analogları

Gonadotropin salgılatıcı hormon agonistleri (GnRHa), öncelikle siklofosamid tedavisi gören kadın hastalarda fertilitite koruma için yardımcı bir strateji olarak araştırılmıştır. Kadınlardaki önerilen mekanizma, kemoterapi sırasında hızlanmış folikül tükenmesini önleyebilecek FSH seviyelerini azaltmayı ve ilaca maruziyeti sınırlamak için yumurtalık kan akışını potansiyel olarak azaltmayı içerir. Sistemik lupus eritematozus (SLE) hastası kadınlarda

SF alan bazı çalışmalar, eş zamanlı GnRHa'nın yumurtalık fonksiyonunu koruma ve gebelik şansını artırma konusunda olumlu bir etki gösterdiğini belirtmiştir, ancak veriler sınırlı ve çelişkilidir. Erkek fare modellerinde, agonistik bir GnRH analogunun siklofosfamid kaynaklı gonadal hasara karşı bir miktar koruma sağladığı gözlemlenmiştir (34). Ancak, sağlanan araştırma materyalleri, erkeklerde GnRH analoglarının fertilite koruma etkinliğine dair kapsamlı insan klinik verileri sunmamaktadır.

2.3.2.3. Hasta Danışmanlığı ve Multidisipliner Bakımın Önemi

Hekimlerin, siklofosfamidin fertilite üzerindeki potansiyel olumsuz etkilerini proaktif olarak tartışması ve azaltması, önerilen doz limitlerine uyması ve mevcut fertilite koruma stratejilerini sunması kritik öneme sahiptir. Sperm bankacılığı gibi etkili yöntemlerin mevcut olmasına rağmen, sperm bankalarına ve fertilite uzmanlarına yönlendirme ve erişimde önemli engeller devam etmektedir (37).

Fertilite korumasının uygulanması, bilimsel mekanizmalar ve mevcut tekniklerin ötesinde önemli sistemik zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu, iyileştirilmiş hasta danışmanlığı, fertilite uzmanlarına erken ve rutin yönlendirme ve tüm uygun erkek hastaların bu kritik hizmetlere zamanında ve eşit erişimini sağlamak için onkologlar/romatologlar ve üreme tıbbı uzmanları arasında multidisipliner iş birliğinin artırılmasını gerektirir.

2.4. Abaloparatid

2.4.1. Abaloparatid'in Sentetik Bir PTHrP Analogu Olarak Genel Bakışı

Abaloparatid, insan paratiroid hormonu ile ilişkili proteinin (PTHrP) 34 amino asitlik sentetik bir peptit analogudur (PTHrP analoğu). Abaloparatidin kemik büyümesini ve kemik yoğunluğunu korumasını teşvik ettiği bilinmektedir (38).

Abaloparatidin doğrudan bir PTH analoğu yerine bir PTHrP analoğu olarak tasarlanması, moleküler düzeyde önemli bir tercih yansıtmaktadır. Bu seçim, ilacın anabolik etkilerini optimize ederken, sürekli PTH reseptör aktivasyonu ile ilişkili olabilecek istenmeyen katabolik veya hiperkalsemik etkileri en aza indirme potansiyeli taşımaktadır. Abaloparatid'in benzersiz

reseptör bağlanma profili, teriparatid gibi diğer PTH analoglarına kıyasla, PTH1 reseptörünün (PTH1R) dinlenme/G-protein kenetli konformasyonuna daha yüksek bir afinite göstermesiyle açıklanmaktadır (30).

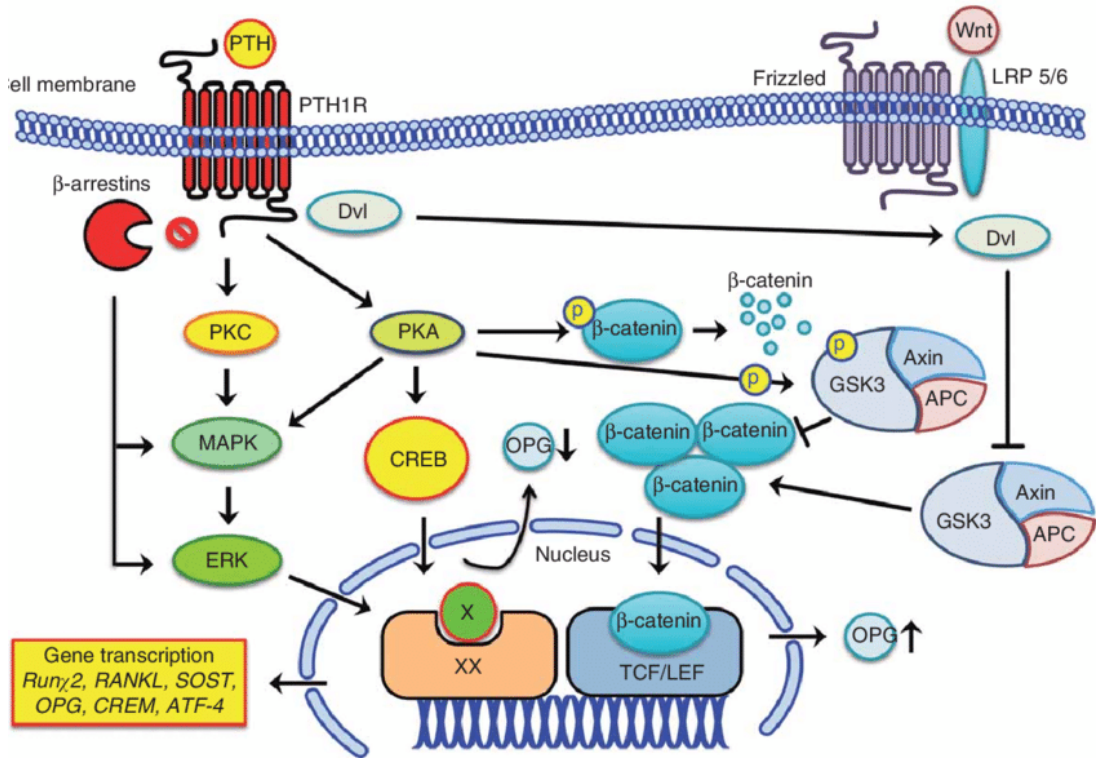
Bu bağlanma özelliği, kemik anabolizmasına yönelik daha rafine bir yaklaşımı işaret etmektedir, zira kemik oluşum yollarını tercihli olarak aktive ederken, diğer PTH analoglarında görülen geçici hiperkalsemi ve artan kemik rezorpsiyonunu hafifletme potansiyeli sunar (39).

2.4.2. Etki Mekanizması

2.4.2.1. PTH1R (G-protein Kenetli Reseptör) ile Detaylı Etkileşim

Abaloparatid, deri altı enjeksiyon yoluyla uygulandığında, osteoblastlar ve kemik stromal hücrelerinde eksprese edilen paratiroid hormon 1 (PTH1) reseptörünü (PTH1R) hedefler, ona bağlanır ve aktive eder.

PTH1R, G-protein kenetli bir reseptör (GPCR) olup, bu reseptörün aktivasyonu hücre içinde bir dizi sinyal yolunu başlatır (38).



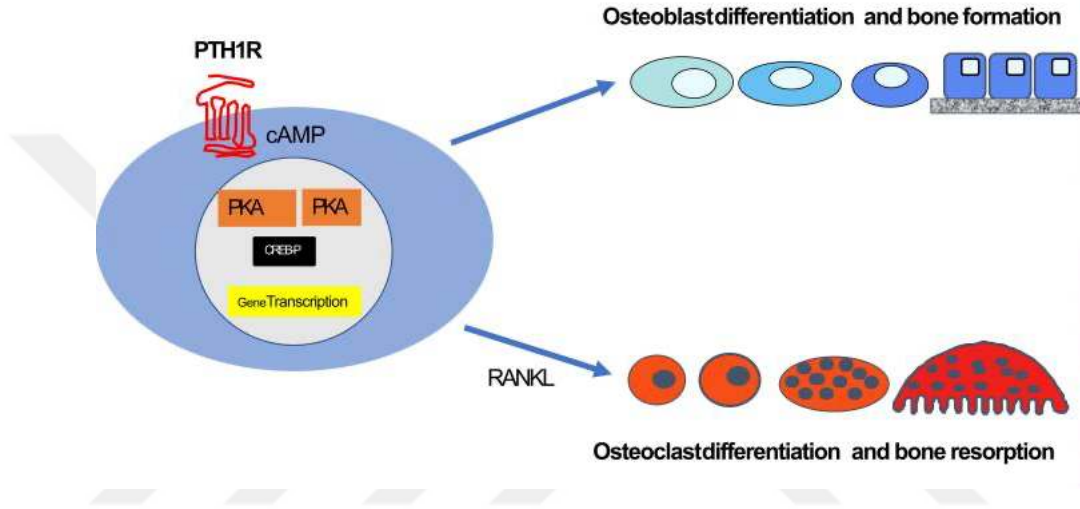
Şekil 1: PTH ile PKA ve CREB ilişkisi (40)

2.4.2.2. Hücre İçi Sinyal Yolları: cAMP ve PKA Aktivasyonu

Abaloparatid'in PTH1R'ye bağlanması, hücre içi sinyal yollarının bir kaskadını başlatır (30).

Özellikle, siklik AMP (cAMP) sinyal yolunu (**Şekil 2**) aktive eder, bu da osteoblastlar içindeki cAMP seviyelerinde bir artışa yol açar (38).

Artan cAMP seviyeleri ise protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder. PKA'nın aktivasyonu, osteoblast farklılaşması ve aktivitesi için kritik olan çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve proteinlerin fosforilasyonuna neden olur (30).



Şekil 2: PTH1R ile Osteoklast ve Osteoblast (41)

Bu detaylı yol (PTH1R>cAMP>PKA>transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu), abaloparatid'in anabolik etkisi için açık bir moleküler yol haritası sunar. Bu, bir GPCR sinyalizasyonunun temel bir prensibidir ve buradaki uygulaması, kemik oluşumundaki aşağı yönlü hücrel değişiklikleri açıklamaktadır. Sinyalizasyonun bu katmanlı yapısı, reseptörden gelen sinyalin nasıl yükseltildiğini ve kemik oluşumunu teşvik eden hücrel yanıtlara nasıl dönüştürüldüğünü göstermektedir.

PTH1R, Gs proteini aracılığıyla cAMP/PKA yolunu aktive ederek kemik oluşumunu teşvik eden osteoblastların sayısını ve aktivitesini artırır. Ancak, aynı zamanda Gq proteinini aktive ederek hücre içi kalsiyum seviyelerini de etkileyebilir. Bu makale, PTH1R'nin kemik hücreleri üzerindeki yapıcı (anabolik) veya yıkıcı (katabolik) etkilerinin, aktive olan sinyal yollarının

dinamik dengesine bağılı olduğunu ve bu durumun transkripsiyon faktörleri gibi moleküler düzeydeki etkileşimlerle belirlendiğini göstermektedir (41).

2.4.3. Terapötik Uygulamalar ve Klinik Etkinlik

Onaylı Endikasyonlar:

- Postmenopozal Osteoporoz,
- Yüksek Kırık Riski Taşıyan Erkek Osteoporozu

ABL, postmenopozal kadınlarda yüksek kırık riski taşıyan osteoporozun (osteoporotik kırık öyküsü veya çoklu kırık risk faktörleri olan veya diğer mevcut osteoporoz tedavilerine yanıt vermeyen/tolerans göstermeyen hastalar olarak tanımlanır) tedavisi için FDA onaylıdır. Ayrıca, yüksek kırık riski taşıyan (osteoporotik kırık öyküsü, çoklu risk faktörleri veya diğer tedavilere yanıt vermeyen/tolerans göstermeyen hastalar) erkeklerde kemik yoğunluğunu artırmak için de onaylanmıştır (42).

2.4.4. Endikasyon Dışı ve Gelişmekte Olan Kullanımların Keşfi

Abaloparatid, metabolik sendromlu hastalarda semptomatik psödoartroz için endikasyon dışı kullanılmaktadır. Ayrıca, epididimit ve orşit tedavisinde de kullanılabilir. Abaloparatid, ovariectomi, orşiektomi ve uzun süreli glukokortikoid kullanımından kaynaklanan kemik kaybını önlerken, kırık iyileşmesine de yardımcı olmaktadır. Glukokortikoid kaynaklı osteoporoz için, Amerikan Romatoloji Koleji, çok yüksek kırık riski taşıyan hastalarda PTH/PTHrP analoglarını (abaloparatid gibi) anti-rezorptif ilaçlara göre önceliklendirmeyi koşullu olarak önermektedir. Endikasyon dışı ve gelişmekte olan kullanımların çeşitliliği, PTH1R agonizminin birincil osteoporozun ötesindeki daha geniş potansiyeline işaret etmektedir. Psödoartroz veya glukokortikoid kaynaklı kemik kaybı gibi durumlardaki uygulaması, kemik oluşumunun tehlikeye girdiği çeşitli klinik senaryolarda kemik anabolik ajanı olarak çok yönlülüğünü vurgulamaktadır (42).

2.4.5. Önerilen Dozaj ve Uygulama Yolu

Önerilen dozaj, günde bir kez 80 mcg deri altı enjeksiyon şeklinde uygulanmasıdır (43).

Genellikle her gün aynı saatte uygulanması tavsiye edilir. Enjeksiyon, göbek deliği çevresindeki 2 inçlik alandan kaçınılarak alt karın bölgesine yapılmalı ve enjeksiyon bölgeleri her gün değiştirilmelidir (44).

Tedavinin maksimum önerilen süresi 24 aydır. Günlük deri altı uygulama ve süre sınırlaması, özellikle hayvan çalışmalarında belirlenen osteosarkom riski göz önüne alındığında, etkinliği optimize etmek ve güvenliği yönetmek için kritik öneme sahiptir (45).

Bu durum, hasta uyumu ve dikkatli klinik denetimin önemini vurgulamaktadır. Terapötik pencere, kesin dozaj ve süreye bağlıdır, bu da dikkatli hasta eğitimi ve uyumunu gerektirmektedir.

2.4.6. Yan Etkiler

Sık görülen yan etkiler arasında enjeksiyon bölgesi reaksiyonları (eritem, şişlik, ağrı, morarma), bulantı, baş dönmesi, baş ağrısı, çarpıntı, ortostatik hipotansiyon, yorgunluk, üst karın ağrısı, ishal, karın şişkinliği ve kemik ağrısı yer almaktadır (45).

Yan etkileri ortostatik hipotansiyon, hiperkalsemi, bulantı, kusma, kabızlık, uyuşukluk, kas güçsüzlüğüdür.

Özellikle hiperkalsemi ve dolaylı etkileri kontrol edilmelidir (46).

2.4.7. Ciddi Uyarılar ve Kontrendikasyonlar

2.4.7.1. Osteosarkom Riski

Abaloparatid, erkek ve dişi sıçanlarda insan maruziyetinin 4-28 katı sistemik maruziyetlerde osteosarkom (malign kemik tümörü) insidansında doza bağımlı bir artışa neden olmuştur (47). İnsanlarda bu riskin net bir kanıtı olmamasına rağmen, bu potansiyel dikkatli olmayı gerektirmekte ve tedavi süresini 24 ay ile sınırlamaktadır (45).

Paget kemik hastalığı, açıklanamayan alkalen fosfataz yükselmeleri, açık epifizler, kemik metastazları veya iskelet maligniteleri, osteosarkoma yatkınlık yaratan kalıtsal bozukluklar veya daha önce kemiğe dış ışın veya implant radyasyonu almış hastalarda kontrendikedir (43).

Hayvan verilerine dayansa da insanlarda net bir korelasyon olmamasına rağmen osteosarkom klinik uygulamayı derinden etkilemekte ve sıkı tedavi süresi sınırlamaları ile kontrendikasyonları zorunlu kılmaktadır.

Osteosarkomun ciddiyeti, insan riski teorik olsa bile, son derece korumacı bir reçeteleme modelini zorunlu kılmaktadır.

2.4.7.2. Hiperkalsemi

Abaloparatid hiperkalsemiye (yüksek kan kalsiyumu) neden olabilir. Önceden var olan hiperkalsemi veya altta yatan hiperkalsemik bozuklukları (örn. primer hiperparatiroidizm) olan hastalarda, hiperkalsemiyi şiddetlendirme olasılığı nedeniyle önerilmemektedir. Kalsiyum seviyelerinin düzenli olarak izlenmesi tavsiye edilir. Hiperkalsemi riski, ilacın PTH1R agonizmi ile doğrudan bağlantılıdır. Önceden var olan hiperkalsemik durumlar için dikkatli tarama çok önemlidir, zira ilacın mekanizması bunları şiddetlendirebilir ve terapötik bir etkiyi zararlı bir etkiye dönüştürebilir. Bu, ilacın kalsiyum homeostazisi üzerindeki etkisine bağlı olarak öngörülebilir bir yan etkidir (45,46).

2.4.7.3. Hiperkalsiüri ve Ürolitiazis

İlaç hiperkalsiüriye (yüksek idrar kalsiyumu) neden olabilir (47).

Aktif veya ürolitiazis öyküsü olan hastalarda ürolitiazisi şiddetlendirip şiddetlendirmedeği bilinmemektedir; şüpheleniliyorsa idrar kalsiyum atılımının ölçülmesi düşünülmelidir. Kalsiyum metabolizmasındaki değişikliklerin bir aşağı yönlü etkisi olan hiperkalsiüri potansiyeli, böbrek taşı riski için dikkatli olmayı gerektirmektedir. Bu durum, güvenlik değerlendirmelerini kan kimyasının ötesine, böbrek sağlığının kontrolünü de gerektirmektedir. Artan kan kalsiyumu (hiperkalsemi), idrarda artan kalsiyum atılımına (hiperkalsiüri) yol açabilir, bu da böbrek taşı oluşumu (ürolitiazis) riskini artırır. Bu, ilacın kalsiyum işlenmesi üzerindeki sistemik etkisini ve ürolitiazis ile doğrudan nedensel bağlantı tam olarak kurulmamış olsa bile, böbrek risk faktörlerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi ihtiyacını vurgulamaktadır (46).

2.4.8. Özel Popülasyonlar ve Hususlar

Abaloparatid gebelik veya emzirme döneminde önerilmemektedir. Sadece menopoza geçmiş ve hamile kalamayan veya emziremeyen kadınlar tarafından kullanılmalıdır (44).

2.4.9. Gelecek Yönelimler

Hayvan çalışmalarında osteosarkom riski gösterilmiş olmasına rağmen, insanlarda net bir kanıt bulunmaması, bu riskin gerçek dünya koşullarında kesin olarak değerlendirilmesi için uzun vadeli takiplerin devam etmesini gerektirmektedir (45).

Ayrıca, epididimit ve orşit gibi endikasyon dışı kullanımlarının arkasındaki kesin mekanizmaların aydınlatılması, etkilerinin kemik anabolizmasının ötesine geçip geçmediğini anlamak için daha fazla araştırmayı gerektirebilir (42).

2.5. CREB

2.5.1. CREB Yaygın Bir Transkripsiyon Faktörüdür

Yaygın olarak bulunan bir nükleer transkripsiyon faktörü olan CREB (cAMP responsive element-binding protein) karmaşık ve çok yönlü düzenlenir. Hücresel yanıtların düzenlenmesinde merkezi bir rolü bulunur. CREB, strese neden olan faktörler, hormonlar, nörotransmitterler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli dış etkenlerle aktive olabilir veya bu etkenlerden bağımsız olarak sürekli aktif kalabilir. CREB'in aşağıdaki gibi çeşitli biyolojik süreçlerdeki işlevlerde rol oynar;

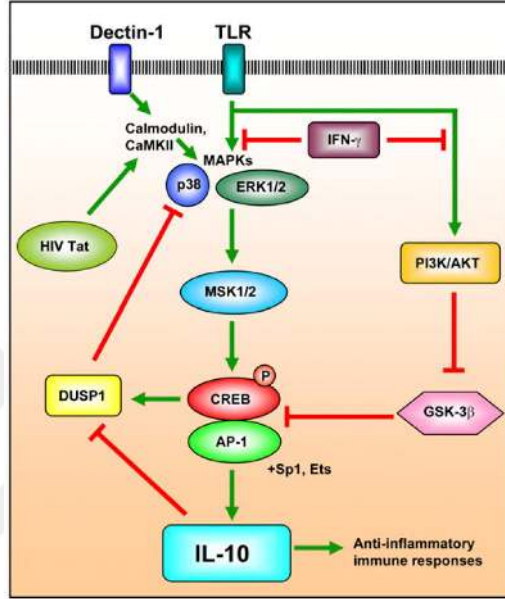
- a. Hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması, sağkalımı ve apoptoz (programlanmış hücre ölümü)
- b. Öğrenme, hafıza, stres tepkisi ve bağımlılık gibi nörolojik işlevler
- c. Bağışıklık düzenlemesi ve metabolik yollar (48)

CREB, en iyi anlaşılan fosforilasyona bağlı transkripsiyon faktörlerinden biridir. cAMP bağımlı protein kinaz A, protein kinaz C, hücre dışı ortamdan veya hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum akışlarına yanıt veren kalmodulin kinazlar ve pp90 ribozomal S6 kinaz (pp90 RSK; RSK2 olarak da bilinir) dahil olmak üzere birkaç farklı serin-treonin kinazın CREB'nin transkripsiyon aktive etme bölgesinde, serin 133'te fosforilasyonunu desteklediği gösterilmiştir.

CREB'nin serin 133'ü fosforile edildikten sonra, CREB, CREB'e duyarlı genlerin transkripsiyonunu başlatmak için koaktivatör proteini, CREB bağlayıcı protein (CBP) veya p300 ile etkileşime girer. CBP, diğer birçok transkripsiyon faktörü için bir kofaktördür ve kromatini histon asetilasyonu yoluyla modüle

ederek ve RNA polimerizasyonu için gerekli olan faktörleri işe alarak transkripsiyonu uyarmaya yardımcı olur.

CREB'nin hücre proliferasyonu, hayatta kalma, farklılaşma, adaptif yanıtlar, glikoz homeostazı, spermatogenez, sirkadiyen ritimler ve hafıza ile ilişkili sinaptik plastisite dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir.



Şekil 3: CREB ve Anti-inflamasyon (49)

Ayrıca CREB İL-10 üzerinden antiinflamatuvar özellik de gösterir. (**Şekil 3**) Bu da hayatta kalmayı arttıran fonksiyonlarından biri olarak saptanmıştır (49).

2.5.2. Hücresel Yolaklara Etkisi

CREB, cAMP/PKA yoluyla Ser133 üzerinden fosforillenerek hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (50)

CREB, PI3K/Akt yolları üzerinden Akt tarafından fosforillenerek Bcl-2 gibi hücre yaşamını destekleyen genlerin ekspresyonunu artırır (51).

Endoplazmik retikulum stresinde, CREB aktivitesi artar ve ATM, ATR, RAD51 gibi DNA hasar yanıt genlerinin ekspresyonunu düzenler (Bolland et al., 2021).

ERK ve p38 MAPK sinyal yolları CREB'i aktive ederek spermatogenez sırasında testis gelişimine katkı sağlar (53).

CREB, hücresel stres ve DNA hasarı durumlarında DNA hasar yanıt yollarını destekleyerek hücre proliferasyonu ve hayatta kalma süreçlerinde görev alır (52).

2.5.3. Erkek Üreme Sistemi ile İlişkisi

CREB ve CREM, FSH/LH hormonlarının dalgalanmaları sırasında spermatogenez evrelerinde dinamik ekspresyon gösteren transkripsiyon faktörleridir (54).

CREB, alternatif ekzon kullanımına bağlı olarak çeşitli izoformlar üretir ve bu izoformlar erken spermatogenezden post-meiotic olgun spermatidlere kadar gen ekspresyonunu düzenler (50).

CFTR eksikliği olan farelerde testis ağırlığı ve sperm sayısı azalmıştır; bu durum CREB ekspresyonunun düşmesiyle ilişkilidir (55).

Testislerdeki hormonal sinyalleri gen ifadesine dönüştüren ve spermatogenezde kritik rol oynayan CREB ve CREM transkripsiyon faktörlerinin oldukça önemli olduğu bilinmektedir.

Daha önceki çalışmalarda sperm sağlığı için gerekli selenyumun eksikliği veya fazla olması durumunda CREB ve CREM'in mRNA ve protein ekspresyonunda önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. Bu durum, serum testosteron, LH ve FSH seviyelerindeki düşüşlerle ve testis dokusunda oluşan yapısal bozukluklarla ilişkilendirilmiştir.

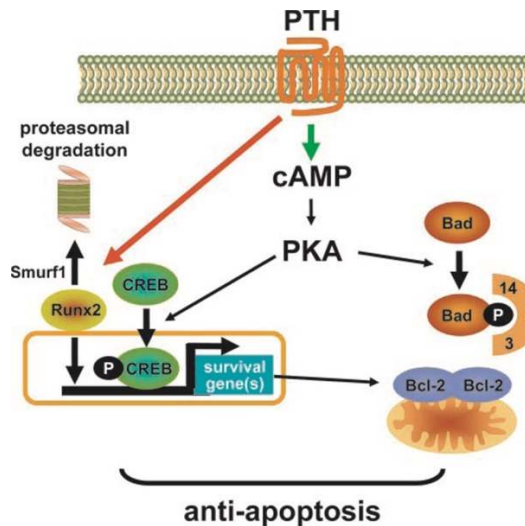
Spermatogenezin gelişimsel olarak düzenlenmiş bir program olduğunu ve bu sürecin, hücre sağkalımı ile apoptozu kontrol eden çeşitli sinyal yollarını modüle eden karmaşık bir hormonal devre tarafından yönetildiğini ortaya koymaktadır. CREB ve CREM gibi önemli transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonunu bozulması durumunda ise spermatogenezi olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır (50).

Başka bir araştırma makalesi, Kistik Fibrozis Transmembran İletkenlik Düzenleyicisi (CFTR) adlı bir proteinin CREB aktivasyonunu nasıl etkilediğini ve bunun spermatogenez üzerindeki sonuçlarını incelemiştir. CFTR proteinindeki genetik mutasyonlar, kistik fibrozis hastalığına yol açar ve bu hastaların büyük çoğunluğunda infertilite görülür.

CFTR'deki bir kusurun, testislerdeki destekleyici hücreler olan Sertoli hücrelerinde cAMP-CREB sinyal yolunu bozduğunu göstermektedir. Bu bozulma, folikül uyarıcı hormon (FSH) gibi hormonal sinyallerin CREB'i aktive etmesini engeller. Sonuç olarak, CREB aktivasyonunun azalması, germ hücrelerinin gelişimini olumsuz etkiler.

Fareler üzerinde yapılan deneylerde, CREB ekspresyonu azaldığında testis ağırlığının ve sperm sayısının önemli ölçüde düştüğü, bunun da azospermi ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, CFTR'ye bağlı CREB aktivasyonunun spermatogenez için hayati önem taşıdığını ve bu sinyal yolundaki aksaklıkların erkek infertiliteye yol açan temel nedenlerden biri olabileceğini ortaya koymaktadır (55).

cAMP sinyal yolunun sperm hareketliliği için vazgeçilmez olduğunu belirtmektedir. cAMP 'nin aktivasyonu, Protein Kinaz A (PKA) adı verilen bir enzimi harekete geçirir. (**Şekil 4**) PKA ise, daha sonra CREB dahil olmak üzere birçok hedef proteini fosforile ederek aktive eder. Spermde bu sinyal yolunun temel bileşenlerinin (adenilil siklaz veya PKA gibi) ortadan kaldırılmasının, sperm hareketliliğinde bozulmaya ve dolayısıyla infertiliteye yol açtığını göstermektedir. Bu, CREB'in yer aldığı cAMP sinyal yolunun, sperm hareketliliğini düzenleyen ana mekanizmalardan biri olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir (56).



Şekil 4: PTH ve CREB ile Antiapoptoz Etki (57)

2.6. PCNA

2.6.1. Moleküler Yapı ve İşlevi

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), ökaryotik hücrelerde DNA replikasyonu ve onarımında kritik bir rol oynayan temel bir proteindir. Yapısal olarak PCNA çift sarmallı DNA'yı saran halka şeklinde bir homotrimer oluşturur. Bu benzersiz halka yapısı, PCNA'nın DNA molekülü boyunca serbestçe kaymasını sağlar. Bu kayma yeteneği, DNA polimerazlarına yüksek prosesivite kazandırmasının mekanik temelini oluşturur; yani, polimerazların DNA kalıbından ayrılmadan binlerce nükleotidi sentezlemesine olanak tanır. Bu işlev, genomun verimli ve doğru bir şekilde kopyalanması için hayati öneme sahiptir.

PCNA halkası yaklaşık 30 Å genişliğindedir ve hem ön hem de arka yüzlere sahiptir. Ayrıca, farklı protein ortaklarını aynı anda bağlamak için kritik olan üç özdeş hidrofobik cebe sahiptir (58).

2.6.2. DNA Replikasyonu, Onarımı, Rekombinasyonundaki Rolü

PCNA 'nın S-fazında DNA replikasyonundaki iyi bilinen rolünün ötesinde, DNA metabolizmasında "küresel bir merkez" olarak işlev görür. **(Şekil 5)** Bu, DNA ile ilişkili çeşitli süreçlerde yer alan geniş bir protein ağıyla etkileşim kurduğu anlamına gelir. PCNA, DNA onarımı ve rekombinasyonu için çok sayıda enzimi toplayan mobil bir platform görevi görür (58,59).

UV ışınlarının neden olduğu DNA hasarından sonra PCNA 'nın hasarlı bölgelerde daha uzun süre kaldığını ve bu durumun, onarımın gerçekleşmesi için gerekli olduğunu göstermektedir. PCNA'nın hasarlı bölgelere ilk alımının, nükleotit kesip çıkarma onarımı (NER) yoluna bağlı olduğu belirtilmektedir. Bu, PCNA 'nın DNA hasarını tespit etme ve ilgili onarım mekanizmalarını çağırma süreçlerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (60).

2.6.3. PCNA'nın Erkek Üreme Sistemindeki ve Spermatogenezdeki Rolü

2.6.3.1. Gelişim Sırasında Spermatogonia ve Sertoli Hücrelerinde PCNA Ekspresyon Kalıpları

Spermatogenez, progenitor erkek germ hücrelerinin haploid spermatozoaya farklılaştığı son derece karmaşık ve sıkı bir şekilde düzenlenen bir gelişim programıdır (61).

PCNA, testiküler gelişim boyunca dinamik ekspresyon kalıpları sergiler. Pre-pubertal dönemde (örneğin sıçanlarda doğum sonrası 9. günde) mitotik olarak çoğalan spermatogonia (Spga) ve Sertoli hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilir. Bu durum, germ hücre popülasyonunun oluşumu için gerekli olan önemli hücresel proliferasyona işaret etmektedir.

Germ hücre popülasyonu farklılaşmış spermatositlere doğru kaydıkça ve Sertoli hücreleri olgunlaştıkça, PCNA boyanması daha sonraki gelişim evrelerinde (örneğin 22. günde) azalır. Bu durum, mitoz sıklığının düşmesiyle tutarlıdır (62).

PCNA ekspresyonunun hassas zamansal düzenlemesi, germ hücre gelişimindeki temel, aşamaya özgü rolünü vurgular. Erken proliferasyon sırasında yüksek seviyeler ve farklılaşma ilerledikçe azalma, PCNA'nın spermatogenezdeki çok yönlü önemini daha da vurgular.

Bu, PCNA'nın işlevindeki herhangi bir bozulmanın ister doğrudan inhibisyon ister otoimmün saldırı yoluyla olsun, spermatogenezi birden fazla kritik noktada bozabileceği ve erkek infertilitesine yol açabileceği anlamına gelir. Bu dinamik ekspresyon kalıbı, PCNA'nın sadece genel bir hücre bölünmesi belirteci olmadığını, aynı zamanda spermatogenez boyunca hassas bir şekilde düzenlenmiş bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

2.6.3.2. Germ Hücresi Proliferasyonu, Farklılaşması ve Mayoz Rekombinasyonundaki Katılımı

PCNA, mitotik olarak çoğalan spermatogoniada tespit edilir ve bu hücrelerin çoğalmasındaki rolünü yansıtır. Mitozun ötesinde, PCNA aynı zamanda mayoz profazının sonraki aşamalarında, özellikle zigoten ve pakiten spermatositlerde de gözlenir. Bu aşamalarda, hücreler mayoz rekombinasyonuna uğrar ve PCNA'nın varlığı, bu karmaşık süreç sırasında DNA eksizyon onarımında kritik bir işlevi olduğunu düşündürmektedir, bu da genetik doğruluğu sağlar (63).

PCNA'nın merkezi olduğu DNA onarım mekanizmalarındaki kusurların, spermatogenez durmasına ve anormal rekombinasyona neden olduğu, nihayetinde erkek infertilitesine yol açtığı bilinmektedir (64).

PCNA'nın mayoz profazı sırasında "DNA eksizyon onarımındaki" rolünün açıkça belirtilmesi, germ hattı hücrelerinde genetik bütünlüğe katkısını vurgular (63).

Onarım mekanizmalarındaki kusurların spermatogenez durmasına ve anormal rekombinasyona yol açarak nihayetinde erkek infertilitesine neden olduğu" göz önüne alındığında, PCNA 'nın doğru işlevi, sağlıklı, genetik olarak sağlam sperm üretimiyle doğrudan bağlantılıdır. Bu, PCNA 'nın moleküler rolü ile erkek fertilité sonuçları arasında güçlü bir mekanik bağlantı kurar. Bu kanıt zinciri, PCNA 'nın spermatogenezin hem niceliksel (proliferasyon) hem de niteliksel (mayoz sırasında genetik bütünlük) yönleri için vazgeçilmez olduğunu ortaya koymaktadır (64).

2.6.3.4. Testiküler Hücrelerde DNA Bütünlüğü ve Apoptoza Katkısı

Spermin genomik bütünlüğü ve stabilitesi, başarılı üreme için hayati öneme sahiptir ve PCNA'nın merkezi bir rol oynadığı sağlam DNA onarım mekanizmalarıyla korunur (64). Erkek infertilitesine katkıda bulunan iyi bilinen bir faktör olan oksidatif stres, erkek germ hattındaki epigenetik modifikasyonları önemli ölçüde bozabilir ve genomik bütünlüğü tehlikeye atabilir (65). Özellikle, PCNA'nın kendisi oksidatif strese yanıt olarak ADP-ribozilasyona uğrar, bu da bu zararlı yolla doğrudan bir moleküler etkileşimi gösterir (58).

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, testis içinde kritik bir fizyolojik süreçtir. Kusurlu sperm hücrelerini uzaklaştırmaya ve sperm popülasyonunun genel kalitesini korumaya hizmet ederek bir kalite kontrol mekanizması görevi görür (66). Çalışmalar, azalmış PCNA seviyelerinin, azalmış hücre proliferasyonu ve dolayısıyla spermatogenik hücrelerde artan apoptoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu durum, PCNA'nın germ hücre sağkalımını teşvik etmedeki ve spermatogenik verimliliği sürdürmedeki önemini vurgulamaktadır (67).

Bu bozulma, DNA bütünlüğünün tehlikeye girmesine ve germ hücre apoptozunun artmasına yol açar; her ikisi de erkek infertilitesinin doğrudan nedenleridir. Bu durum, dış faktörlerin PCNA ile ilgili sorunları nasıl şiddetlendirebileceğini ve potansiyel olarak PCNA'yı erkek infertilitesi

bağlamında otoimmün yanıtlar için bir hedef haline getirebileceğini gösteren bir yolu ima eder.

2.6.3.5. Anti-PCNA Erkek İnfertilitesi İlişkisi

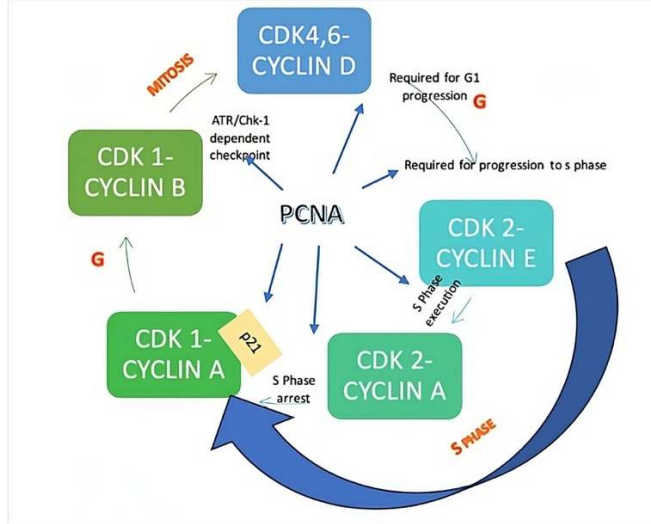
Erkek infertilitesi ile otoantikörler arasındaki genel bağlantı, özellikle antisperm antikörleri (ASA'lar) bağlamında iyi belgelenmiştir (68). ASA'lar, sperm antijenlerine karşı oluşan ve sperm hareketliliğini, aglütinasyonunu ve yumurta ile etkileşimini bozarak infertiliteye yol açabilen antikörlerdir (69).

Bununla birlikte, PCNA'nın spermatogenezdeki kritik rolü göz önüne alındığında, anti-PCNA antikörlerinin varlığı potansiyel dolaylı mekanizmalar aracılığıyla erkek fertilitasını etkileyebilir. PCNA, germ hücre proliferasyonu, mayoz rekombinasyonu sırasında DNA onarımı ve apoptoz kontrolü gibi süreçlerde temel bir rol oynar (64).

Bu nedenle, anti-PCNA antikörlerinin PCNA işlevini bozması teorik olarak spermatogenez olumsuz etkileyebilir. Örneğin, antikörlerin PCNA'nın DNA'ya bağlanmasını veya diğer proteinlerle etkileşimlerini engellemesi, DNA hasarına, anormal hücre döngüsü ilerlemesine veya spermatogenik hücrelerde artan apoptoza yol açabilir. Bu tür hücresel bozukluklar, sperm üretiminin kalitesini ve miktarını doğrudan etkileyerek infertiliteye katkıda bulunabilir.

Otoimmünite ve erkek infertilitesi arasındaki genel bağlantı, antisperm antikörlerinin yanı sıra, testiküler dokuya karşı immün yanıtların da rol oynayabileceğini düşündürmektedir (68). SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonrası otoimmün yanıtların spermatogenez ile ilgili antijenlere karşı çapraz reaktivite potansiyeli, otoimmünitenin erkek fertilitesi üzerindeki etkileri için bir model sunmaktadır. Bu, immün sistemin üreme sisteminin kendi bileşenlerine karşı yanıt verebileceği ve bunun fertilité sonuçlarını etkileyebileceği bir mekanizmanın varlığını destekler (70).

Anti-PCNA otoantikörleri ile erkek infertilitesi arasında doğrudan bir bağlantı olmamasına rağmen, PCNA'nın spermatogenezdeki temel rolü göz önüne alındığında, bu antikörlerin varlığı potansiyel bir patojenik mekanizma sunar.



Şekil 5: PCNA ve Hücre Siklusu (71)

2.7. HSPA4

2.7.1. HSPA4 Çok Fonksiyonlu Bir Şaperon

Hücresel protein katlanması ve kalitesi, yaşamın temel süreçleri için hayati öneme sahiptir. Bu süreçlerde görev alan proteinler arasında, ısı şoku proteinleri (HSP'ler) olarak bilinen moleküler şaperonlar kritik bir rol oynar. HSPA4, başlangıçta Hsp70 ailesinin bir üyesi olarak düşünülse de fare Apg-2 proteinine eşdeğer ve Hsp110 ailesinin bir üyesi olduğu artık bilinmektedir. HSPA4'ün diğer bilinen adları arasında Apg-2, HEL-S-5a, HS24/P52, HSPH2 ve hsp70RY bulunmaktadır. HSPA4L ise HSPA4'ün bir paralogu olup, aynı zamanda Hsp110 ailesine aittir (72).

Hsp110 ailesinin üyeleri, HSPA4 ve HSPA4L dahil olmak üzere, ATP hidroliz döngüsü sırasında Hsp70 şaperonları için nükleotit değişim faktörleri olarak işlev görürler (18).

Bu, HSPA4'ün protein kalitesi kontrolüne basit bir şaperon olmaktan öte, Hsp70'lerin aktivitesini düzenleyerek daha derin bir mekanik düzeyde katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu özel rol, HSPA4'ün protein katlanması ve stres yanıtındaki işlevini daha spesifik bir şekilde tanımlamaktadır.

2.7.2. Temel Hücresel Roller: Protein Katlanması, Stres Yanıtı ve Protein Kalitesi Kontrolü

HSPA4, moleküler bir şaperon olarak, protein katlanmasına yardımcı olur ve katlanmamış polipeptit zincirlerinin agregasyonunu önler (73). Protein oligomerlerini ayrıştırabilir ve protein taşınmasında görev alır (74). Hücre içinde protein homeostazı ve kalite kontrolünün sürdürülmesi için hayati öneme sahiptir (75).

HSPA4, ısı şoku ve ozmotik dengesizlik gibi çeşitli hücresel stres biçimleri tarafından indüklenir (72). Termal ve oksidatif stresten sonra hücrelerin iyileşmesine yardımcı olur (76).

Bir "holdase" şaperonu olarak, katlanma ara ürünlerini bağlayarak agregasyonlarını engeller (75).

Bu temel işlevleri, HSPA4'ü hücresel sağlığın kritik bir düzenleyicisi haline getirmektedir. HSPA4'ün işlevindeki bozukluklar erkek infertilitesi ve kanser gibi çeşitli hastalık bağlamlarında önemli etkilere yol açabilir.

2.7.3. Düzenleme ve İfade Kalıpları

HSPA4, kalp, karaciğer ve beyin dahil olmak üzere çeşitli insan dokularında yaygın olarak ifade edilir (77). Sitoplazma ve çekirdek içinde işlev görür (78).

Embriyonik ve dokuya özgü kök hücrelerde yüksek oranda ifade edilirken, farklılaşmış karışımlarında ifadesi azalır (18). HSPA4 gen promotörü, AP-1, ATF-2, c-Jun, C/EBPbeta, CREB ve deltaCREB gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri içerir (72).

Bu geniş ifade ve transkripsiyonel düzenleme, HSPA4'ün hücresel süreçlerdeki merkezi rolünü desteklemektedir.

2.7.4. HSPA4'ün Erkek Üreme Sağlığındaki Kritik Rolü

2.7.4.1. Testis ve Spermatogenik Hücrelerde İfade ve Lokalizasyon

HSPA4L, insan testislerinde yüksek oranda ifade edilir ve özellikle testiküler spermatositlerde ve yuvarlak spermatitlerde yoğun bir lokalizasyona sahiptir (79).

HSPA4, prenatal ve postnatal gonad gelişimi sırasında hem somatik hem de germ hücrelerinde ifade edilir; ancak prenatal gonadların germ hücrelerinde anlamlı derecede daha yüksek bir ifade gözlenir (18).

Farelerde yapılan çalışmalarda, Hspa4l'nin geç pakiten spermatositlerden postmeiyotik spermatitlere kadar spermatogenik hücrelerde yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür (80). Postnatal 20. günden sonra testislerdeki seviyeleri önemli ölçüde artar, bu da haploid spermatitlerde artan ifadeye işaret eder (18). İmmünohistokimya, 25 ve 60 günlük farelerde spermatogenik hücrelerde Hspa4l'nin yüksek birikimini göstermektedir (80).

2.7.4.2. Spermatogenez ve Sperm Gelişimine Katkı

HSPA4 ve HSPA4L, normal spermatogenez için gereklidir (80). Drosophila'da, HSPA4/HSPA4L'nin ortologu olan Hsc70Cb, spermatogoniya sağkalımı ve sperm bireyselleşmesi için esastır (81). HSPA4 eksikliği olan farelerde spermatogenezde duraklama meydana gelir; pakiten spermatositlerin çoğu ilk mayotik profazı tamamlayamaz ve apoptoza uğrar. Hspa4 eksikliği olan farelerde, geç profaz I ve postmayotik spermatitlerde ifade edilen genlerin transkripsiyon seviyelerinde azalma gözlenir, bu da spermatogenezin bu aşamalarda bozulduğunu doğrular (18).

Bu bulgular, HSPA4/HSPA4L'nin erkek fertilitesi için kritik olduğunu ve eksikliğin spermatogenezde duraklama ve germ hücre apoptozu gibi doğrudan patolojik sonuçlara yol açtığını güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır.

2.7.4.3. Sperm Kalitesi ve Motilitesi Üzerindeki Etki

Spermatozoada HSPA4L ifadesinin azalması, insan sperm kalitesinin düşüklüğü ile pozitif yönde ilişkilidir. HSPA4L, astenozoospermik (düşük motiliteli) ve teratozoospermik (anormal morfolojili) örneklerden alınan spermatozoalarda, normozoospermik örneklerle göre daha az ifade edilir (79). Hspa4 eksikliği olan farelerde, toplam spermatozoon sayısı ve motilitesi önemli ölçüde azalır. Hspa4l eksikliği olan farelerde gözlenen sperm motilite bozukluğu, flagella'nın yapısal kusurlarından kaynaklanmaz; elektron mikroskobu analizi normal aksonemal yapıları göstermiştir.

Bunun yerine, motilite kusuru Hspa4l'nin sperm motilitesinin kazanılmasına yol açan biyokimyasal yolda doğrudan veya dolaylı katılımına bağlanmaktadır. Hspa4l, Hspa4 ve Hsp70, spermatogenik hücrelerde ana kalmodulin (CaM) bağlayıcı proteinlerdir. CaM'nin flagellum bükülmesinde rol oynadığı bilinmektedir (80).

Bu bağlantı, HSPA4/HSPA4L eksikliğinin sperm motilitesini nasıl bozduğuna dair spesifik bir moleküler mekanizma sunmaktadır. HSPA4'ün şaperon işlevi, sperm hareketinde yer alan proteinlerin düzgün aktivitesi için gerekli olabilir ve bu durum, proteinin moleküler rolünü klinik bir fenotiple ilişkilendirmektedir.

2.7.4.4. Erkek İnfertilitesi ile İlişki: Genetik Varyantlar ve Germ Hücre Apoptozu

İnfertil bir erkekte, HSPA4L geninde hasar verici olduğu tahmin edilen homozigot, eşanlamlı olmayan bir genetik varyant tespit edilmiştir. Bu bulgu, Hsc70Cb mutant *Drosophila*'da sperm yokluğu ile tutarlıdır. Bu durum, HSPA4L'nin insanlarda ve *Drosophila*'da erkek fertilitesi için gerekliliğini desteklemektedir (79). HSPA4L eksikliği olan farelerde sperm sayısındaki azalma, apoptoz yoluyla önemli sayıda gelişmekte olan germ hücresinin elimine edilmesinden kaynaklanmaktadır (80).

Benzer şekilde, HSPA4 eksikliği olan farelerde seminifer tübüllerde artan apoptoz gözlenmiştir (18). HSPA4L ifadesinin insan sperm kalitesi ile ilişkisi, HSPA4L'nin sperm kalitesini değerlendirmek ve erkek infertilitesinin moleküler tanısı için umut vadeden bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, insan HSPA4/HSPA4L cDNA'sı ile *Drosophila* modellerinde gözlenen kısmi kurtarma, gen terapisi veya şaperon tabanlı müdahaleler gibi potansiyel terapötik yollara işaret etmektedir (79,81).

Eğer HSPA4/HSPA4L işlevi geri kazandırılabilirse, erkek fertilitesi iyileştirilebilir. Bu durum, gelecekteki terapötik gelişim için araştırma yönlerini açmaktadır.

2.7.4.5. HSPA4 ve Otoimmünite

Otoantikorlar, kendi antijenlerine karşı reaksiyon veren antikorlardır ve sağlıklı bireylerde (doğal antikorlar, esas olarak IgM) veya patolojik bir süreci (yüksek afiniteli, somatik olarak mutasyona uğramış IgG otoantikorları) yansıtabilirler (82). Isı şoku proteinlerine (HSP'ler) karşı otoantikorlar, sağlıklı bireylerde bulunur ve yükselmiş titreleri, çeşitli inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarla ilişkilidir (83).

Anti-HSP otoantikörlerinin rolü çift yönlü olabilir: hastalığın tipi, HSP ailesi, antikor izotipi ve diğer faktörlere bağlı olarak koruyucu veya patojenik olabilirler (84). Bu durum, sadece otoantikörlerin varlığının veya yükselmiş titrelerinin klinik yorum için yeterli olmadığını, daha nüanslı bir analizin gerektiğini göstermektedir.

2.7.4.6. Otoimmün Erkek İnfertilitesinde Potansiyel Rol

ASA'lar, spermatogenezi bozarak, sperm aglütinasyonuna neden olarak, motiliteyi azaltarak ve fertilizasyonu önleyerek erkek infertilitesinin doğrudan bir nedenidir. ASA'lar, infertil çiftlerin %9-36'sında bulunur (68). Mikroorganizmaların konak proteinlerini (sperm antijenleri dahil) taklit ettiği moleküler etki, otoimmüniteyi başlatabilir ve enfeksiyöz etiyolojili otoimmün infertilitenin kritik bir mekanizmasıdır. Örneğin, Chlamydia trachomatis'e karşı bir bağışıklık yanıtı, Chlamydia ve insan spermi tarafından paylaşılan bir ısı şoku proteininin bir epitopuna karşı bağışıklık yanıtlarını aktive ederek inflamasyona ve bozulmuş fertilitateye yol açabilir (69).

HSPA4'ün testislerde yüksek oranda ifade edilmesi ve spermatogenez için kritik olması göz önüne alındığında, HSPA4'ün epitoplarının bir patojenin HSP'si tarafından taklit edilmesi durumunda teorik olarak bir otoantijen haline gelmesi olasıdır (79).

Bu durum, HSPA4'ün otoimmün erkek infertilitesinde dolaylı bir rol oynayabileceğine dair makul bir hipotez sunmaktadır, ancak bu konuda doğrudan kanıtlar mevcut değildir.

2.7.4.7. Anahtar Protein-Protein Etkileşimleri ve Kompleksleri

HSPA4, diğer ısı şoku proteinleri, özellikle HSP70'ler ile etkileşime girer (76).

Spermatogenik hücrelerde ana kalmodulin bağlayıcı proteindir (80).

2.7.4.8. Hücresel Sinyal Yollarında Katılım

HSPA4, hücre döngüsü düzenlemesinde rol oynar (73). PI3K/AKT yolu ve Syntenin/SOX4/Wnt/ β -katenin yolu gibi sinyal yollarıyla bağlantılıdır. HSPA4, klattrin aracılı endositozu teşvik ederek BRSV (Bovine respiratuar sinsityal virus) girişini ve replikasyonunu düzenleyebilir (76,85). HSPA4'ün

protein katlanması, hücre döngüsü ve apoptoz gibi çoklu kritik hücresel süreçlerdeki katılımı ve çeşitli sinyal yollarıyla etkileşimi, onu hücresel stres yanıtığında merkezi bir merkez haline getirmektedir.

Bu merkezin bozulması, kanser ve infertilite gibi karmaşık patolojilere katkıda bulunan bir dizi aşağı akış etkisine yol açabilir.

2.8. REC8

2.8.1. Tanım ve Moleküler Özellikler

REC8 (REC8 Mayotik Rekombinasyon Proteini), yapısal kromozom bakımı (SMC) protein ortaklarının kleisin ailesine ait kritik bir nükleer proteindir.

SMC1, SMC3 ve STAG3'ü de içeren mayotik kohezin kompleksinin temel bir bileşenidir. İnsan REC8 proteini yaklaşık 60-67 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Sister kromatid kohezyonunu sürdürmek için DNA'yı çevreleyen diğer kohezin alt birimleriyle halka şeklinde bir yapı oluşturur (86).

REC8, çeşitli ökaryotlarda yüksek oranda korunmuştur (16).

Bu durum, hücresel süreçlerdeki temel ve yeri doldurulamaz rolünün altını çizmektedir. Birincil ve en kapsamlı şekilde incelenen işlevi mayozdur; burada mayoz I profazı sırasında germ hücrelerinde (oositler ve spermatositler) baskın olarak ifade edilir (86).

2.8.2. Mayozda REC8

REC8, DNA replikasyonundan sonra sister kromatidler arasında kohezyonun kurulması ve sürdürülmesi için gerekli olan kohezin kompleksinin mayoza özgü kleisin alt birimidir. Bu kohezyon, mayotik bölünmeler sırasında sister kromatidlerin hassas ayrılmasına kadar bağlantılı kalmalarını sağlayan fiziksel bir bağlantıdır. REC8'in anahtar bir bileşen olduğu kohezin kompleksi, sister kromatidleri bir arada tutarak kromozom yapısına entegre olur (86).

2.8.2.1. Homolog Kromozom Eşleşmesi ve Sinapsis

REC8 kohezini, sinaptonemal kompleksin lateral elemanlarının öncüleri olan eksenel elemanların birleşmesinde kritik bir rol oynar. Sinaptonemal komplek, mayoz I profazı sırasında homolog kromozomlar arasında oluşan, onların eşleşmesini ve rekombinasyonunu kolaylaştıran bir protein iskeletidir (16).

REC8, eksen oluşumu ve ardından sinaptonemal komplekslerin oluşumu için gereklidir (87).

Eksenel elemanın yapısal bileşenleri olan Red1 ve Hop1 gibi proteinleri kromozom eksen bölgelerine alımı için esastır. REC8 kohezini ayrıca, DNA çift sarmal kırılmalarından veya sinaptonemal kompleks oluşumundan bağımsız olarak homolog eşleşme için de gereklidir. Nükleer hareket sırasında çekme kuvvetinin iletilmesindeki rolü, homolog kromozomların doğru burulma dönüşüne ve hizalanmasına katkıda bulunur (16).

2.8.2.2. Mayotik Rekombinasyon

REC8, homolog kromozomların rekombinasyonunda merkezi bir role sahiptir. DNA çift darmak kırıklarının sister kromatidler yerine homolog kromozomlar kullanılarak tercihli olarak onarılması sürecini etkiler (16).

REC8 yokluğunda rekombinasyon hala gerçekleşebilse de geçiş rekombinasyonunun ilerlemesinde gecikme ve anahtar ara aşamalarda homolog önyargının kaybı gibi önemli sapmalar gösterir (87).

REC8 ayrıca DNA çift sarmal kırılma onarımında da rol oynar (88).

2.8.2.3. Kromozom Ayrımı

Mayoz I'de homolog kromozomların ve Mayoz II'de sister kromatidlerin hassas ayrılması, separaz tarafından REC8'in proteolitik bölünmesiyle sağlanır (86). (**Şekil 6**)

Anafaz I sırasında, kromozom kollarındaki kohezin bölünür ve homolog kromozomların ayrılmasına izin verir. Kritik olarak, sentromerik REC8 kohezini degradasyondan korunur, bu da sister kromatidlerin Mayoz II'ye kadar sentromerde bağlı kalmasını sağlar. Bu koruma, mayozu özgü kinetokor faktörleri tarafından düzenlenir (16).

2.8.2.4. Post-Translasyonel Modifikasyonlar

REC8 yokluğunda DNA çift sarmal kırılmalarının onarılamadığı ve sinapsisin homolog kromozomlar yerine sister kromatidler arasında gerçekleştiği açıkça belirtilmiştir (89).

Bu, doğrudan bir nedensel bağlantıyı göstermektedir. Eğer sister kromatidler için "yapıştırıcı" görevi gören REC8 kusurluysa, homolog

kromozomların eşleşmesi, rekombinasyonlarının kolaylaştırılması ve doğru ayrılmalarının sağlanması gibi sonraki adımlar kaçınılmaz olarak tehlikeye girecektir. Bu durum, mayozun izole adımlar dizisi değil, REC8'in merkezi bir düzenleyici olarak hareket ettiği, yüksek düzeyde entegre ve birbirine bağımlı bir süreç olduğunu vurgulamaktadır.

Dolayısıyla, REC8 aracılı bir işlevdeki bir kusur, anöplidi ve infertilite gibi ciddi sonuçlara yol açabilir (16).

2.8.3. REC8 ve Erkek Fertilitesi

2.8.3.1. Spermatogenezdeki Rolü

REC8'in önemli bir rol oynadığı mayozun doğru düzenlenmesi, normal spermatogenez için kritik öneme sahiptir (90). REC8'in işlevleri, sağlıklı sperm üretimini sağlayarak erkek germ hücresi gelişimi ve olgunlaşması için hayati öneme sahiptir. Özellikle, REC8 mitotik olarak çoğalan spermatogonyalarda ve daha sonra mayotik profazda (zigoten ve pakiten spermatositler) tespit edilmiştir; burada mayotik rekombinasyon sırasında DNA eksizyon onarımında rol oynayabilir (63).

2.8.3.2. Genetik Kusurlar ve Disregülasyon

Mayozdaki kritik işlevi ve hayvan çalışmalarından elde edilen bulgulara dayanarak, REC8 erkek infertilitesi için aday bir gen olarak tanımlanmıştır. Ancak, şiddetli infertil erkeklerde REC8 genindeki dizi varyasyonlarını değerlendiren çalışmalar, REC8 genindeki polimorfizmlerin bu popülasyonlarda infertilite için yaygın bir neden olmadığını göstermiştir. Fareler gibi hayvan modelleri, REC8 eksikliğinin derin etkisini göstermektedir: Her iki cinsiyette de REC8-null fareler, germ hücre yetmezliği nedeniyle sterildir ve spermatositler geç zigoten benzeri bir aşamada duraksar. Farelerde REC8 kohezininin yokluğu, homolog kromozomlar yerine sister kromatitler arasında sinapsisi de teşvik ederek, inter-homolog sinapsisin sağlanmasındaki rolünü vurgulamaktadır (90).

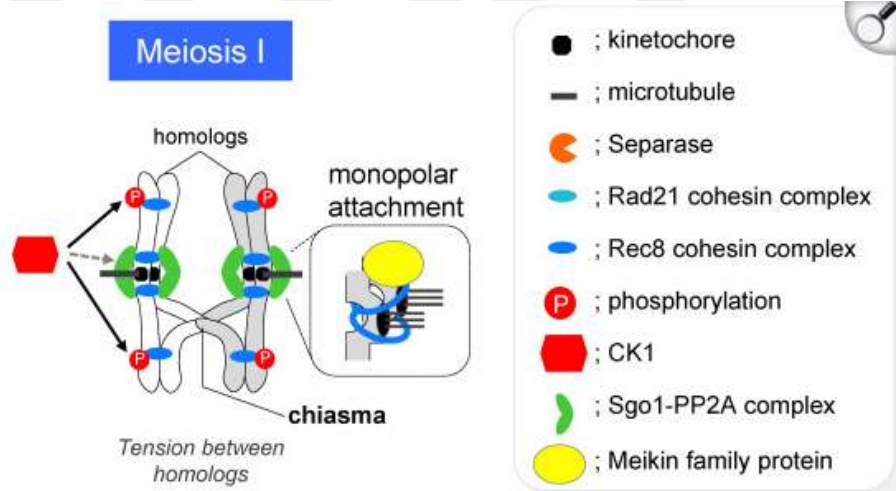
Sonuçta insan erkek infertilitesinin REC8 ile bağlantılı genetik temelini basit Mendelyen kalıttan daha karmaşık olabileceğini düşündürmektedir. Tek, yüksek penetrasyonlu mutasyonlar yerine, daha ince genetik varyasyonlar, örneğin küçük bireysel etkilere sahip nadir varyantlar, poligenik bir riske katkıda bulunabilir (91). Bu durum, REC8'in patolojik olarak insan

infertilitesine katılımlarında, doğrudan kodlama dizisindeki bir mutasyondan ziyade, işlevinin 'disregülasyonunun' anahtar olduğunu ima etmektedir.

2.8.3.3. Mayotik Hatalar ve Anöploid

REC8'i içerenler de dahil olmak üzere mayozdaki bozukluklar, azospermi veya şiddetli oligozoospermi gibi şiddetli erkek faktörü infertilite fenotipleriyle güçlü bir şekilde ilişkilidir. REC8'in merkezi olduğu mayotik rekombinasyondaki hatalar, gamet anöploidisine yol açabilir; bu da insanlarda gebelik kaybı ve gelişimsel engellerin önemli bir nedenidir.

REC8 ile ilgili erkek infertilitesinin genetik nedenselliğindeki nüans göz önüne alındığında, tanı ve tedavisi önemli zorluklar sunmaktadır. Basit REC8 gen dizilemesi tanı için yeterli olmayabilir. Bunun yerine, daha derinlemesine bir anlayış, REC8 ekspresyonundaki, post-translasyonel modifikasyonlardaki veya etkileşim yollarındaki ince disregülasyonları tanımlamak için sofistike çoklu-omik yaklaşımlar (örneğin, transkriptomik, epigenomik, proteomik) gerektirmektedir (90).



Şekil 6: Mayoz ve Rec8 ilişkisi (16)

2.9. GAPDH

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), sitoplazmada anaerobik glikoliz yoluyla enerji metabolizması ve ATP ve piruvat üretimi için uzun zamandır önemli bir enzim olarak kabul edilmektedir (92).

Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), en belirgin housekeeping proteinlerinden biridir ve bazı yarı kantitatif tahlillerde iç kontrol olarak yaygın olarak kullanılır (93).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'nun 30/05/2023 tarihli 77.637.435 / 261 Karar numaralı onayı ile yapıldı. Çalışmamızda hastalık modeli oluşturulması, histokimyasal ve immünohistokimyasal inceleme için gerekli malzemelerin alınması ve deney hayvanı temini/bakımı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023-100 numaralı proje ile desteklendi.

3.1. Hayvanların Alınması, Barındırılması

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 12-16 haftalık 30 adet erkek Wistar sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar altında (22°C sıcaklık ve %30-70 nem, aydınlık karanlık döngüsü 12/12 saat) tutuldu. Bütün hayvanlar ad libitum ile beslendi ve deney boyunca içme suyu aldı.

Hayvanlar 5 gruba ayrıldı.



Şekil 7: Deney Hayvanları Laboratuvarı

3.2. Çalışmanın Tasarımı

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları merkezinden temin edildi. 30 adet erişkin (12-16 haftalık) erkek wistar sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

Sıçanlardan 30 hayvan 5 eşit gruba ayrıldı.

Grup 1: Hiçbir işlem yapılmayan sağlıklı kontrol grubudur.

Grup 2: Siklofosfamid çözücüsü (Serum Fizyolojik %0.9 Sodyum Klorür) uygulanan gruptur. (Sham)

Grup 3: Sadece abaloparatid (10 mikrogram/kg 56 gün boyunca) tedavisi uygulandı.

Grup 4: Sadece siklofosfamid (15 mg/kg 20 gün boyunca) uygulandı.

Grup 5: Siklofosfamid (15 mg/kg 20 gün boyunca) ve abaloparatid (10 mikrogram/kg 56 gün boyunca) tedavisi uygulandı. İlk 20 gün iki ilaç birlikte uygulandı.

Tüm gruplara ait ratlar verilen ilaç tedavileri tamamlandıktan sonra kurban edildi. Hayvanların testisleri alındı. Bütün hayvanların testis ve vücut ağırlıkları kaydedildi.

Sağ testisleri %10 formalin solüsyonunda 72 saate kadar fikse edilerek, parafin bloklar haline getirildi. Doku örneklerinden alınan kesitlerde CREB, PCNA, HSPA4, REC8, GAPDH primer antikoları kullanılarak immünohistokimyasal teknik ile değerlendirildi.

Sol testisler bir tüp içerisinde sıvı azota alınarak donduruldu. Daha sonra Western-Blot yöntemi için -80° sıcaklıkta dolapta saklandı.

Hematoksilen&Eozin boyama işlemleri tamamlanan kesitler kapama yapıldıktan sonra 1 gün kurumaya bırakıldı. Daha sonra morfolojik değerlendirme ve Johnsen skor ile testis skoru belirlemek amacıyla 4x,10x,20x,40x ışık mikroskopik büyütmeleleriyle resimleri çekildi. Çekilen resimler arşivlendi.

Sonuçlar kaydedildi.

3.3. Yöntem

3.3.1. Parafin Takip-Kesit Alma İşlemi-Hematoksilen Eozin

Boyama

Tüm gruplarımıza ait testis dokuları %10'luk formalin içerisinde 48 saat boyunca fiksasyon işlemi yapıldı. Dokudaki formalin akarsu ile uzaklaştırıldıktan sonra örnekler rutin doku takip prosedürü uygulanarak ve takiben parafin bloklara gömüldü. Bu elde edilen parafine gömülü bloklardan mikrotom ile yaklaşık 5 µm kalınlıkta kesitler alınmıştır. Bu elde ettiğimiz

kesitler her bir lizinli lam üzerinde 3–4 adet olacak şekilde sıralanmıştır. Ayrıca hematoksilen eozin boyama için rodajlı lamlara ek doku kesitleri alınmıştır.

Tablo 3: Parafin Takip Protokolü

	%100 Alkol	60 dakika
Şeffaflaştırma işlemi	Alkol-Ksilen	Yarım saat
	Ksilen	60 dakika
	Ksilen	60 dakika
İnfiltrasyon işlemi	Ksilen ve Parafin	Yarım saat
	Parafin	60 dakika
	Parafin	60 dakika
Gömme işlemi	Parafin	

Yapılan İşlem	Uygulanan Madde	Uygulama Süresi
Tespit	%10'luk Formalin	1-3 gün süresince
Dehidratasyon işlemi	%60 Alkol	Yarım saat
	%70 Alkol	Yarım saat
	%80 Alkol	Yarım saat
	%90 Alkol	Yarım saat
	%100 Alkol	60 dakika

Tablo 4: Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü

Takip Sonrası İşlemler	Uygulanan Madde veya Maddeler	Uygulama Süresi
Parafinden Uzaklaştırma	Etüv İçerisinde 56 Derecede	1 Gece
	KSİLEN	60 DAKİKA
Rehidratasyon	%96 Oranında Alkol	2 Dakika
	%80 ORANINDA ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ORANINDA ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ORANINDA ALKOL	2 DAKİKA
Yıkama İşlemi	Akar Suda	5 Dakika
Boyama	Hematoksilen	3 Dakika
Yıkama İşlemi	Akar Suda	5 Dakika
Diferansiyasyon	Asit-Alkol İle	1 Saniye
Yıkama İşlemi	Akar Suda	5 Dakika
Boyama	Eozin Boyası İle	2 Dakika
Yıkama İşlemi	Akar Suda	5 Dakika
Dehidratasyon	%80 Oranında Alkol	1 Dakika
	%96 ORANINDA ALKOL	1 DAKİKA
Şeffaflaştırma	Ksilenle	60 Dakika
Kapama İşlemi	Entellan	

3.3.1.1. Johnsen Skorlama

H&E boyaması sonrası rat testis dokuları incelendi. Her bir kesit 400x büyütmede sistematik olarak görünüldü. Johnsen skoru seminifer tübüldeki spermatogenezi değerlendirmek için kullanılan bir skordur (94). Her bir hayvan için alınan kesitlerde en az 50 adet seminifer tübül değerlendirildi.

Seminifer tübüllere 1'den 10'a kadar puanlar aşağıdaki gibi verildi.

Verilen puanlar toplandı ve seminifer tübül sayısına bölünerek Johnsen skoru elde edildi. Her bir hayvan için not edildi. Daha sonra hayvanlar hangi grupta ise o grubun ortalaması alınarak kaydedildi.

Johnsen Skoru Bulguları Puanlaması

10: Tam spermatogenez ve mükemmel tübüller

9: Birçok spermatozoa mevcut ancak düzensiz germinal epitel

8: Sadece birkaç spermatozoa mevcut

7: Spermatozoa yok ama birçok spermatid mevcut

6: Spermatozoa yok, sadece birkaç spermatid mevcut

5: Spermatozoa veya spermatid yoktur ancak birçok spermatosit mevcuttur

4: Sadece birkaç spermatosit (<5) ve spermatid veya spermatozoa mevcut değil

3: Sadece spermatogonya mevcut

2: Germ hücresi yok ama Sertoli hücreleri mevcut

1: Ne germ hücreleri ne de Sertoli hücreleri mevcut

3.3.2. İmmünohistokimya

Aldığımız kesitler immünohistokimyasal boyama için bir gece boyunca 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30 dakika olarak iki farklı değişim ksilen ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra %95'ten %60'a değişimleri azalan oranlarda alkol solüsyonları ile rehidratasyon yapılarak distile suda 5 dakika bekletildi. Hidrofobik kalem ile sınırlandırılan Sitrat solüsyonu içinde 95 derece sıcaklıkta 20 dakika bekletilen kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük Hidrojen Peroksit uygulanmıştır. 3 kere 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Phosphate buffer solution) ile yıkanan doku kesitleri, bloklamak için 1 saat blokama solusyonu ile muamele

edilmiştir. Bloklama solusyonu bu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra CREB (Proteintech 12208-1-AP), PCNA (Proteintech 10205-2-AP), REC8 (Proteintech 10793-1-AP), HSPA4 (Proteintech 21206-1-AP) ve GAPDH (Bioss bs-2188R) (pozitif kontrol) primer antikorları ile bir gece süresince inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Diğer gün tampon solüsyonu ile 3 kez yıkanan bu doku kesitleri, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (Thermo UltraVision Large Volume Detection System TR-125-AL) ile 30 'ar dakika boyanmıştır. Yine üç kere 5 'er dakika tampon solusyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü ortaya çıkarmak için diaminobenzidin (DAB) ile 5 dk boyanmıştır. Mayers Hematoksilen ile boyanması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler kapatma medyumumu ile kapatılmıştır. (Şekil 8)



Şekil 8: İmmunohistokimya Uygulaması

3.3.3. Western Blotlama

Bu yöntemle 3 grup arasında karşılaştırma yapıldı. Her grup için 3'er hayvan random seçildi. Grup 1 Kontrol grubudur. Kırmızı renkte gösterildi. Grup 2 SF uygulaması alan gruptur. Grup 2 yeşil renkte gösterildi. Grup 3 ABL+SF uygulamasını birlikte alan gruptur. Grup 3 mavi renkte gösterildi. Primer CREB, PCNA, REC8, HSPA4 ve GAPDH (pozitif kontrol) antikorları kullanıldı.

3.3.3.1. Protein İzolasyonu ve Kantifikasyonu

Doku örnekleri -80°C dolaptan alınıp homojenizatör ile homojenize edildi ve kalan örnekler -80°C'de saklanacak şekilde depolandı.

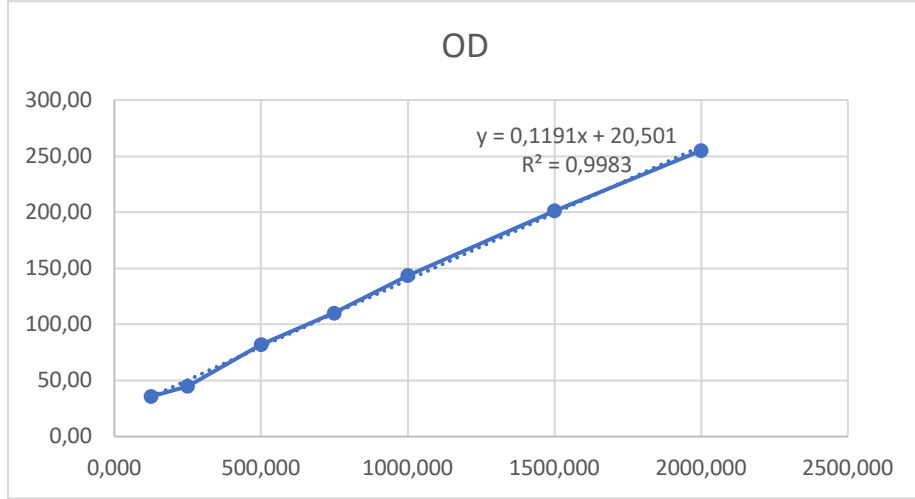
-80°C'den çıkarılan örnekler çözünmeden üzerlerine Proteaz inhibitör kokteyli (Clontech-PT5140-2) içeren 2 ml soğuk xTractor (Takara-635625) lizis tamponu eklendi, 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi ve 10 dakikada bir vortekslendi. Sonrasında 30 dk +4°C'de 16000g'de santrifüj edildi. Süpernatant içindeki çözölmüş proteinler yeni bir tüpe alındı ve pellet atıldı.

Protein konsantrasyonu, Bisinkoninik Asit (BCA) Assay tekniğiyle üreticinin belirlediği protokole uygun olarak belirlendi (Takara-T9300A). Bunun için 125-2000 µg/ml arasında 7 farklı konsantrasyonda BSA standardı xtractor buffer ile seyreltilerek hazırlandı. Blank olarak bufferın kendisi kullanıldı. 20'şer µl örnek proteinler ve standartlar 96 gözlü şeffaf kuyucuğa 3 tekrar şeklinde yüklendi. Üzerine 250 µl 1X CBB boya solüsyonu eklendi ve 30 dk oda 37°C'de inkübe edildi.

Süre sonunda spektrofotometrede 595 nm okuma yapıp ve blank optik yoğunluk (OD) değeri tüm standart ve örneklerden çıkartıldı ve standart eğri çizildi.

Tablo 5: Standartlar

Konsantrasyon µg/ml	125	250	500	750	1000	1500	2000
OD (Blanked)	0.1398	0.1764	0.3215	0.4326	0.5633	0.7895	1



Şekil 9: Protein Miktarları

Standart eğriye göre $y=0,0005x + 0,0962$ formülü ve R^2 değeri 0,9983 olarak hesaplandı. Bu formüle göre örneklerin OD değerlerine göre protein konsantrasyonları hesaplandı.

Hesaplanan değerlere göre tüm örnekler 100 µg/ml konsantrasyona gelecek şekilde extractor buffer ile seyreltilti. Örnekler üzerine her ml için 0,34 µl %10 β-merkaptoetanol (Biorad- 1610710) içeren 4X laemmli tamponu (Biorad-1610747) eklenerek 95°C'de 5 dakika su banyosunda denatüre edildi. Eklenen tampon sonucunda örnek konsantrasyonu 80 µg/ml olarak kaydedildi ve -20°C'de saklandı.

3.3.3.2. SDS-PAGE-Tamponların hazırlanması

Aşağıda tabloları verilen tampon çözeltiler çalışmalara başlamadan önce ayrı ayrı hazırlandı. pH değerleri tablodaki değerlere göre ayarlandıktan sonra çözeltiler 24 saat dinlendirildi ve ertesi gün pH değerleri tekrar kontrol edilerek gösterilen değerde sabitlendirildi.

Ana Jel Tamponu

SDS 16ml, Tris-base 72,683 gr, çift distile su 180 ml pH 8,8 olacak şekilde ayarlandı. Çift distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

Stacking Jel Tamponu

SDS %10 16 ml, tris-base 12,10 gram, çift distile su 160 ml ve pH 6,8 olacak şekilde ayarlandı. 200 ml ye çift distile su ile tamamlandı.

Running Tamponu

Tris-base 250mM (30,285 gr), glisin 1.92 M (144,13 gr) ve SDS %1 lik 10 gram ph 8,3 olacak şekilde ayarlandı.

Transfer Tamponu

250 mM Tris-base (30,285 gr), 1.9 M glisin (144,13 gr) ve pH 8,3 olacak şekilde ayarlandı. 1X'e seyreltirken %20 lik soğuk metanol eklenir.

Tris Tamponlu Salin (TBS)

Tris-base 24 gram, NaCl 88 gram, çift distile su 900 ml ile hazırlandı ve pH 7,6 olacak şekilde titre edildi. 1 litreye tamamlandı.

TBST

100 ml 10x tbs, 900 ml çift distile su ve 1 ml Tween 20 ile oluşturuldu.

Ponceau S Boyası

Ponceau S boyası %0.10 ile asetil asit %5 ve distile su 50 ml ile oluşturuldu.

3.3.3.3. Jel Hazırlama ve Elektroforez

Hedef antijenlerin büyüklüğü değerlendirilerek jel konsantrasyonuna %10 olarak karar verildi. Buna göre aşağıda tablosu verilen seperating jel hazırlandı ve jel dökme aparatına yüklendi. Üzerine %60 isopropil alkol (Riedel de Haen-24137) ile doldurularak jelin üst seviyesi düzleştirildi ve 30-45 dakika boyunca donması beklendi.

Tablo 6: Seperating Jel Formülü

Bileşen	
Bis-akrilamid (1:30) (Biorad-1610156)	1,65 ml
Çift distile H2O	2,725 ml
Ana Jel Tamponu	0,625 ml
%10 AmonyumPerSülfat (ul) (Biorad-1610700)	25 µl
Tetramethylethylenediamine (ul)(Biorad-1610800)	5 µl

Jelin donduğu doğrulandıktan sonra üzerindeki isopropil alkol filtre kağıdıyla emdirildikten sonra aşağıda tabloda karışımı verilen stacking jel hazırlandı ve yüzeye kadar doldurularak taraklarla birlikte jel 30-45 dakika donmaya bırakıldı.

Tablo 7: Stacking Jel Formülü

Bileşen	
Bis-akrilamid (1:30)	1 ml
Çift distile H ₂ O	5 ml
Stacking jel tamponu pH (6.8)	2 ml
%10 Amonyum Per Sülfat (l)	50 l
Tetra Metil Etilen Diamin (l)	10 l

Sonrasında taraklar çıkarılıp ve jel yıkandı. Aparatıyla birlikte yürütme tankına alınan jelin kabı 1X running tamponuyla dolduruldu.

Kuyucuklara protein boyut markerı 8 l (Precision Plus Protein Dual Color, Biorad1610374), kontrol grubu ve diğer 4 grup 30 l (2,4 g total protein) sırasıyla yüklendi. Dış tank yarıya kadar running tamponuyla doldurulup ve 90 Volt'ta çalıştırıldı. Boya yürümesi takip edilip ve yaklaşık 20 dk sonra stacking jel seviyesini geçince voltaj 120 Volt'a yükseltilip ve yaklaşık 2 saat boyunca yürütüldü. Markerın açıklığı takip edilerek hedef proteinlerin olduğu bölgelerde iyice ayrıldığı doğrulandığında yürüme durduruldu. (**şekil 10**)



Şekil 10: Jel Örnek Yükleme ve Elektroforez

3.3.3.4. Membrana Transfer ve Blotlama

1X transfer tamponu soğuk olarak hazırlanıp ve filtre kağıtları, nitroselüloz membran (Biorad-1620115) ve süngerler bu tamponda ıslatıldı. Sandviç kaset içerisine sırasıyla sünger-filtre kâğıdı- jel- nitroselüloz membran ıslak ortamda eklendi ve jel ile membran üzerinde mini merdane gezdirilerek arada kalan sıvı ve hava alındı. Sonra tekrar filtre kâğıdı ve sünger eklenerek sandviç kaset düzeneği sıkıca kapatılıp ve transfer tankına yüklendi. Katottan anota doğru akımın jelden membrana doğru denk geleceği şekilde kasetler transfer tankına yerleştirilecek ve tank da içi buzlu su dolu daha büyük bir saklama kabına konuldu. Tankın en altına manyetik karıştırıcı yerleştirilecek ve 350 miniAMPER akımda 90 dakika transfer gerçekleştirildi. (**Şekil 11**)



Şekil 11: Transfer İşlemi

Transfer sonrası jel atılıp ve membran distile suyla yıkandı. Hazırlanan Ponceau S boyası membrana damlatılıp ve birkaç dakika yavaşça çalkalandı. Ponceau S boyası yıkandıktan sonra membran üzerinde protein bantları aşağıdaki görseldeki şekilde gözlenerek transferin gerçekleştiği doğrulandı. (Şekil 12)



Şekil 12: Ponceau Boyaması

Sonrasında membranlar işaretleneceği antikorlara göre farklı kaplara alınarak ve TBST ile 5 dakika çalkalanarak Ponceau S temizlendi. Blocking işlemi için %5 süt tozu (Santa Cruz sc-2324) içeren TBS içerisinde membranlar yavaş hızda 1 saat çalkalandı. Süre sonunda karışım dökülerek TBST ile bir kez yıkandı.

%1 BSA (Santa Cruz- 9048-46) içeren TBST içerisinde primer antikorlar aşağıdaki tabloya göre seyreltilti. (**Tablo 8**)

Tablo 8: Primer Antikorlar ve Dilüsyonları

Antikor	Katalog No	Seyreltme Oranı	Moleküler Ağırlık
CREB	Proteintech 12208-1-AP	1/6000	45 kD
PCNA	Proteintech 10205-2-AP	1/10000	31 kD
REC8	Proteintech 10793-1-AP	1/500	63 kD
HSPA4	Proteintech 21206-1-AP	1/1000	110 kD
GAPDH	Bioss bs-2188R	1/4000	37 kD

Primer antikor karışımlarıyla birlikte membranlar +25°C'de 2 saat boyunca yavaş çalkalamada bırakıldı ve sonra TBST ile 4 defa 10 dakika boyunca yüksek hızda çalkalanarak yıkandı.



Şekil 13: Transfer Sonrası Membranlar

%1 BSA içeren TBST ile 1/3000 oranında sulandırılan sekonder antikor (Biorad- 1706515) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat yavaş çalkalamada membranlar inkübe edildi.

Sonrasında 4 defa 10 dakika boyunca TBST ile yıkanan membranlar (**Şekil 13**) üzerine kemilüminesans (ECL) luminol karışımı (Biorad-1705061) eklenerek 5 dakika sonra karanlık odalı kamerada fotoğrafı çekildi.

Çekilen ECL fotoğraflarında bantlar GAPDH'a göre normalize edilecek ve gruplar arasındaki ifade farklılıkları ImageJ programıyla hesaplandı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen bulgulardan gruplar arasındaki farklılık Graph pad prism programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak verilmiştir.

Grup dağılımları Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov test kullanılarak bakılmıştır. Grup varyans analizleri Brown-Forsythe test ve Barlett's test kullanılarak yapılmıştır. $P < 0,05$ olduğunda testler pozitif kabul edilmiştir.

İki grup arasındaki farklılık eşleştirilmemiş t-testi kullanılarak, ikiden fazla olan gruplar arası değerlendirmelerde farklılıklar one-way ANOVA kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir uygulama kendi içinde eşleştirilmiş t- testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık kabul edilmiştir.

Parametrik test şartlarını karşılamayan durumlarda ikiden fazla olan gruplar için Kruskal Wallis Testi kullanılarak hesaplanmıştır ve her bir uygulama kendi içinde Wilcoxon Testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Sıçanların Vücut ve Testis Ağırlıkları Bulguları

Deney boyunca ilaç uygulamaları yapılan bütün sıçanlar işlemler tamamlandıktan sonra sakrifiye edildi. Sakrifikasyon işleminden önce vücut ağırlıkları ölçüldü. Bu ölçümler not edildikten sonra hayvanların testisleri de yine ölçülmek üzere çıkarıldı. Testisler epididimisten ayrıldı. Sadece testis dokusu bırakıldı. Hayvanların sağ testisleri ölçüldü. Ağırlıkları kaydedildi. İlaç modelinin oluşup oluşmadığının sağlaması yapılması için siklofosfamid alan sıçan grubunun ağırlıkları ve testis ağırlığı/vücut ağırlığı oranlarının değişimleri ve diğer gruplarla farkları kaydedildi. **(Tablo 9)**

Testis ağırlıkları, siklofosfamid alan grupta diğer gruplara göre, toplam vücut ağırlığıyla birlikte azalmış olarak saptandı. **(Şekil 15 ve 16)**

Testis ağırlığı/toplam vücut ağırlığı oranı da yine siklofosfamid alan grupta diğer gruplara göre azalmış saptandı. Yani testis daha fazla etkilendi. **(Tablo 11)**

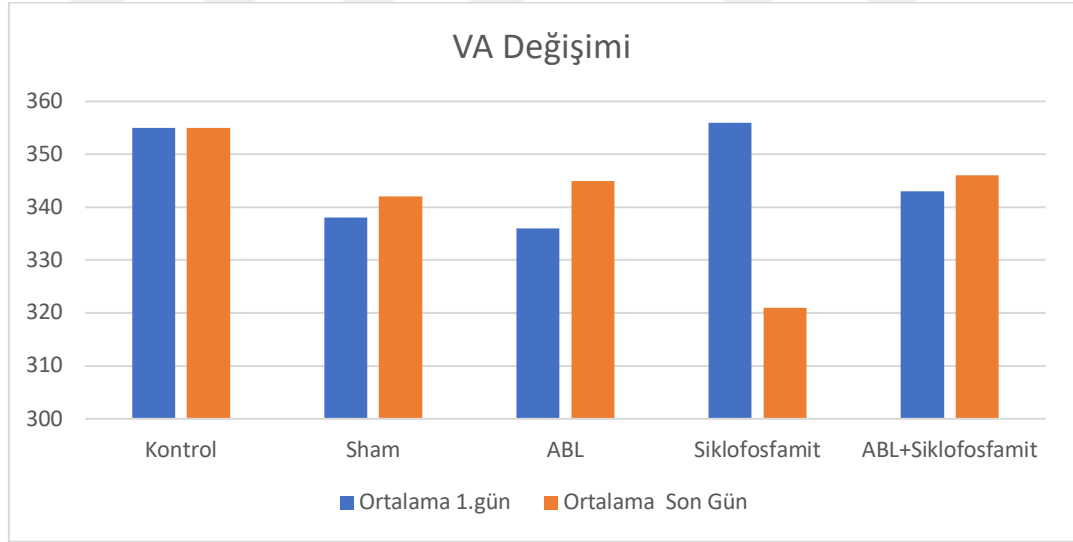
ABL+Siklofosfamid uygulaması alan grupta ise Kontrol, Sham ve yalnızca ABL uygulaması alan gruba benzer değerler not edildi. Özellikle bir miktar vücut ağırlıklarında düşme olsa dahi Testis/VA İndeksinde belirgin düşüş olmaması görece testisin korunduğu fikrini verdi. Siklofosfamid grubunda ise vücut ağırlığı düşerken Testis/VA oranının düşüşü daha fazla oldu. Bu da siklofosfamidten özellikle testisin daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Aynı zamanda ABL'nin testisi koruduğu da ağırlık olarak saptandı. **(Tablo 11, Şekil 16)**

Rat vücut ağırlıkları Shapiro-Wilk ve Kolmogorov Smirnov normal dağılım testlerine tabi tutuldu. Bu testler sonucu dağılımın normal olduğu saptandı. Ayrıca varyant analizi de yapıldı. (Barbett's test ve Brown-Forsythe test) Varyant testleri de olumlu saptandı. Parametrik olarak değerlendirildi.

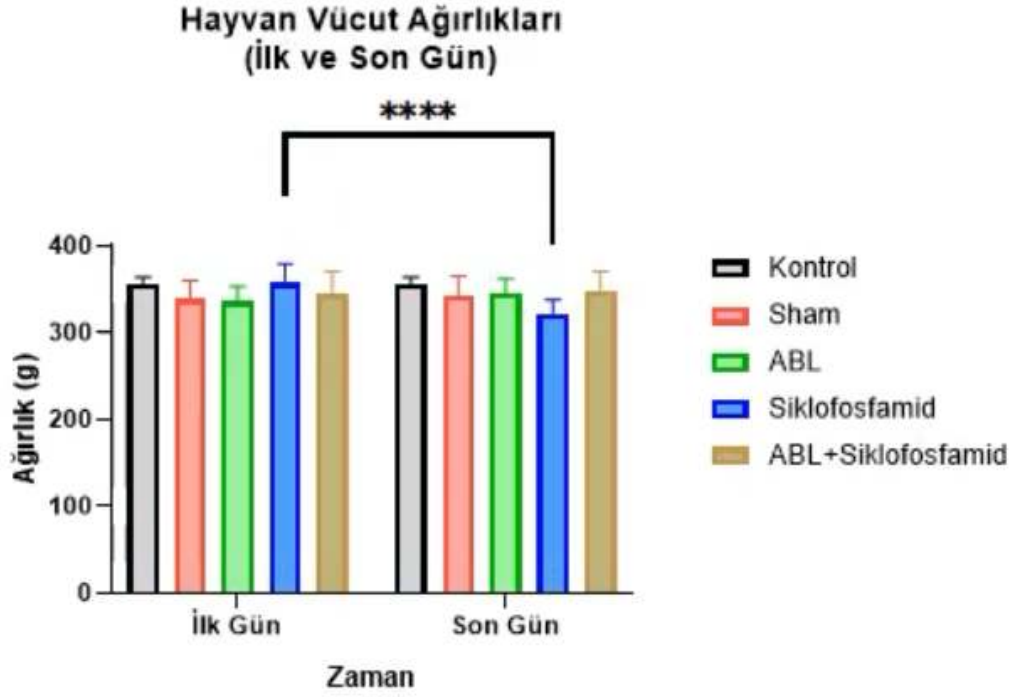
Daha sonra Çift Yön Anova testi yapıldı. Anova testi siklofosfamid uygulaması alan rat grubunun vücut ağırlıklarındaki değişimi ($p < 0,0001$ olarak +4) anlamlı saptadı. **(Şekil 15)** Kontrol grubu, Sham grubu, ABL grubu ve ABL+SF grubunun 1. gün ve 56. gün kilo değişimleri anlamlı olmadığı tespit edildi. Bu bulgu deney modelimizin oluştuğunun kanıtlarından biridir.

Tablo 9: 1. Gün ve 56. Gün Hayvan Ağırlıkları

Vücut (Gram) 1.Gün – 56. Gün	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Ortalama
Kontrol	350- 355	360- 365	350- 350	370- 365	345- 350	355- 345	355-355
Sham	360- 365	310- 310	360- 355	350- 365	330- 325	320- 335	338-342
ABL	330- 345	315- 320	350- 360	340- 345	320- 335	360- 365	336-345
Siklofosfamid	380- 345	370- 330	340- 315	380- 330	340- 305	330- 300	356- 321****
ABL+Siklofosfamid	370- 365	320- 330	360- 345	300- 310	350- 355	360- 375	343-346



Şekil 14: Rat Vücut Ağırlıkları Değişimi



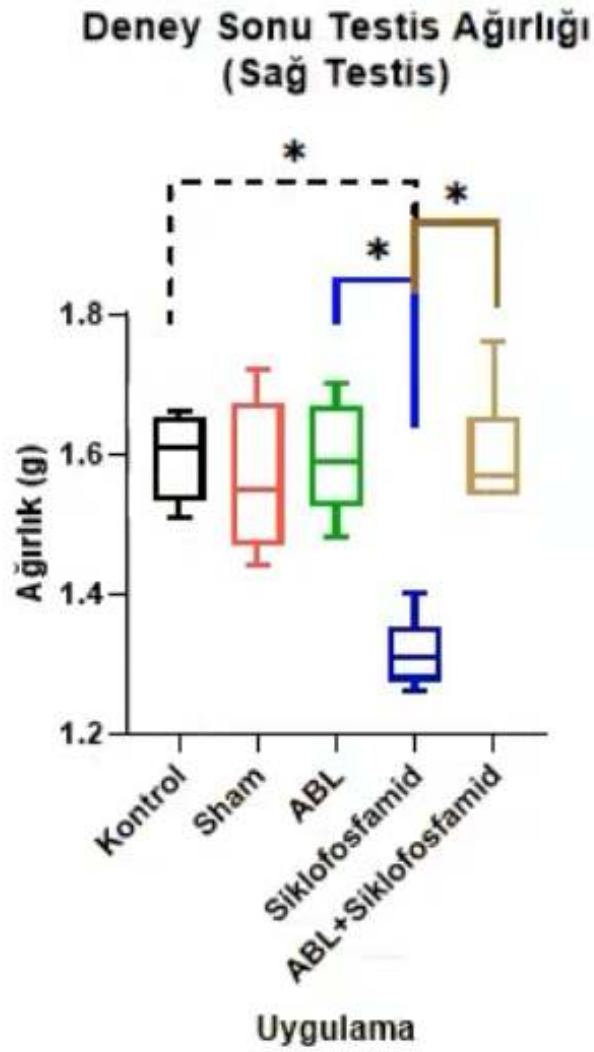
Şekil 15: 1. Gün ve 56. Gün Ağırlık Değişimleri

Hayvanların sağ testis ağırlıkları not edildi. 56. gün ortalama ağırlıklar; Kontrol grununda 1,54 gram, Sham grubunda 1,56 gram, ABL uygulaması grubunda 1,59 gram ve ABL+Siklofosfamid uygulaması grubunda ise 1,60 gram saptandı. Siklofosfamid uygulanan grupta ortalama testis ağırlığı 1,31 gram olarak saptandı. Özellikle siklofosfamid uygulaması grubundaki testiküler ağırlık düşüşü dikkat çekti. (**Tablo 10**)

Tablo 10: 56. Gün Sağ Testis Ağırlıkları

Testis (Gram)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Ortalama
Deney Sonu							
Kontrol	1,51	1,65	1,66	1,64	1,54	1,58	1,54
Sham	1,48	1,44	1,72	1,58	1,52	1,66	1,56
ABL	1,62	1,56	1,66	1,48	1,54	1,70	1,59
Siklofosfamid	1,26	1,32	1,40	1,34	1,30	1,28	1,31*
ABL+Siklofosfamid	1,76	1,54	1,62	1,56	1,58	1,54	1,60

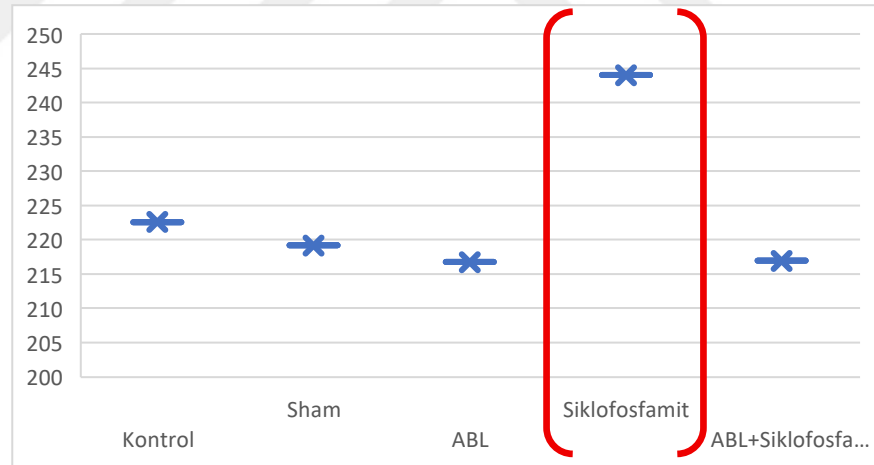
Testis ağırlıklarının normal dağılımı için Shapiro-Wilk ve Kalmogorov-Smirnov test uygulandı. Shapiro-Wilk testi negatif çıkması sonucu non-parametrik çoklu karşılaştırma testi olan Kruskal-Wallis test uygulandı. Kruskal-Wallis test sonucu ($p:0,0063$) +2 ve anlamlı olarak saptandı. Çoklu karşılaştırma testleri sonrasında Siklofosfamid grubu ile Kontrol grubu arasında fark +1 ($p:0,019$), Siklofosfamid ve ABL grubu arasında fark +1 ($p:0,0224$), Siklofosfamid ve ABL+Siklofosfamid grupları arası fark +1 ($p:0,0224$) ile anlamlı bulundu. (**Şekil 16**)



Şekil 16: 56. Gün Sağ Testis Ağırlıkları

Tablo 11: Testis/Total Ağırlık ve Testis İndeks

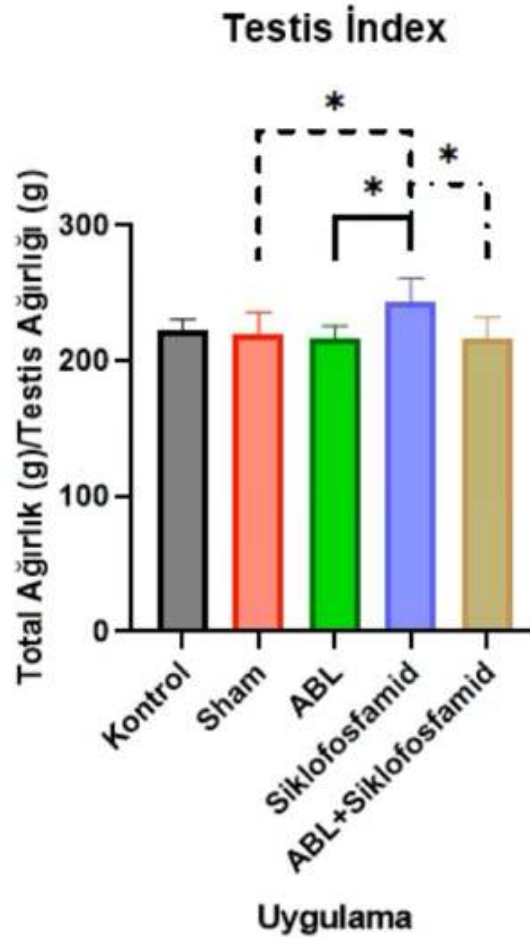
Testis/Total	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Ort.
Kontrol	0,0042	0,0045	0,0047	0,0044	0,0044	0,0045	0,0045
Sham	0,0040	0,0046	0,0048	0,0043	0,0046	0,0049	0,0045
ABL	0,0046	0,0048	0,0046	0,0042	0,0045	0,0046	0,0046
Siklofosfamid	0,0036	0,0040	0,0044	0,0040	0,0042	0,0042	0,0040*
ABL+Siklofosfamid	0,0048	0,0046	0,0046	0,0050	0,0044	0,0041	0,0046
Total /Testis (İndeks)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Ort.
Kontrol	235,0	221,2	210,8	222,5	227,2	218,3	222
Sham	246,6	215,2	206,3	231,0	213,8	201,8	219
ABL	212,9	205,1	216,8	233,1	217,5	214,7	216
Siklofosfamid	273,8	250	225	246,2	234,6	234,3	244*
ABL+Siklofosfamid	207,3	214,2	212,9	198,7	224,6	243,5	216

**Şekil 17:** Total Ağırlık/Testis Ağırlığı (Tİ)

Total Ağırlık/Testis Ağırlığı yani testiküler indeks hesaplandı ve veriler kaydedildi. (**Tablo 11 ve Şekil 17**) Bu değerler gruplar arası karşılaştırıldı. Gruplar arası normalite ve dağılım testleri yapıldı. Shapiro-Wilk test ve Kolmogorov-Smirnov testinden normal dağılımı olduğu tespit edildi. Varyans testleri sonucu da olumlu gelmesi sonucu parametrik tek yön çoklu karşılaştırma Anova testi yapıldı. Yapılan Anova testi sonucu; Sham grubu,

ABL grubu ve ABL+Siklofosfamid grupları ile Siklofosfamid grubu arasındaki fark anlamlı saptandı. (p:0,0109) Yapılan tek yön Anova testine göre Sham grubu ve Siklofosfamid grubu arasındaki fark +1 (p:0,037), ABL grubu ve Siklofosfamid grubu arasındaki fark +1 (p:0,0227), ABL+Siklofosfamid grubu ve Siklofosfamid grubu arasındaki fark +1 (p:0,0227) anlamlı olarak saptandı. (Şekil 18)

Testis indeksi olarak kontrol grubuyla herhangi bir grup arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Ancak ABL alan gruplar ile siklofosfamid alan grup arasındaki bu fark ABL uygulamasının testis ağırlığını bozmadığını gösterdi.



Şekil 18: Testis İndeks

4.2. Histokimya Bulguları

4.2.1. H&E Bulguları

Sıçanlardan alınan testis dokularında seminifer tübülleri ve tübülleri arasındaki bağ dokusu incelendiğinde en dışta kalın bir bağ dokusu yapısı olan tunika albuginea yapısı bulunur. Tunika albuginea yapısından sonra seminifer tübülleri oluşturduğu esas testiküler doku izlendi. Seminifer tübülleri arası bağ dokusu vardır. Bu bağ dokusunda Leydig hücreleri ve bu hücreleri içeren stroma yapısı bulunmaktadır. Seminifer tübülde Sertoli (destek) hücreleri ve spermatogenik hücreler bulunur. Spermatogenik hücreler sürekli bölünen ve çoğalan hücrelerdir. Olgun sperm hücrelerinin üretildiği yapılardır. Seminifer tübül bazal laminasında en immatür hücreler olan spermatogonyumlar bulunur. Sertoli hücre apikallerinde ise olgun spermatidler bulunurlar. Bu yapı incelenirken spermatogenik hücrelerin yoğunlukları, hücre çekirdekleri, hücre büyüklükleri, hücrelerin birbirleriyle kurduğu bağlantılar incelendi. Ayrıca Johnsen skorlama methodu ile her bir hayvandan alınan kesitlerden 50 adet transvers kesilmiş seminifer tübül incelendi ve sayısal değerler ortaya kondu.

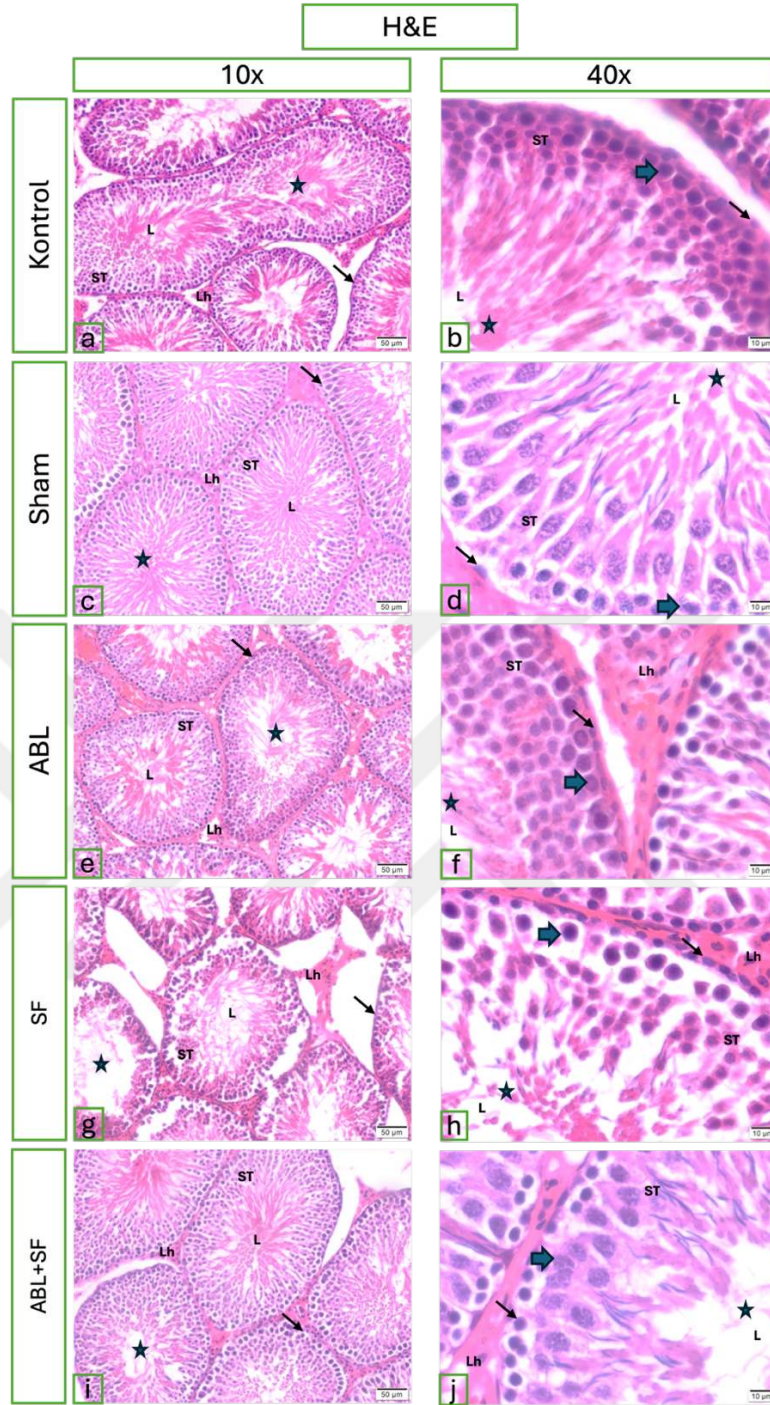
Sağlıklı(kontrol) grubu ve sham grubu H&E boyalı kesitlerin morfolojik incelemelerinde; testis dokusu ve çevre bağ dokusu doğal görünümündedir. En dışta güçlü bir bağ dokusu olan tunika albuginea izlendi. Bağ dokusu yapısı korunmuş ve tüm testisi çevrelemektedir. Bağ dokusunun iç kısmında ise hemen seminifer tübülleri bulunmaktadır. Seminifer tübülleri yuvarlak halka şeklinde veya daha uzun longitudinal olarak kesit alanlarına girdi. Her bir seminifer tübül bize bütün bir testis yapısı hakkında bilgi verir. Seminifer tübülleri arasında Leydig hücreleri ve stroma gözlemlendi. Stroma da bağ dokusu hücreleri gözlemlendi. Hücre yapıları seminifer tübülleri arasındaki bağ dokusunda oldukça sağlıklı görüldü. Leydig hücreleri çekirdekleri ve sitoplazmaları incelendi. Bu bağ dokusunda ödem veya kanama saptanmadı. Genel olarak tübülleri düzenli bir şekilde birbirlerine komşuluk yapıyordu. Tübülleri daha yakından baktığımızda ise 2 ana grup hücre görüldü. İlk olarak destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve esas hücreleri oluşturan spermatogenez seri hücreleri. Sertoli hücreleri diğer hüclere göre daha büyük ve düzensiz şekilleri küresel çekirdekleriyle ayırt edildi. Bu hücreler bazal laminadan tübül lümenine doğru uzanmaktaydı. Hücre çekirdekleri küresel,

hücre boyutları olağan ve hücreler arası boşluklar doğal olarak saptandı. Sertoli apikal uzantıları arasında olgun spermatozoalar saptanırken. Germinatif epitelin bazalinde spermatogonyumlar bulunmaktadır. Spermatogonyumlar kök hücrelerdir. Oldukça küçük hücreler olarak bazal membrana yerleşirler. Primer spermatositler ise daha büyük hücrelerdir. Bunlardan sonra seride sekonder spermatositler dikkat çekti. Primer spermatositlere göre daha küçük hücrelerdir. Sekonder spermatosit sonrası olgun olmayan spermatidler gözlenirken lümen ortasında olgun spermatozoalar saptandı. Sağlıklı kontrol grubunda bu spermatogenez serisi hücrelerinin katman sayıları 3-6 katman arasında gözlemlendi. Hücreler arası köprülerin bozulmadığı ve hücreler arası boşluğun oldukça az olduğu görüldü. Lümenler oldukça yoğun ve ortası olgun spermatozoalar ile doluydu. (**Şekil 19: a, b**)

Sham grubunda ve ABL uygulaması grubunda kontrol grubuna benzer morfolojik bulgular saptandı. (**Şekil 19: c, d, e, f**)

Siklofosfamid uygulanan grupta tübüllerde dejenerasyonlar saptandı. Tübül ortaları, yani lümenlerdeki spermatozoa sayısında azalma (oligospermi) gözlemlendi. Germinal epitele oturması gereken hücreler epitelden bir miktar kopmuş olarak (pul pul ayrılan tübül-eksfolyatif tübül) tespit edildi. Ayrıca hücreler arası boşluklar artmıştı. (Vakuolizasyon) Seminifer tübül atrofileri ve leydig hücre azalması saptandı. (Doku nekrozu) Seminifer tübül arası boşluklar da arttı. (Ödem bulgusu) Bu sıçanlarda germ hücrelerinde piknotik çekirdekler (koyu boyanma ve küçük görünümü) özellikle dikkat çekmiştir. Bağ dokusu yine benzer şekilde etkilenmiştir. Bağ dokusunda ödem saptanmıştır. Hücreler dejenere olmuştur. (**Şekil 19: g, h**)

ABL+Siklofosfamid alan grupta ise yer yer bozulmuş seminifer tübüller bulunsa da genel olarak seminifer tübüller sağlıklı göründü. Çoğu tübülde atrofi bulgusu yok denecek kadar azdı. Lümenlerde spermatozoa miktarı oldukça fazlaydı ve hücreler arası mesafeler korunmuştur. 10 tübülün 2-3 tanesinde görünüm ve yapı siklofosfamid grubuna benzer iken 7-8 tübül kontrol grubuna benziyordu. Tübüller arası ödem hafif miktarda bazı alanlarda saptandı. (**Şekil 19: i, j**)



Şekil 19: Rat Testis H&E boyaması (Transvers Kesit)

Kontrol, Sham, ABL (abaloparatid) ve ABL+SF (abaloparatit ve siklofosfamid) gruplarına ait tübül yapıları düzenli, tübül lümenleri spermatozoalardan zengin olduğu, spermatogenez serisine ait hücrelerin düzenli olduğu ve tübüller arası boşlukların az olduğu görülmektedir. SF grubunda ise lümenler düzensiz, spermatogenik seri hücreleri azalmış, bağ dokusu stroması ayrılmış olarak görülmektedir.

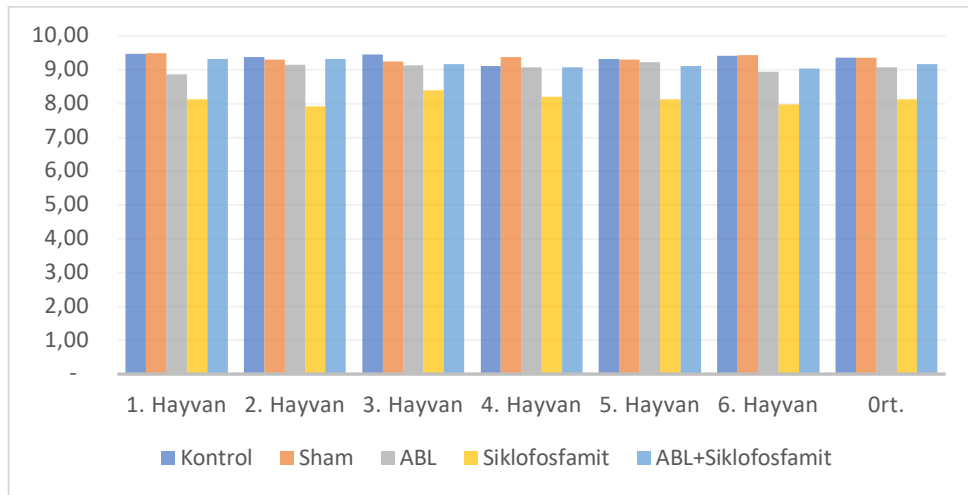
ST: Seminifer tübül, L: Lümen, Lh: Leydig Hücresi, Siyah Ok: Spermatogonyum, Yıldız: Olgun spermazoa, Kalın Ok: Primer Spermatid

Her bir hayvan için 50 farklı túbülde 400x büyütmede Johnsen skorlaması için sayım yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.

Kontrol grubunda 6 hayvanın Johnsen skor ortlaması 9,36 bulundu. Yine Sham grubunda da benzer değerler gözlemlendi ve 9,36 olarak kaydedildi. ABL grubunda 9,07 ortalama değeri ile ilk 2 gruba göre düşük bir değer saptanmıştır. Ancak siklofosfamid alan gruba göre daha iyi durumdadır. Siklofosfamid alan grup ise diğer gruplardan bariz bir şekilde düşük Johnson skoruna sahiptir. ABL+Siklofosfamid grubunda ise siklofosfamid grubuna göre bir miktar düzelme saptandı. (**Tablo 12 ve Şekil 20**)

Tablo 12: Johnsen Skorları

Johnsen skorları	1	2	3	4	5	6	Ort.
Kontrol	9,47	9,37	9,45	9,11	9,41	9,32	9,36
Sham	9,5	9,31	9,25	9,38	9,3	9,43	9,36
ABL	8,87	9,15	9,13	9,08	9,22	8,94	9,07
Siklofosfamid	8,13	7,91	8,4	8,21	8,12	7,97	8,12*
ABL+Siklofosfamid	9,33	9,32	9,16	9,08	9,11	9,03	9,17



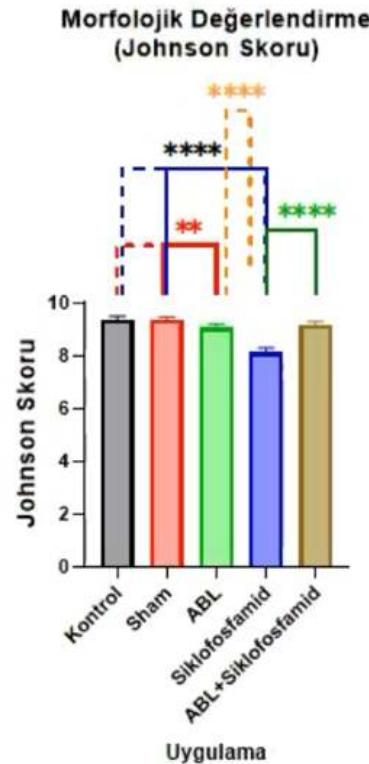
Şekil 20: Johnsen Skorları

Bu sonuçlarla Johnson skorlarını istatistiksel olarak kıyaslanmak için öncelikle grupların normal dağılımına ve varyans analizine bakıldı. Sırasıyla Shapiro-Wilk testi ve Kolmogorov-Smirnov testi ile dağılımlar normal saptandı.

Varyans analizi için Brown-Forsythe ve Barbett's test yapıldı. Varyans analizi de olumlu sonuçladı ve bu testler sonrası parametrik Anova Tukey's çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

Test sonucunda Kontrol grubu ile ABL uygulaması alan grup arasında Johnson skoru açısından +2 anlamlı fark vardır. ($p:0,0079$) Kontrol grubu ve Siklofosfamid uygulanan grup arasında oldukça yüksek +4 anlamlı fark saptandı. ($p<0,0001$) Sham grubu ile ABL grubu arasında +2 ($p:0,0064$) ve Sham grubu ile Siklofosfamid uygulanan grup arasında + 4 anlamlı fark saptandı. ($p<0,0001$) ABL grubu ve Siklofosfamid uygulanan grup arasında +4 ($P<0,0001$) ve ABL+Siklofosfamid grubu ve Siklofosfamid uygulanan grup arasında +4 ($p<0,0001$) anlamlı fark saptandı. (**Şekil 21**)

Yani tüm gruplarla fark saptanması nedeniyle siklofosfamid uygulaması Johnson skorunu düşürmektedir. ABL uygulaması ise bu düşüşten rat testislerini korumaktadır.



Şekil 21: Johnson Skorları Dağılımları

4.2.2. İmmünohistokimya Bulguları

Boyanma yüzdeleri İmage J programı kullanılarak elde edildi. Her bir hayvan için 20 adet seminifer tübül aynı büyütmelemlerde değerlendirilerek kaydedildi.

4.2.2.1. CREB

Primer CREB antikoru ile immunohistokimya boyaması incelemelerinde Kontrol grubunda anti CREB boyanma yüzde miktarı Sham grubu ve ABL+Siklofosfamid grubuna benzer ve ortalama boyanma skoru +2, +3 yoğunlukta tespit edildi. (**Şekil 23: Kontrol, Sham, ABL+SF**)

ABL uygulanan grupta anti CREB antikoru boyanma yüzde miktarı oldukça yüksek olduğu ve boyanma skoru +3, +4 olarak tespit edildi. (**Şekil 23: ABL**)

Siklofosfamid alan grupta ise anti CREB boyanma miktarı azaldı. Toplam boyanmış hücre yoğunluğu da benzer şekilde düştü. (**Şekil 23: SF**)

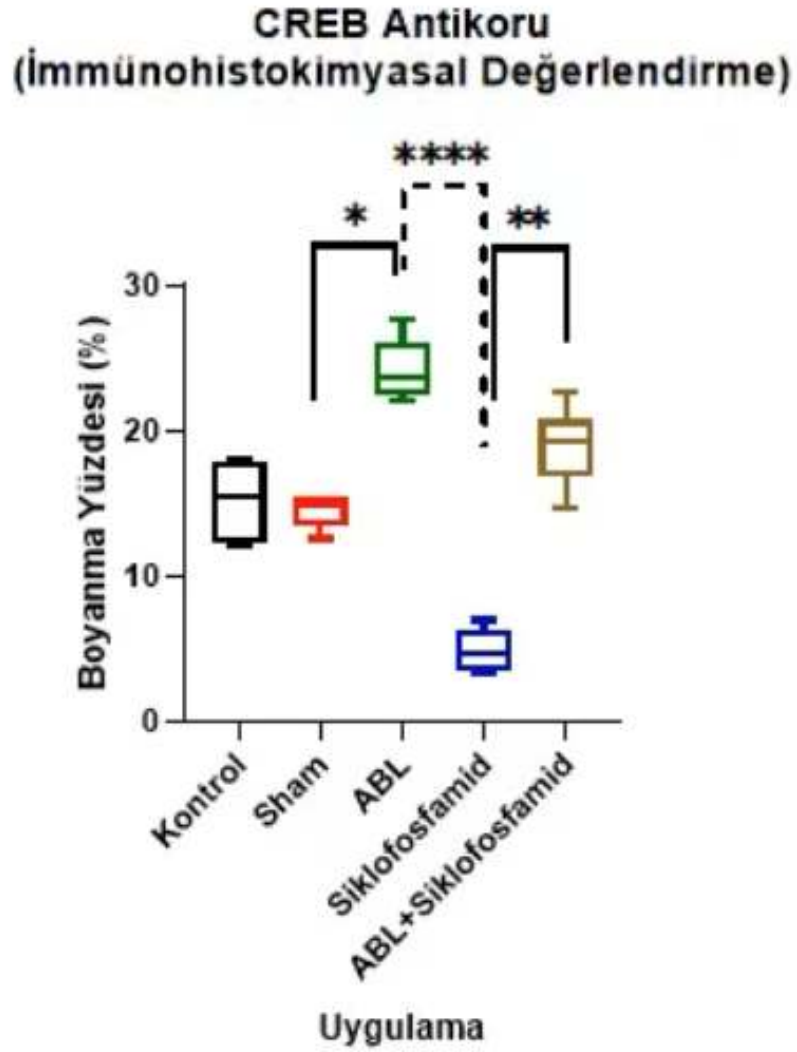
Anti CREB boyanma miktarının ABL+Siklofosfamid grubunda Kontrol ve Sham grubuna yakın gelmesi ve Siklofosfamid grubuna göre artışı abaloparatid isimli ilacın siklofosfamidin zararlı etkilerinden CREB aracılı koruyabileceğini ortaya koydu.

Genel olarak da CREB antikoru sertoli hücrelerinde ve primer spermatositlerde oldukça yoğun boyanma gösterdi. Sekonder spermatositlerde ve spermatozoada ise boyanma daha azdır. (**Şekil 23**)

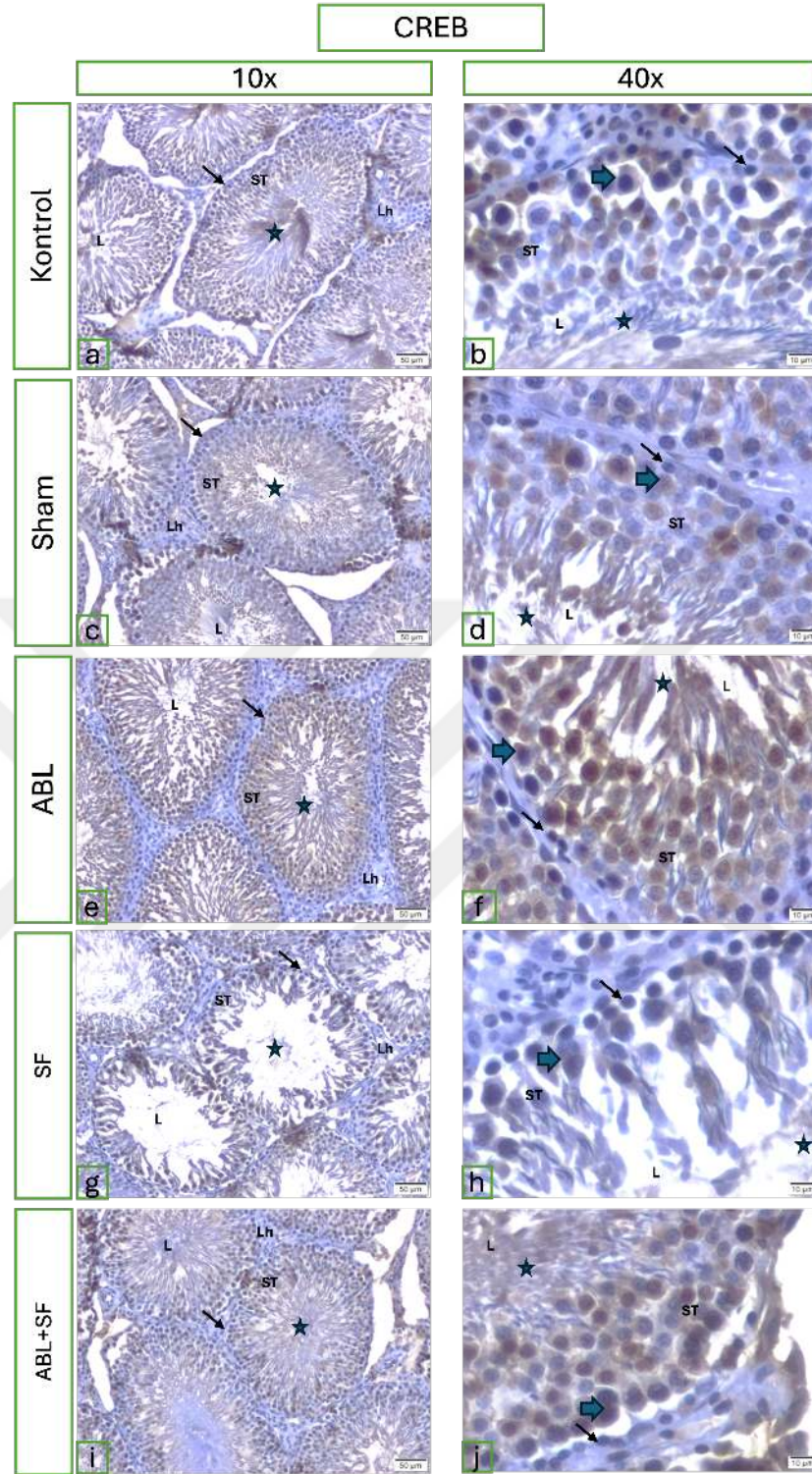
CREB antikoru ile boyanma yüzdeleri saptandı ve kaydedildi. Gruplar arası normal dağılım ve varyans analizleri yapıldı. Shapiro-Wilk testinden negatif sonuç alması nedeniyle dağılım testini geçemedi ve non-parametrik test uygulandı. Kruskal-Wallis testi yapıldı. Bu test $p < 0,0001$ +4**** anlamlı bulundu.

Kruskal-Wallis çoklu karşılaştırma testi sonrası Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Bu test sonucunda Sham grubu ile ABL uygulanan grup arasında +1 ($p:0,048$ sınırda), ABL grubu ve Siklofosfamid uygulanan grup arasında +4 ($p < 0,0001$) ve ABL+Siklofosfamid grubu ile Siklofosfamid uygulanan grup arasında +2 ($p:0,0093$) CREB antikoru ile boyanma yüzdesi olarak anlamlı fark saptandı. (**Şekil 22**)

Sonuçta ABL uygulaması Anti CREB boyanma yüzdesini arttırdı ve Siklofosfamid uygulaması Anti CREB boyanma yüzdesini azalttı. ABL'nin Sham grubuna göre fazla boyanması da CREB'i ABL'nin stimüle ettirdiğini ortaya koydu.



Şekil 22: Anti CREB İmmünohistokimyası Boyanma Yüzdesi



Şekil 23: Anti CREB İmmunohistokimyası

Kontrol grubu a, b, Sham grubu c, d, ABL grubu e, f, SF grubu g, h, ABL+SF grubu i, j rat testis transvers kesitleri (Scale bar:50 ve10 µm) ST: Seminifer tübül, L: Lümen, Lh: Leydig Hücresi, Siyah Ok: Spermatogonyum, Yıldız: Olgun spermazoa, Kalın Ok: Primer Spermatid

4.2.2.2 PCNA

Primer PCNA antikoru ile immunohistokimya incelemelerinde Kontrol grubunda anti PCNA boyanma miktarı Sham grubu, ABL grubu ve ABL+Siklofosfamid grubuna benzer çıktı. Boyanma yoğunluğu +2, +3 yoğunlukta saptandı. (**Şekil 25: Kontrol, Sham, ABL, ABL+SF**)

Siklofosfamid alan grupta ise anti PCNA boyanma miktarı azaldı. Toplam boyanmış hücre yoğunluğu da benzer şekilde düştü. Yer yer +1 yoğunlukta boyanma saptandı. (**Şekil 25: SF**)

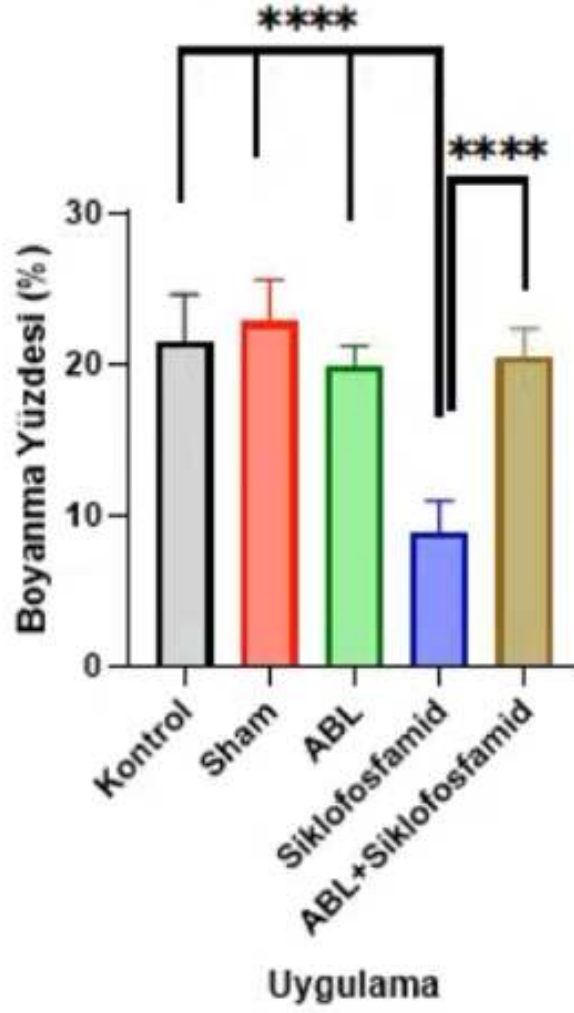
Siklofosfamid hücre çoğalmasını önleyen bir antikanser ilacı olması sebebiyle bu sonuçlar; anti PCNA boyanma düşüşü, çalışmamızda net bir şekilde ortaya kondu.

PCNA antikoru yapılan immunohistokimyasal boyanma yüzdeleri saptandı ve kaydedildi. Gruplar arası dağılımın normal olup olmadığı ve varyans analizleri yapıldı. Shapiro-Wilk testi ve Kolmogorov testi uygulandı. Dağılım normal çıktı. Varyans testleri uygulandı ve yine olumlu sonuç alındı. (Bartlett's test ve Brown-Forsythe test uygulandı) Bütün bu testlerin sonucunda parametrik test uygun bulundu. Tek yön Anova test +4 ($p<0,0001$ -çok güçlü) anlamlı bulundu. Daha sonra bir ileri test olan çoklu karşılaştırma Tukey's testi yapıldı.

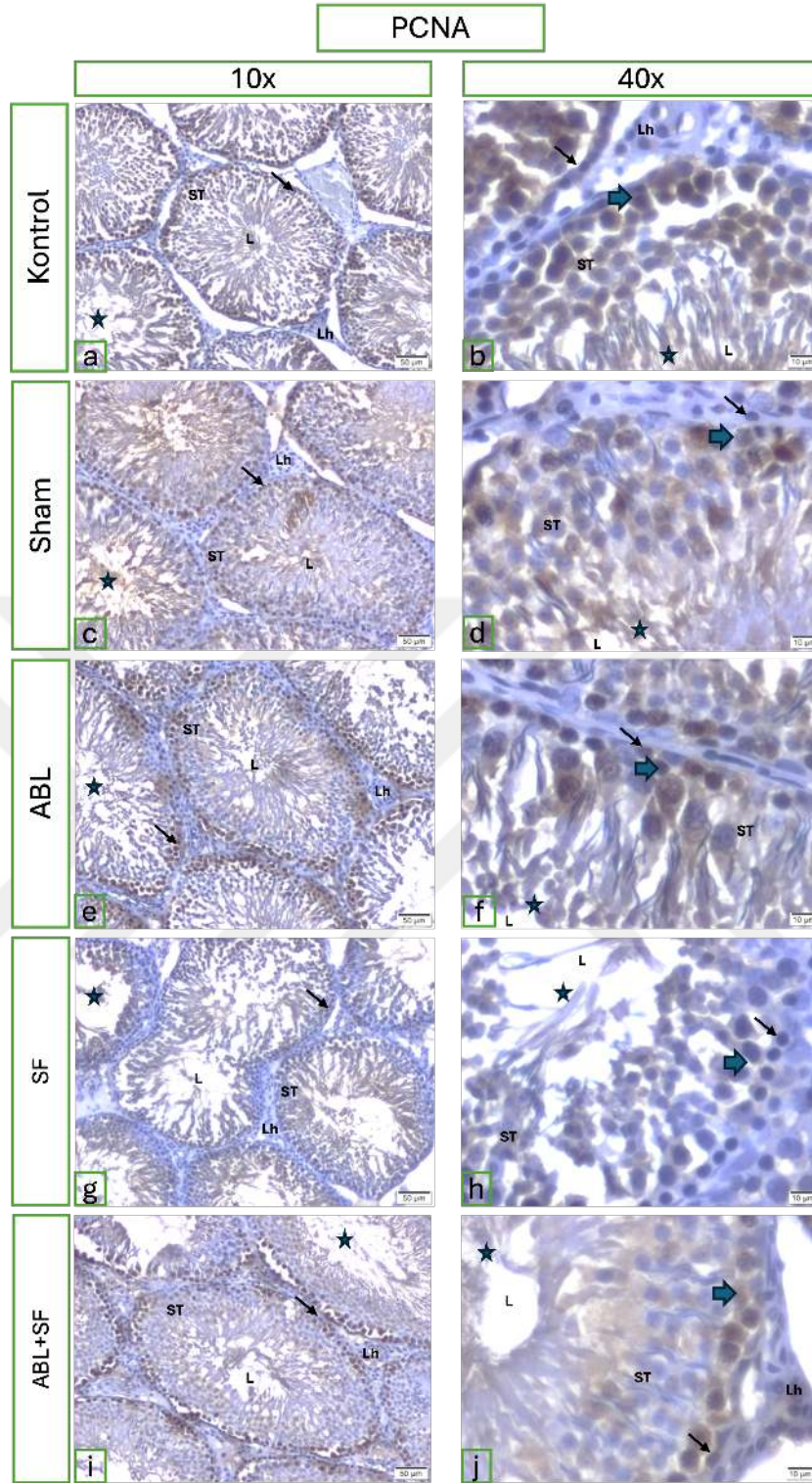
Tukey's testine göre Kontrol grubu, Sham grubu, ABL grubu ve ABL+Siklofosfamid grubu (yani tüm gruplarda) ile Siklofosfamid grubu kıyaslandığında, anti PCNA boyanma yüzdeleri arasında +4 ($p<0,0001$) gibi oldukça güçlü ve anlamlı bir fark vardı. (**Şekil 24**)

Bu sonuçlar siklofosfamid uygulamasının proliferasyonu bozduğunu gösterdi. Abaloparatid uygulamasının ise tek başına anti PCNA'yı negatif yönde etkilemediği, aksine ABL+SF alan grupta siklofosfamidin anti PCNA boyanmasına olan negatif etkisinden koruduğunu açıkça ortaya koymuştur.

**PCNA Antikoru
(İmmünohistokimyasal Değerlendirme)**



Şekil 24: Anti PCNA İmmunohistokimyası Boyanma Yüzdesi



Şekil 25: Anti PCNA İmmunohistokimyası

Kontrol grubu a, b, Sham grubu c, d, ABL grubu e, f, SF grubu g, h, ABL+SF grubu i, j rat testis transvers kesitleri (Scale bar:50 ve10 µm) ST: Seminifer tübül, L: Lümen, Lh: Leydig Hücresi, Siyah Ok: Spermatogonyum, Yıldız: Olgun spermazoa, Kalın Ok: Primer Spermatid

4.2.2.3. HSPA4

Primer HSPA4 antikoru ile immunohistokimya incelemelerinde Kontrol grubunda anti HSPA4 boyanma miktarı Sham grubu, ABL grubu ve ABL+Siklofosfamid grubuna benzer çıktı ve +3 yoğunlukta saptandı. (**Şekil 27: Kontrol, Sham, ABL, ABL+SF**)

Siklofosfamid alan grupta ise anti HSPA4 boyanma yüzdesi miktarı azaldı. Bu grupta yer yer +1 yoğunlukta boyanmalar gözlemlendi. (**Şekil 27: SF**)

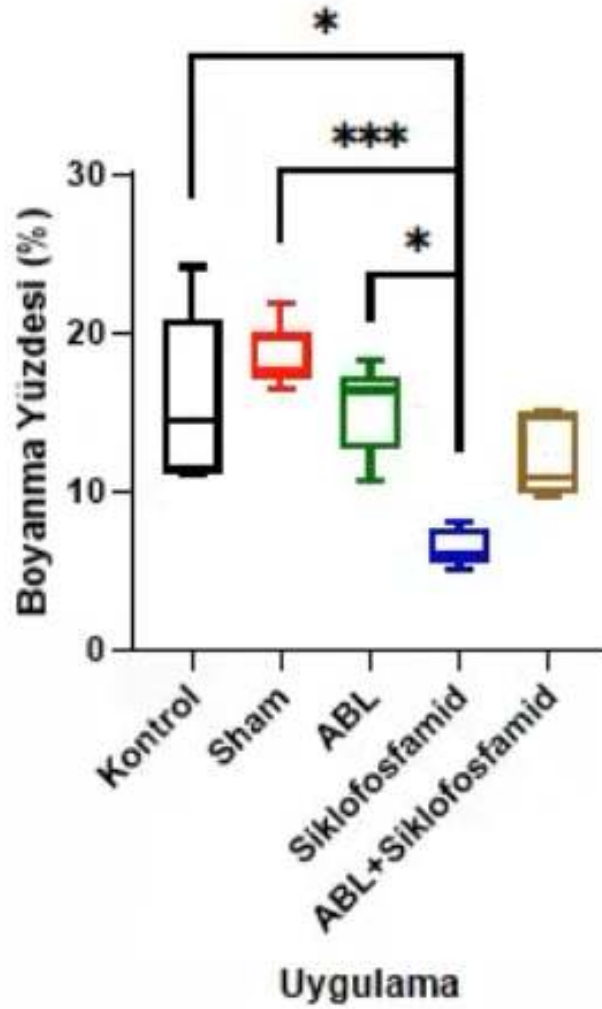
ABL+Siklofosfamid grubundaki boyanma yüzdesinin kontrol grubuna yakın olması ve siklofosfamid grubuna göre bu proteinin sentezinin fazla olması abaloparatid isimli ilacın siklofosfamidin zararlı etkilerinden koruduğunu HSPA4 aracılığı olarak gösterdi.

HSPA4 antikoru ile immunohistokimyasal boyanma yüzdeleri saptandı ve kaydedildi. Gruplar arası dağılım ve varyans analizleri yapıldı. Shapiro-Wilk testi ve Kolmogorov testi uygulandı. Gruplarda elde edilen değerlerin dağılımı normal çıktı. Varyans testleri uygulandı ancak Brown-Forsythe testi sonucu olumsuz çıktı. Bunun üzerine non parametrik test uygun bulundu. Kruskal-Wallis testi yapıldı. Kruskal-Wallis test +3 (p:0,0004) anlamlı çıktı. Daha sonra bir ileri test olan çoklu karşılaştırma Dunn's testi yapıldı.

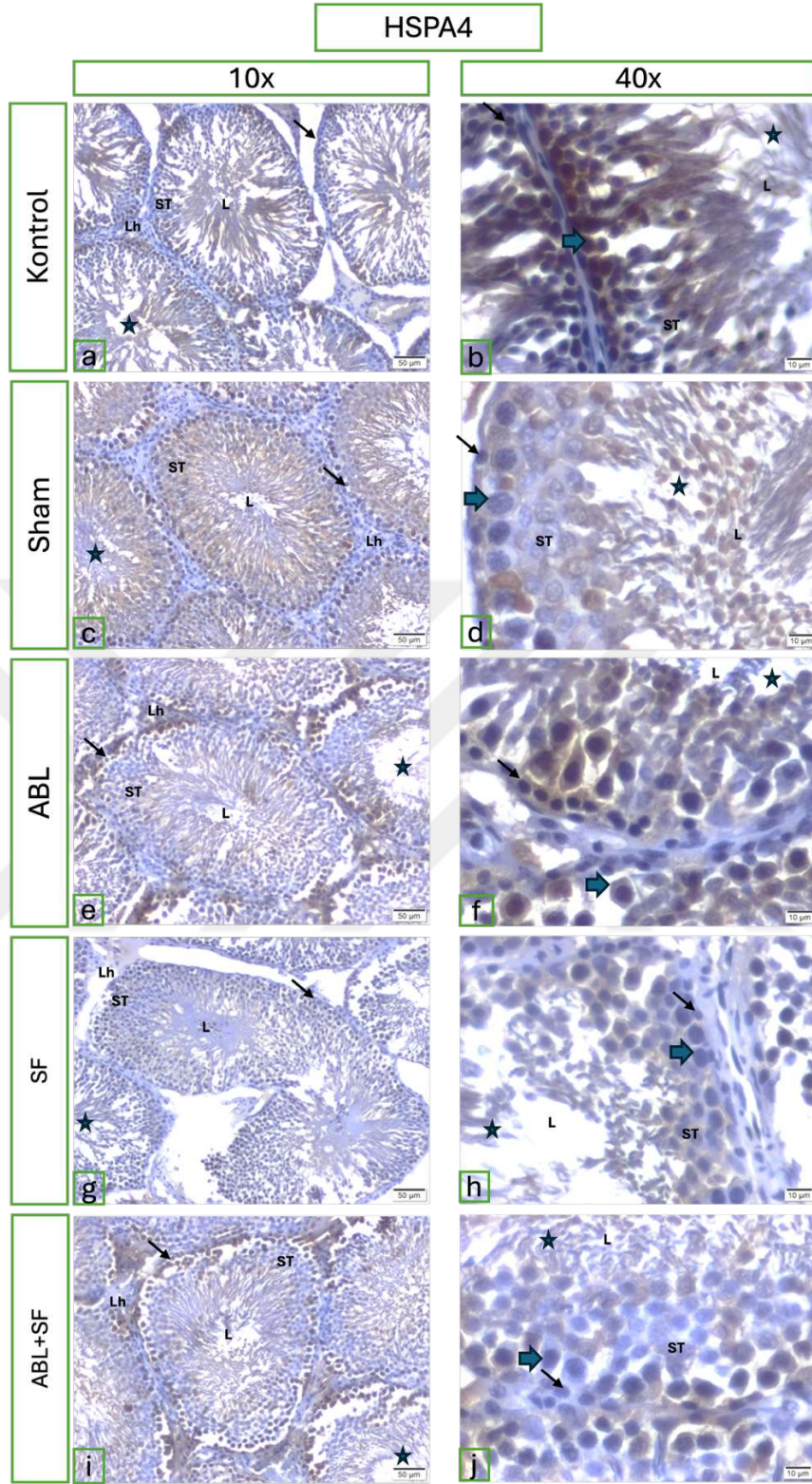
Dunn's teste göre Kontrol grubu ile Siklofosfamid grubu kıyaslandığında anti HSPA4 boyanma yüzdesi farkı +1 (p:0,022) anlamlı saptandı. ABL grubu ile Siklofosfamid grubu kıyaslandığında anti HSPA4 boyanma yüzdesi farkı +1 (p:0,028) anlamlı saptandı. Son olarak Sham grubu ve Siklofosfamid grubu kıyaslandığında anti HSPA4 boyanma yüzdesi farkı +3 (p:0,0003) anlamlı olarak saptandı. (**Şekil 26**)

Sonuç olarak siklofosfamid uygulaması diğer gruplar göre (ABL+SF Grubu hariç) anti HSPA4 boyanma miktarını düşürmüştür.

HSPA-4 Antikoru (İmmünohistokimyasal Değerlendirme)



Şekil 26: Anti HSPA4 İmmunohistokimyası Boyanma Yüzdesi



Şekil 27: Anti HSPA4 İmmunohistokimyası

Kontrol grubu a, b, Sham grubu c, d, ABL grubu e, f, SF grubu g, h, ABL+SF grubu i, j rat testis transvers kesitleri (Scale bar:50 ve10 µm) ST: Seminifer tübül, L: Lümen, Lh: Leydig Hücresi, Siyah Ok: Spermatogonyum, Yıldız: Olgun spermazoa, Kalın Ok: Primer Spermatid

4.2.2.4. REC8

Primer REC8 antikoru ile immunohistokimya incelemelerinde Kontrol grubunda anti REC8 boyanma miktarı Sham grubu, ABL grubu ve ABL+Siklofosfamid grubuna benzer çıktı ve +2, +3 yoğunlukta saptandı. (**Şekil 29: Kontrol, Sham, ABL, ABL+SF**)

Siklofosfamid alan grupta ise anti REC8 boyanma miktarı düşük tespit edildi. (+1 düzeyinde) Toplam boyanmış hücre yoğunluğunun da benzer şekilde azaldığı gözlemlendi. (**Şekil 29: SF**)

Bu çalışmada siklofosfamidin hücre çoğalmasını önleyen bir antikanser ilacı olması sebebiyle REC8'i azalttığı tespit edildi.

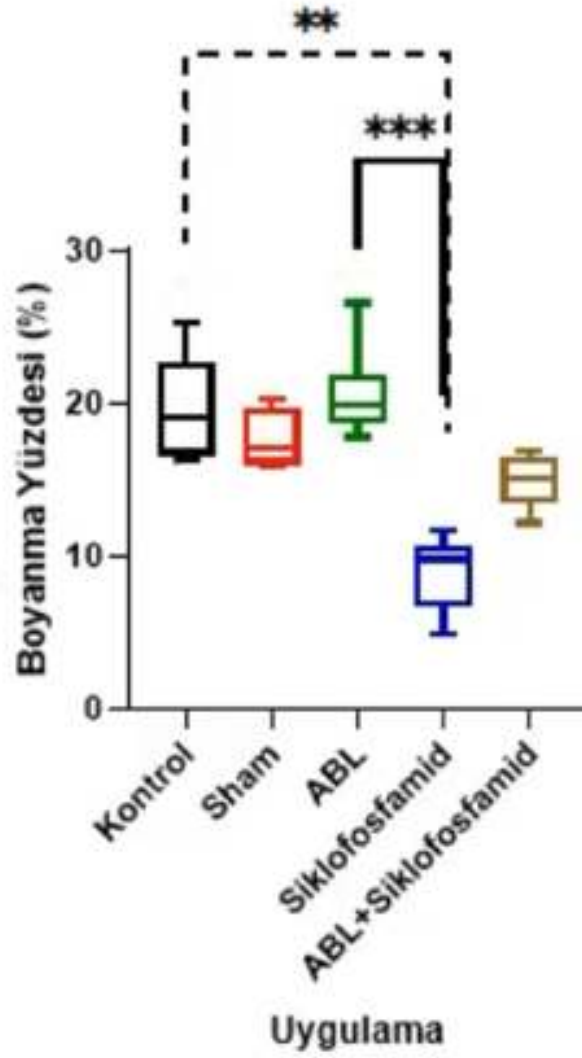
Hücre çoğalması (özellikle spertamogonyumlarda) ilişkili bu proteinin miktarında, ABL+Siklofosfamid grubunda Kontrol grubuna yakın olması ve Siklofosfamid grubuna göre bu proteinin sentezinin artışı abaloparatid isimli ilacın siklofosfamidin zararlı etkilerinden REC8 proteini aracılı koruyabileceğini düşündürdü.

REC8 antikoru ile boyanma yüzdeleri saptandı ve kaydedildi. Gruplar arası dağılım ve varyans analizleri yapıldı. Hem Shapiro-Wilk testi hem de Kolmogorov-Smirnov test negatif sonuç alması nedeniyle non-parametrik test uygulandı. Kruskal-Wallis test yapıldı. Bu testin sonucunda +3 ($p<0,0003$) anlamlı fark bulundu.

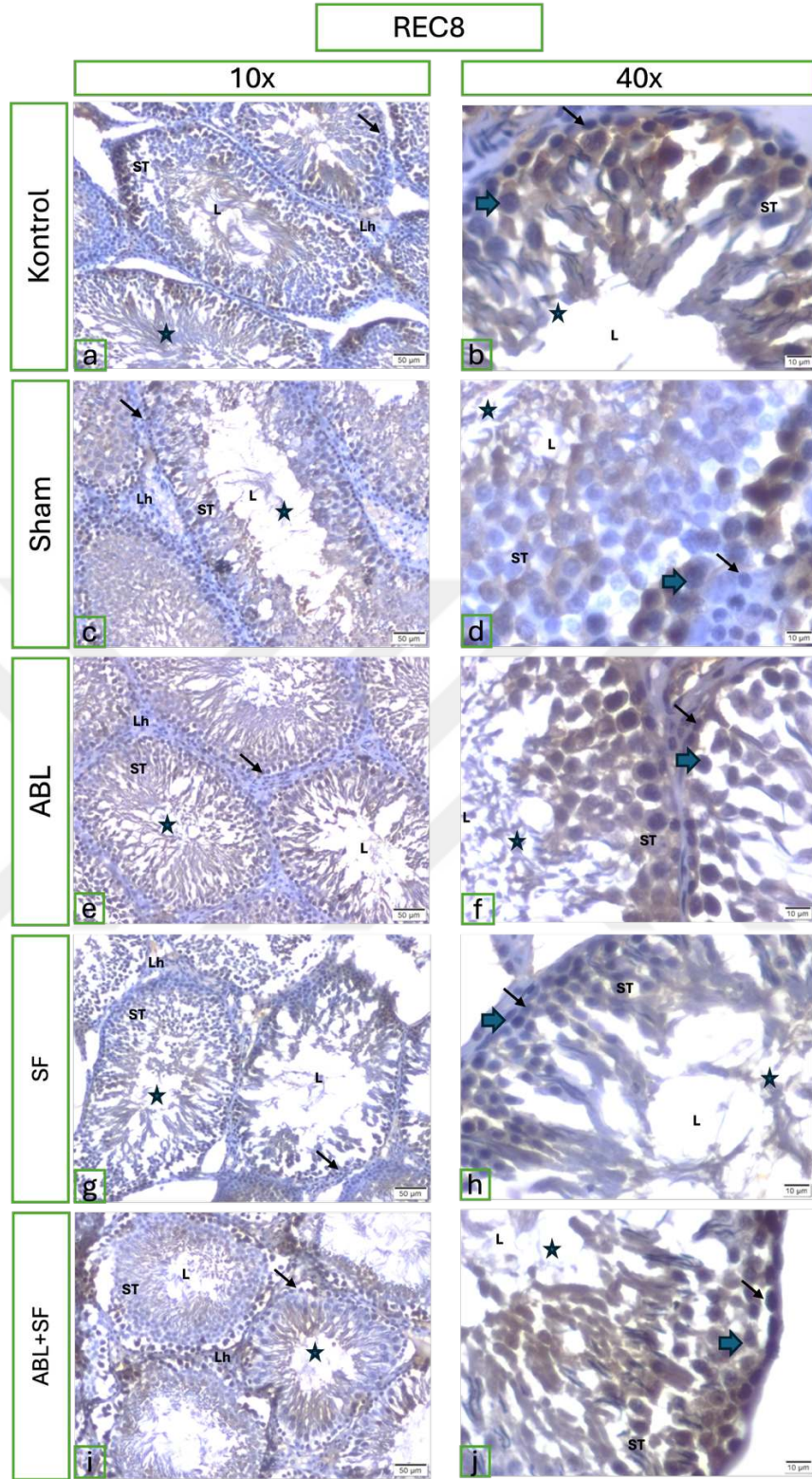
Kruskal-Wallis çoklu karşılaştırma testi sonrası bir ileri test olan Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Bu test sonucunda Kontrol grubu ile Siklofosfamid uygulanan grup arasında +2 ($p:0,0031$) anlamlı fark çıkarken, ABL grubu ile Siklofosfamid uygulanan grup arasında +3 ($p:0,0007$) REC8 antikoru ile boyanma yüzdesi olarak güçlü anlamlı fark saptandı. (**Şekil 28**)

Sonuçta siklofosfamid anti REC8 boyanma yüzdesini kontrol grubuna ve ABL grubuna göre azaltmıştır. ABL+SF grubunda siklofosfamid grubuna kıyasla boyanma yüzdesi artmış olsa da istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.

Rec-8 Antikoru
(İmmünohistokimyasal Değerlendirme)



Şekil 28: Anti REC8 İmmunohistokimyası Boyanma Yüzdesi



Şekil 29: Anti REC8 İmmunohistokimyası

Kontrol grubu a, b, Sham grubu c, d, ABL grubu e, f, SF grubu g, h, ABL+SF grubu i, j rat testis transvers kesitleri (Scale bar:50 ve10 µm) ST: Seminifer tübül, L: Lümen, Lh: Leydig Hücresi, Siyah Ok: Spermatogonyum, Yıldız: Olgun spermazoa, Kalın Ok: Primer Spermatid

4.2.2.5. GAPDH

Bu antikor hem immünohistokimya kontrol antikoruna hem de Western Blot'ta yükleme kontrol antikoruna olarak kullanıldı. Protein seviyelerinin normalleştirilmesi fonksiyonu gördü.

4.3. Western Blot Bulguları

Bu yöntemle 3 grup arasında karşılaştırma yapıldı. Her grup için 3 hayvan seçildi. Seçim random yapıldı.

Grup 1 Kontrol grubudur. Kırmızı renkte gösterildi. Grup 2 Siklofosfamid uygulaması alan gruptur. Grup 2 yeşil renkte gösterildi. Grup 3 Abaloparatid+Siklofosfamid uygulamasını birlikte alan gruptur. Grup 3 mavi renkte gösterildi.

Grupların ilk olarak GAPDH antikoruna ile Western blot yöntemiyle ışımaları tespit edildi. Bu ışımaların miktarlarının Image J ile ölçümleri yapıldı. Daha sonra diğer antikorlara ait ölçümler bu ölçümler ile normalize edildi. (**Şekil 30**)



Şekil 30: GAPDH (housekeeping) antikoruna UVP görüntüleme sonucu

CREB antikoruna Western Blot yöntemi sonucunda:

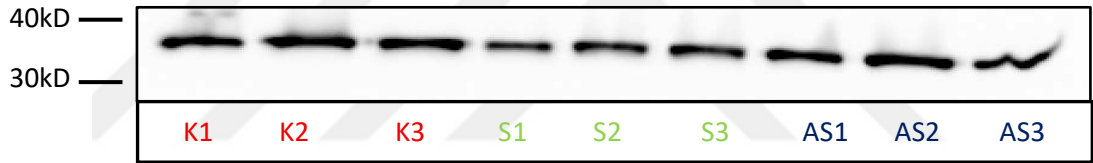
Grup 1 (Kontrol) 'in en yüksek düzeyde eksprese edildiği, Siklofosfamid grubunun yani Grup 2' nin ekspresyonunun azaldığı ve Grup 3' ün (ABL+Siklofosfamid) Grup 1'e göre ekspresyonu daha az olsa da Grup 2'ye nazaran ekspresyon miktarı oldukça fazla tespit edilmiştir. CREB'in bu değişimi, ABL uygulamasının, CREB aktivasyonunu arttırdığını, siklofosfamid uygulamasının CREB aktivasyonunu azalttığını ortaya koymuştur. (**Şekil 31**)



Şekil 31: CREB antikoruna UVP görüntüleme

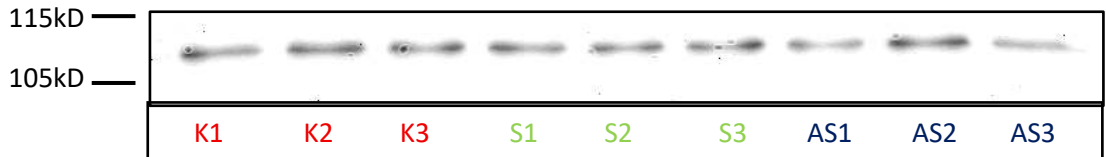
PCNA antikoruna Western Blot yöntemi sonucunda:

Grup 1 (kontrol) 'in en yüksek düzeyde eksprese edildiği, siklofosfamid grubunun yani Grup 2' nin ekspresyonunun azaldığı ve Grup 3' ün (ABL+Siklofosfamid) Grup 1'e göre ekspresyonu daha az olsa da Grup 2'ye nazaran ekspresyon miktarı artmıştır. PCNA'nın bu değişimi, ABL uygulamasının, spermatogenik serideki hücrelerin proliferasyona karşı siklofosfamidin kötü etkisinden bir miktar koruduğunu ortaya koydu. (**Şekil 32**)



Şekil 32: PCNA antikoruna UVP görüntüleme

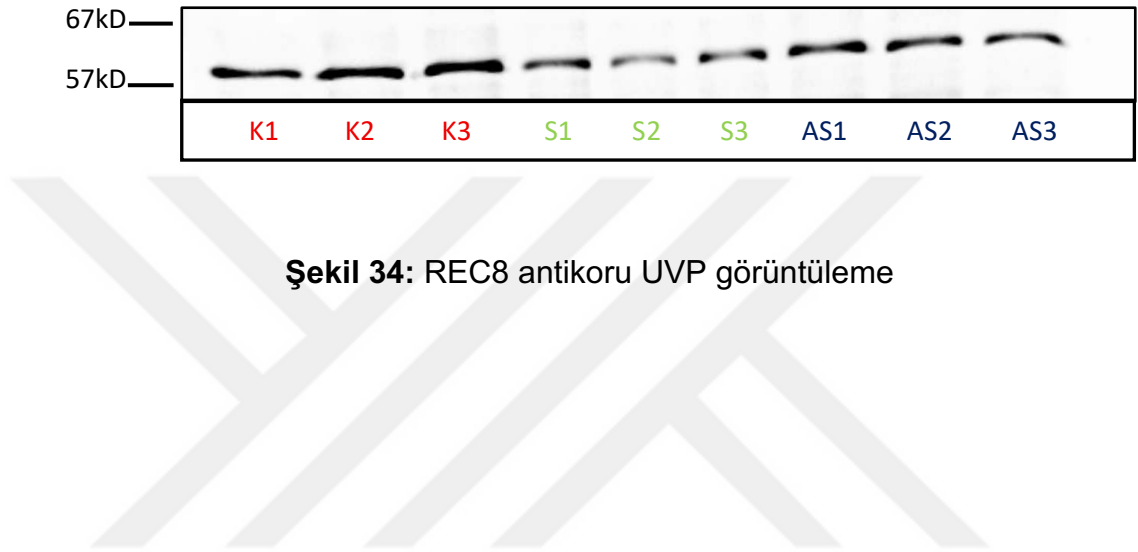
HSPA4 antikoruna incelemesinde Grup 1'in Grup 2 ve 3'e göre daha fazla eksprese edildiği, Grup 2'nin ise Grup 3'ten bir miktar daha az olduğu saptandı. (GAPDH ile oranlanınca) ABL uygulaması HSPA4 ekspresyon miktarını bir miktar korumuştur ve siklofosfamid uygulaması HSPA4'ü azaltmıştır. (**Şekil 33**)



Şekil 33: HSPA4 antikoruna UVP görüntüleme

REC8 antikoruna Western Blot yöntemi sonucunda:

Grup 1 (kontrol) 'in en yüksek düzeyde eksprese edildiği, siklofosfamid grubunun yani Grup 2' nin ekspresyonunun azaldığı ve Grup 3' ün (ABL+Siklofosfamid) Grup 1'e göre ekspresyonu daha az olsa da Grup 2'ye nazaran ekspresyon miktarı arttı. REC8' in bu değişimi ABL uygulamasının spermatogenik hücrelerin mayoz aktivitesini, siklofosfamidin kötü etkisinden koruduğunu ortaya koydu. (**şekil 34**)



şekil 34: REC8 antikoruna UVP görüntüleme

5. TARTIŞMA

Kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılan siklofosfamidin, germ hücrelerini bozarak infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda, uygulanan kanser tedavilerin başarılı olması nedeni ile özellikle çocukluk çağı kanserlerinde siklofosfamid uygulaması, genç erişkin dönemde infertiliteye neden olmaktadır. Siklofosfamidin germ hücreleri üzerine olan zararlı etkilerinin bilinmesi ve önlenmesi önemli bir problemin ortadan kaldırılmasını sağlayacaktır. Bu çalışmada, erkek farelerden alınan testis örneklerinde PTH1R aktivatörü olan abaloparatidin, siklofosfamidin oluşturduğu testis hasarından korumasındaki rolü; CREB, PCNA, REC8 ve HSPA4 primer antikoları kullanılarak immünohistokimyasal ve Western-Blot yöntemleri ile incelendi.

Bu çalışmada parafin takibi sonrası H&E boyalı rat testis kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, kontrol ve sham grubunda testis morfolojisinin korunduğu gözlemlendi. Siklofosfamid uygulanan grupta ise spermatogeneze ait hücrelerin sayısının azaldığı, hücreler arası boşlukların arttığı tespit edildi. Testisin morfolojik olarak spermatogenezi değerlendirmekte kullanılan Johnsen skorları, kontrol grubunda ortalama 9,36 iken, siklofosfamid grubunda anlamlı olarak düştüğü ve ortalama 8,12 olarak tespti edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda da siklofosfamid uygulanan fare ve sıçanlarda Johnsen skorlarının düşük olduğu gösterilmiştir (95,96). Testisin en hassas hücrelerinin farklılaşan spermatogonyalar ve erken dönem spermatidler olduğu, (33) siklofosfamidin DNA çapraz bağları, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu gibi hücresel süreçleri kritik şekilde bozarak hızla bölünen hücrelerde apoptozu (programlanmış hücre ölümü) tetiklediği göz önüne alındığında, siklofosfamid uygulanan farelerin seminiferöz tübüllerdeki hücre kayıplarının ortaya çıkmasında apoptozisin rol oynadığı düşünüldü (30,32).

Abaloparatid, osteoporoz tedavisi için geliştirilen insan paratiroid hormon-ilışkili proteinin (PTHrP) (1-34) araştırma analogudur ve PTH1R'nin epididim ve testiste eksprese edildiği hem testiste hem de epididimde Kabakulak virüsü veya Lipopolisakkarit kaynaklı enflamatuvar yanıtları hafiflettiği ve hem fare modelinde hem de insan örneklerinde sperm fonksiyonlarını önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (6). Bu çalışmada, ABL uygulanan ratların seminiferöz tübül morfolojik özellikleri kontrol grubu ile

benzer özellikle benzer olduğu; lümenlerin düzenli olduğu, hücre yapılarının korunduğu, kan testis bariyerinin bozulmadığı tespit edildi. ABL+Siklofosfamid uygulanan grubunda morfoloji kontrol grubuna göre bozulmuş olsa da siklofosfamid grubuna göre oldukça iyi korunduğu tespit edildi. Hem ABL alan grupta (Johnsen skoru 9,07), hemde ABL + Siklofosfamidi birlikte alan grupta (Johnsen skoru 9,17) kontrol grubuna benzer (Johnsen skoru 9,36) sonuçlar elde edildi, buna karşılık siklofosfamid grubundan (Johnsen skoru 8,12) anlamlı derecede düşük bulundu. Parathormon reseptörünün aktivasyonun cAMP-PKA-CREB üzerinden hayatta kalma genlerini uyardığı ve antiapoptotik etkili olduğu bildirilmiştir (57). Abaloparatidin siklofosfamidin zararlı etkilerinden anti inflamatuvar ve anti apoptotik yolları aktive ederek koruduğu ileri sürülebilir.

CREB'in hücrelerin çoğalması, hayatta kalması, farklılaşması ve adaptif yanıtlar vermesi gibi çok çeşitli hücresel süreçleri yönetiğı bilinmektedir. Bu çalışmada CREB primer antikor ile testis dokusunda yapılan immunohistokimyal ve Western-Blot incelemelerinde kontrol grubunda CREB immunorektivitesinin yüksek olduğunu tespit edildi ve spermatogenezis patogenezinde önemli rol oynadığı düşünüldü. CREB'in germ hücrelerinin hayatta kalması için kritik öneme sahip Sertoli hücre tarafından üretildiğı, (11) eksikliğinde kan testis bariyerinin ve spermatogenezin bozulduğu gösterilmiştir (53). CREB'in FSH/LH hormonlarının dalgalanmaları sırasında spermatogenez evrelerinde dinamik ekspresyon gösteren transkripsiyon faktörü olduğu, (54) alternatif ekzon kullanımına bağılı olarak çeşitli izoformlar ürettiğı ve bu izoformların erken spermatogenezden post-mayotik olgun spermatidlere kadar gen ekspresyonunu düzenlediğı, (50) ERK ve p38 MAPK sinyal yolları tarafından aktive ederek spermatogenez sırasında testis gelişimine katkı sağladığı (53) göz önüne alındığında; CREB immunorektivitesinin yüksek olmasının spermatogenesis patogenezinde önemli rol oynadığının bir göstergesi olarak değerlendirildi.

Siklofosfamid, sürekli mitotik aktivitesi olan, hızla bölünen hücrelerde apoptozu indükleyen bir alkilleyici ajandır ve aktif olarak bölünen, diferansiye germ hücrelerine seçici toksisitesi ile kök spermatogonya popülasyonunun bir kısmını koruduğunu, spermatogenik duraklamanın ve ardından oligospermi veya azosperminin karakteristik paterninin ortaya çıkmasına neden olduğu ileri

sürülmektedir. Siklofosfamidin DNA çapraz bağları, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu gibi hücresel süreçleri kritik şekilde bozduğu ve germ hücre proliferasyonunun inhibe ettiği, germ hücre apoptozu arttırdığı, olgunlaşmasını duraklatığı (örn. pakiten spermatositler), sperm sayısını azalttığı (oligospermi/azospermi), sperm motilitesi/morfolojisini bozduğu, spermde DNA hasarı oluşturduğu bilinmektedir (30). Bu çalışmada siklofosfamid verilen farelerde CREB immunoreaktivitesinin hem immunohistokimyasal hemde Western Blot tekniği ile incelendiğinde kontrol grubuna göre azalmış olduğu tespit edildi ve CREB aktivesindeki azalmanın siklofosfamidin spermatogenezis patogenezinde hasar oluşturması ile ilişkili olduğu düşünüldü. Testisteki CREB fonksiyonları ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen, siklofosfamidin CREB üzerinden testis üzerine etkilerinin incelendiği tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada da siklofosfamid uygulaması sonrası CREB gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (97). Ayrıca, dişi sıçanlarda POI modeli oluşturmak için siklofosfamid verilen CREB seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (98). Post-mayotik hücrelerde yüksek oranda ifade edilen cAMP-responsive element modülatör olan (CREM) geninin eksikliği erkek infertilitesine neden olduğu, farelerde testis ağırlığının azalmasında, sperm sayısının ve hareketliliğinin azalmasında ve anormal yapıya sahip spermatozoaların artmasında rol oynadığı bildirilmiştir (99,100).

ABL uygulanan ratların testislerinin incelenmesinde, CREB immunoreaktivitesi kontrol grubu ile benzer özellikte bulundu, buna karşılık ABL+Siklofosfamid uygulanan grupta CREB immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre düşük olsa da siklofosfamid grubuna göre yüksek bulundu ve abalaloparatidin CREB üzerinden spermatogenezis patogenezinde koruyucu etki yaptığı düşünüldü. ABL ile CREB ilişkisini testis üzerinde inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber ABL'in güçlü bir cAMP yanıtını desteklediğini ve protein kinaz A'nın (PKA) ve cAMP yanıt elementi bağlayıcı proteinin (CREB) daha fazla aktivasyonuna neden olduğunu gösterilmiştir (10). CREB immun hücresel stres ve DNA hasarı durumlarında DNA hasar yanıt yollarını (DDR) destekleyerek hücre proliferasyonu ve hayatta kalma süreçlerinde görev aldığı bildirilmiştir (52). Bu bilgiler değerlendirildiğinde ABL nin CREB ekspresyonu artması siklofosfamidin zararlı etkisine karşı koruyucu etki yaptığı ileri sürülebilir. Daha önce Kore bitkisel formülü MYOMI-

14 ile yapılan bir çalışmada siklofosfamid ile tedavi edilen grupta CREM mRNA ifadesinin azaldığı ve azalmış ifadenin MYOMI ile tedavi edilen gruplarda eski haline döndüğü bildirilmiştir (97).

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), ökaryotik hücrelerde DNA replikasyonu ve onarımında kritik bir rol oynayan temel bir protein olduğu, seminifer tübüllerin tüm evrelerindeki spermatogonyumlarda ve erken faz primer spermatositlerde ifade edildiği bilinmektedir (101). Kontrol grubunda immunohistokimya ve Western-Blot incelemelerinde seminifer tübüllerde PCNA immünoreaktivitesinin yüksek olduğu tespit edildi ve spermatogenezis patogenezinde DNA replikasyonunda önemli rol oynadığı biçiminde değerlendirildi. PCNA, testiküler gelişim boyunca dinamik ekspresyon kalıpları sergilediği, pre-pubertal dönemde (örneğin sıçanlarda doğum sonrası 9. günde) mitotik olarak çoğalan spermatogonya (Spga) ve Sertoli hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir. Germ hücre popülasyonu farklılaşmış spermatositlere doğru kaydıkça ve Sertoli hücreleri olgunlaştıkça, PCNA immünoreaktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (62).

PCNA indeksleme ile spermatogenezin hassas analizi, kimyasal olarak tetiklenen testis toksisitesini tespit etmek için erken bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (101). Bununla beraber PCNA' nın spermatogenez patogenesindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar PCNA' nın pozitif ekspresyonunun spermatogenez disfonksiyona karşı iyi bir yanıtın göstergesi olduğuna inanırken (8), diğerleri bunun iyi düzenlenmiş spermatogenezin bir göstergesi olduğunu öne sürmektedir. Bu çalışmada siklofosfamid uygulanan grupta PCNA immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ve siklofosfamidin testis hasarı oluşturmada PCNA' nın önemli rol oynadığını düşünüldü. Hem overde hemde testiste kemoterapinin gonadal toksitesinin incelendiği çalışmada siklofosfamid verilen farelerde overlerde ve testislerde PCNA immünoreaktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (102). Adana MY ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, siklofosfamid uygulanan ratlarda PCNA ekspresyonunun azaldığını tespit etmişler ve bu azalmanın seminifer tübüllerin bazal membranı boyunca sıralanan germinal epitelin spermatogonik hücrelerin ve primer spermatositlerin hasar görmesi nedeniyle hücresel replikasyonun azalmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir (8).

ABL+Siklofosfamid uygulanan grupta PCNA immunoreaktivitesinin siklofosfamid grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği tespit edildi ve ABL'nin siklofosfamidin oluşturduğu hasara karşı, PCNA' nın merkezi olduğu DNA onarım mekanizmalarındaki aktive ettiği düşünüldü. PCNA eksikliğin, spermatogenez durmasına ve anormal rekombinasyona neden olduğu, nihayetinde erkek infertilitesine yol açtığı bilinmektedir (64). PCNA, DNA onarımı ve rekombinasyonu için çok sayıda enzimi toplayan mobil bir platform görevi görmesi nedeni ile (59), abaloparatidin PCNA' nın mayoz profazı sırasında "DNA eksizyon onarımındaki" rolü artırmış olması ileri sürülebilir. Biyoaktif bir flavonoid olan timokinonal ile yaptıkları çalışmada siklofosmatid verilen grupta düşen PCNA immunoreaktivitesinin, timokinonal uygulaması ile kontrol grubuna yakın düzeyine ulaştığı gösterilmiştir (8). PCNA' nın onarım mekanizmalarındaki kusurların spermatogenez durmasına ve anormal rekombinasyona yol açarak nihayetinde erkek infertilitesine neden olduğu göz önüne alındığında (64), abaloparatidin PCNA'nın immünoreaktivitesinin artması, siklofosfamid etkisini azaltarak sağlıklı, genetik olarak sağlam sperm proliferasyonu ile doğrudan bağlantılı olabilir.

Isı şoku proteinleri, protein katlanmasını ve protein agregasyonunu önleyen moleküler şaperonlar olarak önemli roller oynarlar. HSPA4' ün testis üzerinde etkilerini inceleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla beraber, HSPA4 prenatal gonadların erkek ve dişi germ hücrelerinde oldukça zengin olarak eksprese edildiği, testiste hem somatik hem de germ hücrelerinde yaygın olarak bulunduğu, erkek gonositlerinde HSPA4 ekspresyonun, seminifer tübüllerin bazal katmanlarına göç ettikten ve spermatogoniaya farklılaştıktan sonra kademeli olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada immunohistokimya ve Western-Blot yöntemleri ile HSPA4 immunoreaktivitesini kontrol grubunda belirgin olarak varlığı gözlemlendi ve spermatogeneziste önemli rol oynadığı düşünüldü. Germ hücrelerinin gelişimi için HSPA4 fonksiyonunun gerekli olduğu, ayrıca embriyonik, nöral ve hematopoietik kök hücrelerde yüksek seviyelerde ifade edildiği bildirilmiştir (18).

Bu çalışmada siklofosfamid grubunda HSPA4 immünreaktivitesi, siklofosfamid etkisi ile azalmış olarak bulundu. Siklofosfamidin HSPA4 üzerinden etkisini inceleyen tek bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmada

HSPA4 yüksek dizi homolojisi olan HSPA4L esas olarak yuvarlak ve uzun spermatidlerde ifade edildiği ve SF enjeksiyonunda 1 hafta sonra önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (103). HSPA4L sperm kalitesiyle ilişkili anahtar spermatogenez proteinleri olarak tanımlandığı göz önüne alındığında (79), siklofosfamidin spermatogonezi HSPA4 üzerinden etkilediği ileri sürülebilir. Hspa4 eksikliği olan farelerde erkek infertilitesinin belirgin olarak ortaya çıktığı ve post-mayotik germ hücrelerinin sayısında azalmaya ve apoptozise uğrayan germ hücrelerinin sayısında artışa neden olduğu rapor edilmiştir. HSPA4 yokluğunda, mayoz profaz I' in sonraki aşamaları ve post-meyotik germ hücreleri için belirteç genlerinin ekspresyonu azalttığı ve geç profaz I' deki çoğu germ hücresinin gelişiminin bozulduğu bildirilmiştir (18). Erkek germ hücrelerinin mayotik ve post-mayotik aşamalarda gelişimi için gerekli olan çok sayıda protein çoğunlukla pakiten spermatosit aşamasında çevrilmektedir (104). Yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanmasını yönlendiren moleküler şaperonların başarısızlığı, pakiten spermatositlerde yanlış katlanmış ve hasarlı proteinlerin birikmesine yol açabilir ve bu da spermatositlerin mayoz bölünmeye devam etmek yerine apoptoza uğramasına neden olabilir.

Abaloparatid ve siklofosfamid uygulanan farelerin testis dokularında HSPA4 immunoreaktiviteleri siklofosfamid grubuna göre artmış bulundu. Abalopalatinin, testis üzerine siklofosfamidin zararlı etkilerine karşı HSPA4'ün önemli rol oynadığı düşünüldü. Abaloparatidin HSPA4 üzerine etkilerini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Abaloparatidin testis üzerindeki etkilerini inceleyen tek bir çalışma vardır ve bu çalışmada, abaloparatid tarafından aktive edilen PTH1R'nin hem testis hem de epididimiste kabakulak virüsü veya LPS kaynaklı inflamatuvar yanıtları hafiflettiği ve hem fare modelinde hem de insan örneklerinde sperm fonksiyonlarını önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (6). Aynı çalışmada ABL'nin anti-inflamatuvar etkilerinin, $G_{\alpha q}$ ve $Arrb1$ üzerinden, PTH1R'nin aşağı akışındaki ise $G_{\alpha q}$ ve β -arrestin-1 yolunun kullanıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, siklofosfamidin HSPA4 ekspresyonunu azaltıcı etkisi, abaloparatid tarafından yükseltildiği göz önüne alındığında abaloparatidin HSPA4 üzerinden sperm kalitesini artırıcı etki gerçekleştirdiği ileri sürülebilir.

REC8 oositler ve spermatositler tarafından ifade edilmektedir, mayozun doğru düzenlenmesi, normal spermatogenez için kritik öneme sahiptir, sağlıklı

sperm üretimini sağlayarak erkek germ hücresi gelişimi ve olgunlaşmasını sağladığı bilinmektedir (90). Bu çalışmada immunohistokimya ve Western Blot yöntemleriyle kontrol grubuna ait testis dokusunda REC8 immunoreaktivitesinin varlığı gözlemlendi ve spermatogenezis patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünüldü. Kanonik kohezin alt birimi RAD21'in mayoz-spesifik paralogları olan REC8, sinaptonemal kompleksin eksenel/lateral elemanlarının düzgün oluşumu, homolog kromozomların sinapsisi ve memeli mayozunda çapraz rekombinasyon için gereklidir. Taniuchi Y ve arkadaşları 2023 yılında, Western blot analizi ile inceledikleri testis dokusunda, profaz I'in erken evrelerinde spermatosit başına yaklaşık 413.000-453.000 REC8 molekülü olduğunu rapor etmişlerdir (105).

Siklofosfamid uygulanan farelerin testis dokuları incelendiğinde immunoreaktivitenin kontrol grubuna göre azalmış olduğu tespit edildi. Siklofosfamidinin REC8 üzerine etkisini inceleyen tek bir çalışma bulunmaktadır, bu çalışmada siklofosfamid ile tedavi edilen farelerde, REC8 seviyeleri önemli ölçüde azaldığı ve spermatogonyum ve spermatositlerin ciddi şekilde etkilendiğini bildirmiştir (103). REC8 bozulduğunda da mayotik hataların meydana geldiği, sinaptonemal kompleks benzeri (SC) yapıların, homolog kromozomlar yerine kardeş kromatidler arasında anormal bir şekilde oluştuğu ve erkek ve dişi infertilitesine yol açtığı bilinmektedir (106). REC8-/- erkek epididiminin histolojik incelemesi infertilitenin olgun sperm veya öncüllerinin tamamen yokluğundan kaynaklandığını gösterilmiştir. Yetişkin REC8 -/- tübüllerinde spermatidler ve spermatozoa tamamen olmadığı TUNEL boyamada, REC8-/- testis tübüllerindeki apoptotik hücrelerin yaygın olarak gözlenmesi, ayrıca REC8 -/- tübüllerin bazal tabakası PCNA (mitotik proliferasyon belirteci) pozitif mitotik spermatogonial hücrelerin bulunması nedeni ile yüksek hücre ölümü seviyelerinin REC8 -/- erkeklerin infertilitesine neden olan testis tübüler defektlerinden sorumlu olduğunu gösterdiği ileri sürülmektedir (106). Buna karşılık, REC8 genindeki mutasyonların azospermi veya şiddetli oligozoosperminin yaygın bir nedeni olmadığını; ancak tespit edilen polimorfizmlerin, bazı hastalarda multigenik etkilere sahip polimorfizmlerle ilişkili olabileceği de ileri sürülmektedir (90).

REC8 'in immunohistokimya ve Western Blot yöntemleriyle ölçülen immunoreaktivitesi abalopalatid+siklofosfamid verilen grupta siklofosfamid

grubuna göre artmış bulundu ve REC8' in siklofosfamidin zararlı etkilerinden abaloparatid tarafından engellenmesinde rol oynadığı düşünöldü. Abalaparatidin REC8 üzerinden etkisini inceleyen çalışma literatürde bulunmamaktadır. REC8 mitotik olarak çoğalan spermatogonyumlarda ve daha sonra mayotik profazda (zigoten ve pakiten spermatositler) tespit edilmiştir; burada mayotik rekombinasyon sırasında DNA eksizyon onarımında rol oynayabilir (63). Bu çalışmada da abaloparatidin, siklofosfamid tarafından oluşturulan DNA hasarını REC8 üzerinden onardığı ileri sürölebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

H&E boyanmış testis örneklerinde, kontrol ve sham grubunda testis morfolojisinin korunduğu, siklofosamid uygulanan grupta ise spermatogeneze ait hücrelerin sayısının azaldığı, hücreler arası boşlukların arttığı, tespit edildi. Testisin morfolojik olarak spermatogenezi değerlendirmekte kullanılan Johnsen skorları, kontrol grubunda 9,36 iken, siklofosamid grubunda anlamlı olarak düştüğü ve 8,12 olarak tespti edildi. Siklofosamidin DNA çapraz bağları, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu gibi hücresel süreçleri kritik şekilde bozarak hızla bölünen hücrelerde apoptozu (programlanmış hücre ölümü) tetiklediği göz önüne alındığında, siklofosamid uygulanan farelerin seminiferöz tübüllerdeki hücre kayıplarının ortaya çıkmasında apoptosisin rol oynadığı;

ABL uygulanan ratların testis morfolojik özellikleri kontrol grubu ile benzer özellikle benzer olduğu, ABL+Siklofosamid uygulanan grubunda ise morfoloji kontrol grubuna göre bozulmuş olsa da siklofosamid grubuna göre oldukça iyi korunduğu tespit edildi ve abaloparatidin siklofosamidin zararlı etkilerinden anti inflamatuvar ve anti apoptotik yolları aktive ederek koruduğu;

Kontrol grubunda CREB immunoreaktivitesinin yüksek olduğu, siklofosamid verilen farelerde CREB immunoreaktivitesinin hem immunohistokimyasal hemde western blot tekniği ile incelendiğinde kontrol grubuna göre azalmış olduğu tespit edildi ve CREB aktivesindeki azalmanın siklofosamidin spermatogenesis patogenesinde hasar oluşturmaları ile ilişkili olduğu;

ABL uygulanan ratların testislerinin incelenmesinde, CREB immunoreaktivitesi kontrol grubu ile benzer özellikle bulundu, buna karşılık ABL+Siklofosamid uygulanan grupta CREB immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre düşük olsa da siklofosamid grubuna göre yüksek bulundu ve ABL'nin CREB ekspresyonu artması siklofosamidin zararlı etkisine karşı koruyucu etki yaptığı;

Kontrol grubunda seminifer tübüllerde PCNA immünoreaktivitesinin yüksek olduğu, siklofosamid uygulanan grupta PCNA immünoreaktivitesinin

kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ve siklofosfamidin testis hasarı oluşturmada PCNA' nın önemli rol oynadığı;

ABL+Siklofosfamid uygulanan grupta PCNA immunoreaktivitesinin SF grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği tespit edildi ve ABL'nin SF oluşturduğu hasara karşı, PCNA'nın merkezi olduğu DNA onarım mekanizmalarındaki aktive ettiği;

HSPA4 immunoreaktivitesini kontrol grubunda belirgin olarak varlığı gözlemlendi, siklofosfamid grubunda HSPA4 immünreaktivitesinin anlamlı azalmış olduğu gözlemlendi ve pakiten aşamasındaki spermatositlerde yanlış katlanmış ve hasarlı proteinlerin birikmesine yol açarak mayoz bölünmeye devam etmek yerine apoptoza uğramasına neden olduğu;

Abaloparatid ve siklofosfamid uygulanan farelerin testis dokularında HSPA4 immunoreaktiviteleri siklofosfamid grubuna göre artmış bulundu ve ABL'nin HSPA4 üzerinden sperm kalitesini artırıcı etki gerçekleştirdiği;

Kontrol grubuna ait testis dokusunda REC8 immunoreaktivitesinin varlığı gözlemlendi, Siklofosfamid uygulanan grupta ise immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu tespit edildi ve siklofosfamidin mayozu, erkek germ hücresi gelişimi ve olgunlaşmasını bozduğu;

REC8 immunoreaktivitesi abaloparatid ve siklofosfamid verilen grupta siklofosfamid grubuna göre artmış bulundu ve abalopatin, siklofosfamid tarafından oluşturulan DNA hasarını REC8 üzerinden onardığı sonucuna varıldı.

7. ÖZET

SİKLOFOSFAMİD ARACILIĞIYLA RAT AZOSPERMİ MODELİNE ABALOPARATİDE'NİN TEDAVİ EDİCİ ETKİSİ

İlaçlara bağlı infertilite en büyük sağlık problemlerinden biridir. Kanser tedavileri için yaygın olarak kullanılan siklofosfamidin germ hücrelerini bozarak infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada siklofosfamid tedavisi ile ortaya çıkan testis hasarında, parathormonun reseptör analogu olan abaloparatidin koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, 12-16 haftalık 30 adet erkek Wistar sıçanları rastgele, kontrol, sham, abaloparatid, siklofosfamid, abaloparatid+siklofosfamid, olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Siklofosfamidin 20 gün süreyle günde 1 defa 15 mg/kg intraperitoneal uygulanması ile testiküler hasar oluşturuldu. Abaloparatid ise 56 gün boyunca günde 10 mikrogram/kg 1 kez intraperitoneal uygulandı. Uygulamaların sonunda kurban edilen hayvanların testis dokuları, histoloji ve Western Blot teknikleri ile incelenmesi için ikiye ayrıldı. Histolojik incelemeler H&E boyanması sonucu morfolojik ve Johnsen skoru değerlendirmesi ile yapıldı. İmmunohistokimyasal teknik ve primer CREB, PCNA, HSPA4, REC8 antikorları kullanılarak hazırlanan preparatlar İmage J programı ile değerlendirildi. Moleküler incelemeler, aynı primer antikorlar kullanılarak Western Blot yöntemiyle yapıldı.

Siklofosfamidin testis morfolojisini bozduğu, testis ağırlığını ve Johnsen skorunu düşürdüğü görüldü. Siklofosfamid grubunda CREB, PCNA, HSPA4 ve REC8 immunoreaktivitesi ve protein düzeyleri, kontrol grubu, sham grubu, ABL ve ABL+SF grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Abaloparatidin, uygulanan gruplarda testis morfolojisi ile testis ağırlığını korunduğu, Johnsen skorunu artırdığı, kilo kaybını azalttığı, ayrıca CREB, PCNA, HSPA4 ve REC8 ekspresyonunu artırdığı tespit edildi.

Bu çalışmada, abaloparatidin, siklofosfamid tarafından oluşturulan germ hücre kaybından koruduğu, mayoz bölünme (REC8) ve sperm kalitesini (HSPA4) düzelttiği, etkisini CREB/PCNA yolağı üzerinden gerçekleştirdiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Abaloparatid, CREB, GAPDH, HSPA4, İnfertilite, PCNA, REC8, Siklofosfamid

8. İNGİLİZCE ÖZET

THE THERAPEUTIC EFFECT OF ABALOPARATIDE ON THE CYCLOPHOSPHAMIDE INDUCED RAT AZOOSPERMIA MODEL

Drug-related infertility is one of the biggest health problems. Cyclophosphamide, which is widely used for cancer treatments, is known to cause infertility by damaging germ cells. This study aimed to investigate the protective effect of abaloparatide, a parathyroid hormone receptor analog, on testicular damage induced by cyclophosphamide treatment.

In this study, 30 male Wistar rats, 12-16 weeks old, were randomly divided into 5 groups: control, sham, abaloparatide, cyclophosphamide, and abaloparatide+cyclophosphamide. Testicular damage was induced by administering 15 mg/kg of cyclophosphamide intraperitoneally once a day for 20 days. Abaloparatide was administered intraperitoneally at 10 µg/kg once a day for 56 days. At the end of the applications, the testicular tissues of the sacrificed animals were divided into two for examination using histology and Western blot techniques. Histological examinations were performed with H&E staining, and morphological and Johnsen scores were evaluated. Preparations made using immunohistochemical techniques and primary CREB, PCNA, HSPA4, and REC8 antibodies were evaluated with the ImageJ program. Molecular examinations were performed with the Western blot method using the same primary antibodies.

It was observed that cyclophosphamide disrupted testicular morphology and decreased testicular weight and Johnsen scores. In the cyclophosphamide group, CREB, PCNA, HSPA4, and REC8 immunoreactivity and protein levels were found to be significantly reduced compared to the control, sham, ABL, and ABL+SF groups ($p<0.05$). It was determined that abaloparatide preserved testicular morphology and weight, increased Johnsen scores, and reduced weight loss in the groups it was administered to, and also increased the expression of CREB, PCNA, HSPA4, and REC8.

This study concluded that abaloparatide protected against germ cell loss caused by cyclophosphamide, improved meiosis (REC8) and sperm quality (HSPA4), and achieved its effect through the CREB/PCNA pathway.

Keywords: Abaloparatide, CREB, GAPDH, HSPA4, Infertility, PCNA, REC8, Cyclophosphamide

9. KAYNAKLAR

1. Burger HG, Baker HW. The treatment of infertility. *Annu Rev Med.* 1987;38:29–40.
2. Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res.* 2019;8.
3. Kinsella TJ. Effects of radiation therapy and chemotherapy on testicular function. *Prog Clin Biol Res.* 1989;302:157–71; discussion 172-7.
4. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Nov;6(11):638–47.
5. Özatik FY, Özatik O, Tekşen Y, Yiğitaslan S, Arı NS. Protective and therapeutic effect of hydrogen sulfide on hemorrhagic cystitis and testis dysfunction induced with cyclophosphamide. *Turk J Med Sci.* 2021 Jun 28;51(3):1531–43.
6. Wang MW, Yang Z, Chen X, Zhou SH, Huang GL, Sun JN, et al. Activation of PTH1R alleviates epididymitis and orchitis through Gq and β -arrestin-1 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Nov 9;118(45).
7. Ayoka OA, Ojo OE, Imafidon EC, Ademoye KA, Oladele AA. Neuro-endocrine effects of aqueous extract of *Amaranthus viridis* (Linn.) leaf in male Wistar rat model of cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Toxicol Rep.* 2016;3:608–19.
8. Adana MY, Imam A, Bello AA, Sunmonu OE, Alege EP, Onigbolabi OG, et al. Oral thymoquinone modulates cyclophosphamide-induced testicular toxicity in adolescent Wistar rats. *Andrologia.* 2022 May;54(4):e14368.
9. Gonnelli S, Caffarelli C. Abaloparatide. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2016;13(2):106–9.
10. Ricarte FR, Le Henaff C, Kolupaeva VG, Gardella TJ, Partridge NC. Parathyroid hormone(1-34) and its analogs differentially modulate osteoblastic Rankl expression via PKA/SIK2/SIK3 and PP1/PP2A-CRTC3 signaling. *J Biol Chem.* 2018 Dec 28;293(52):20200–13.

11. Scobey M, Bertera S, Somers J, Watkins S, Zeleznik A, Walker W. Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (creb) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis. *Endocrinology*. 2001 Feb;142(2):948–54.
12. Daniel P, Filiz G, Brown D V, Hollande F, Gonzales M, D'Abaco G, et al. Selective CREB-dependent cyclin expression mediated by the PI3K and MAPK pathways supports glioma cell proliferation. *Oncogenesis*. 2014 Jun 30;3(6):e108–e108.
13. Boehm EM, Gildenberg MS, Washington MT. The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *Enzymes*. 2016;39:231–54.
14. Nna VU, Ujah GA, Suleiman JB, Mohamed M, Nwokocha C, Akpan TJ, et al. Tert-butylhydroquinone preserve testicular steroidogenesis and spermatogenesis in cisplatin-intoxicated rats by targeting oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Toxicology*. 2020 Aug;441:152528.
15. Demir M, Altındağ F. Sinapic acid ameliorates cisplatin-induced disruptions in testicular steroidogenesis and spermatogenesis by modulating androgen receptor, proliferating cell nuclear antigen and apoptosis in male rats. *Andrologia*. 2022 May;54(4):e14369.
16. Sakuno T, Hiraoka Y. Rec8 Cohesin: A Structural Platform for Shaping the Meiotic Chromosomes. *Genes (Basel)*. 2022 Jan 22;13(2).
17. Kaneko Y, Kimura T, Kishishita M, Noda Y, Fujita J. Cloning of apg-2 encoding a novel member of heat shock protein 110 family. *Gene*. 1997 Apr;189(1):19–24.
18. Held T, Barakat AZ, Mohamed BA, Paprotta I, Meinhardt A, Engel W, et al. Heat-shock protein HSPA4 is required for progression of spermatogenesis. *Reproduction*. 2011 Jul;142(1):133–44.
19. Mawhinney M, Mariotti A. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontol* 2000. 2013 Feb;61(1):232–51.
20. Tiwana MS, Leslie SW. *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Testes*. 2025.

21. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016 Jan;96(1):1–17.
22. Cheng CY. Biology of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 May;29:1.
23. Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, Hotaling JM, Giwercman A, Hwang K, et al. Male infertility. *Nat Rev Dis Primers.* 2023 Sep 14;9(1):49.
24. Taitson PF, Mourthé A, Rodrigues LMF. Treating male infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2022 Aug 8;17(6):351–2.
25. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2015;21(4):411–26.
26. Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781. *Obstetrics and gynecology.* 2019 Jun;133(6):e377–84.
27. Starc A, Trampuš M, Pavan Jukić D, Rotim C, Jukić T, Polona Mivšek A. INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW. *Acta Clin Croat.* 2019 Sep;58(3):508–15.
28. Vander Borcht M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018 Dec;62:2–10.
29. Ogino MH, Tadi P. Cyclophosphamide. 2025.
30. <https://synapse.patsnap.com/article/what-is-the-mechanism-of-cyclophosphamide>.
31. Ogino MH TPCyclophosphamide [Updated 2023 J 3]. IS [Internet]. TI (FL): SP 2025 J. A from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553087/>. Ogino MH, Tadi P. Cyclophosphamide. [Updated 2023 Jul 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553087/>.
32. Olowe TG, Oyovwi MO, Nwangwa KE, Ohwin EP, Oghenetega OB. Cytotoxic Properties of Cyclophosphamide: A Focus on Its Mechanistic Impacts on Male Gonadal Functions. *J Explor Res Pharmacol.* 2024 Jun 25;9(2):106–15.

33. Drumond AL, Weng CC, Wang G, Chiarini-Garcia H, Eras-Garcia L, Meistrich ML. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: Accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reproductive Toxicology*. 2011 Dec;32(4):395–406.
34. Blumenfeld Z, von Wolff M. GnRH-analogues and oral contraceptives for fertility preservation in women during chemotherapy. *Hum Reprod Update*. 2008;14(6):543–52.
35. <https://www.mdanderson.org/patients-family/diagnosis-treatment/a-new-diagnosis/preserving-fertility-before-treatment.html>.
<https://www.mdanderson.org/patients-family/diagnosis-treatment/a-new-diagnosis/preserving-fertility-before-treatment.html>.
36. Aamar S, Izhiman-Aamar N. DELAYED ONSET OF MALE INFERTILITY AFTER TREATMENT WITH HIGH DOSE OF CYCLOPHOSPHAMIDE FOR LUPUS NEPHRITIS. *J Rheumatol*. 2025 May 21;52(Suppl 1):147.2-147.
37. Gajjar R, Miller SD, Meyers KE, Ginsberg JP. Fertility preservation in patients receiving cyclophosphamide therapy for renal disease. *Pediatric Nephrology*. 2015 Jul 5;30(7):1099–106.
38. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/abaloparatide>. Definition of abaloparatide - NCI Drug Dictionary.
39. Leder BZ, O'Dea LStL, Zanchetta JR, Kumar P, Banks K, McKay K, et al. Effects of Abaloparatide, a Human Parathyroid Hormone-Related Peptide Analog, on Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Feb;100(2):697–706.
40. Polyzos SA, Makras P, Efstathiadou Z, Anastasilakis AD. Investigational parathyroid hormone receptor analogs for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015 Feb 15;24(2):145–57.
41. Martin TJ. PTH1R Actions on Bone Using the cAMP/Protein Kinase A Pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:833221.

42. Akel M PPPM.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587447>. Abaloparatide.
43. <https://www.drugs.com/dosage/abaloparatide.html>
[Internet]. Abaloparatide Dosage Guide + Max Dose, Adjustments .
44. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a617038.html>.
<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a617038.html>. Abaloparatide Injection: MedlinePlus Drug Information.
45. <https://synapse.patsnap.com/article/what-are-the-side-effects-of-abaloparatide>. <https://synapse.patsnap.com/article/what-are-the-side-effects-of-abaloparatide>. What are the side effects of Abaloparatide? .
46.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2024/208743Orig1s015lbl.pdf.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2024/208743Orig1s015lbl.pdf. TYMLOS® (abaloparatide) .
47. <https://www.rxlist.com/abaloparatide/generic-drug.htm>.
<https://www.rxlist.com/abaloparatide/generic-drug.htm>. Abaloparatide: Side Effects, Uses, Dosage, Interactions, Warnings .
48. Chowdhury MAR, Haq MM, Lee JH, Jeong S. Multifaceted regulation of CREB family transcription factors. *Front Mol Neurosci*. 2024;17:1408949.
49. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol*. 2010 Dec 1;185(11):6413–9.
50. Ranawat P, Bansal MP. Modulatory effects of Selenium on Spermatogenesis: Involvement of transcription factors CREB and CREM. *Am J Biomed Sci*. 2010 Oct;329–41.
51.
https://en.wikipedia.org/wiki/Akt/PKB_signaling_pathway).
https://en.wikipedia.org/wiki/Akt/PKB_signaling_pathway). Akt/PKB signaling pathway).
52. Bolland H, Ma TS, Ramlee S, Ramadan K, Hammond EM. Links between the unfolded protein response and the DNA damage

response in hypoxia: a systematic review. *Biochem Soc Trans.* 2021 Jun 30;49(3):1251–63.

53. Qi HY, Zhao Z, Wei BH, Li ZF, Tan FQ, Yang WX. ERK/CREB and p38 MAPK/MMP14 Signaling Pathway Influences Spermatogenesis through Regulating the Expression of Junctional Proteins in *Eriocheir sinensis* Testis. *Int J Mol Sci.* 2024 Jul 4;25(13):7361.

54. Walker WH, Habener JF. Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 1996 May;7(4):133–8.

55. Xu WM, Chen J, Chen H, Diao RY, Fok KL, Dong J Da, et al. Defective CFTR-Dependent CREB Activation Results in Impaired Spermatogenesis and Azoospermia. *PLoS One.* 2011 May 9;6(5):e19120.

56. Tesarik J, Mendoza-Tesarik R. Cyclic Adenosine Monophosphate: A Central Player in Gamete Development and Fertilization, and Possible Target for Infertility Therapies. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 1;23(23).

57. Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, Roberson PK, et al. Proteasomal Degradation of Runx2 Shortens Parathyroid Hormone-induced Anti-apoptotic Signaling in Osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry.* 2003 Dec;278(50):50259–72.

58. González-Magaña A, Blanco FJ. Human PCNA Structure, Function and Interactions. *Biomolecules.* 2020 Apr 8;10(4):570.

59. Dieckman LM, Freudenthal BD, Washington MT. PCNA Structure and Function: Insights from Structures of PCNA Complexes and Post-translationally Modified PCNA. In 2012. p. 281–99.

60. Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, et al. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(21):9350–9.

61. Sánchez-Jasso DE, López-Guzmán SF, Bermúdez-Cruz RM, Oviedo N. Novel Aspects of cAMP-Response Element Modulator

(CREM) Role in Spermatogenesis and Male Fertility. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 8;24(16):12558.

62. Ryser S, Glauser D, Vigier M, Zhang YQ, Tachini P, Schlegel W, et al. Gene expression profiling of rat spermatogonia and Sertoli cells reveals signaling pathways from stem cells to niche and testicular cancer cells to surrounding stroma. *BMC Genomics*. 2011 Dec 13;12(1):29.

63. Chapman DL, Wolgemuth DJ. Expression of proliferating cell nuclear antigen in the mouse germ line and surrounding somatic cells suggests both proliferation-dependent and -independent modes of function. *Int J Dev Biol*. 1994 Sep;38(3):491–7.

64. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2015 Sep;31(3):309–19.

65. Kaltsas A, Markou E, Kyrgiagini MA, Zikopoulos A, Symeonidis EN, Dimitriadis F, et al. Oxidative-Stress-Mediated Epigenetic Dysregulation in Spermatogenesis: Implications for Male Infertility and Offspring Health. *Genes (Basel)*. 2025 Jan 17;16(1):93.

66. Shukla KK. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in Bioscience*. 2012;E4(1):746.

67. De León-Ramírez YM, Nicolás-Toledo L, Pérez-Sánchez E, Arroyo-Helguera O. Chronic Variable Stress May Induce Apoptosis in the Testis and Epididymal Sperm of Young Male Rats. *Biology (Basel)*. 2025 Jun 12;14(6):690.

68. William Berg MYRSM. https://www.stonybrookmedicine.edu/patientcare/urology/immunology_of_male_infertility. Immunology of male infertility.

69. Chereshev V, Pichugova S, Beikin Y, Cheresheva M, Iukhta A, Stroeve Y, et al. Pathogenesis of Autoimmune Male Infertility: Juxtacrine, Paracrine, and Endocrine Dysregulation. *Pathophysiology*. 2021 Oct 15;28(4):471–88.

70. Talamini L, Fonseca DLM, Kanduc D, Chaloin O, Verdote C, Galmiche C, et al. Long COVID-19 autoantibodies and their potential effect on fertility. *Front Immunol*. 2025 May 27;16.

71. Gera M, Patil AS, Bhosale V. Proliferating Cell Nuclear Antigen: A Novel Growth and Therapeutic Biomarker. *Clinical & Translational Metabolism*. 2024 Aug 20;22(1):7.
72. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HSPA4L>. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HSPA4L>. HSPA4L Gene - Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 4 Like .
73. Wu X, Yang SY, Zhang YH, Fang JZ, Wang S, Xu ZW, et al. Prognostic and immunological roles of heat shock protein A4 in lung adenocarcinoma. *World J Clin Oncol*. 2024 Jan 24;15(1):45–61.
74. Yang J, Wu X, You J. Unveiling the potential of HSPA4: a comprehensive pan-cancer analysis of HSPA4 in diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Aging*. 2024 Jan 31;
75. <https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene/HSPA4L>. <https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene/HSPA4L>. HSPA4L.
76. Adachi T, Sakurai T, Kashida H, Mine H, Hagiwara S, Matsui S, et al. Involvement of Heat Shock Protein A4/Apg-2 in Refractory Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Jan;21(1):31–9.
77. <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/hspa4-antibody-epr14166-ab185962>. <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/hspa4-antibody-epr14166-ab185962>. Anti-HSPA4 antibody [EPR14166].
78. <https://en.wikipedia.org/wiki/HSPA4>. <https://en.wikipedia.org/wiki/HSPA4>. HSPA4.
79. Liu X, Wang X, Liu F. Decreased expression of heat shock protein A4L in spermatozoa is positively related to poor human sperm quality. *Mol Reprod Dev*. 2019 Apr 22;86(4):379–86.
80. Held T, Paprotta I, Khulan J, Hemmerlein B, Binder L, Wolf S, et al. Hspa4l-Deficient Mice Display Increased Incidence of Male Infertility and Hydronephrosis Development. *Mol Cell Biol*. 2006 Nov 1;26(21):8099–108.
81. Houston BJ, Nguyen J, Burke R, Nogueira Alves A, Hime GR, O'Bryan MK. Mammalian heat shock protein A4 family ortholog

Hsc70Cb is required for two phases of spermatogenesis in *D. melanogaster*. *Reproduction*. 2025 Feb 24;169(4).

82. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Sep;4(9):491–8.

83. <https://www.ifm.org/articles/antinuclear-antibodies-autoimmune-disease>. <https://www.ifm.org/articles/antinuclear-antibodies-autoimmune-disease>. Antinuclear Antibodies and Autoimmune Disease .

84. Tukaj S. Dual role of autoantibodies to heat shock proteins in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2024 Jun 6;15.

85. Yuan X, Sun X, Zhou B, Zhao S, Li Y, Ming H. HSPA4 regulated glioma progression via activation of AKT signaling pathway. *Biochemistry and Cell Biology*. 2024 Apr 1;102(2):159–68.

86. <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/rec8-antibody-epr16189-ab192241>. <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/rec8-antibody-epr16189-ab192241>. Anti-REC8 antibody [EPR16189].

87. Yoon SW, Lee MS, Xaver M, Zhang L, Hong SG, Kong YJ, et al. Meiotic prophase roles of Rec8 in crossover recombination and chromosome structure. *Nucleic Acids Res*. 2016 Aug 2;gkw682.

88. <https://diseases.jensenlab.org/Entity?documents=10&type1=9606&id1=ENSP00000482546&type2=-26&id2=DOID:14450>. <https://diseases.jensenlab.org/Entity?documents=10&type1=9606&id1=ENSP00000482546&type2=-26&id2=DOID:14450>. Literature associating REC8 and 46 XX gonadal dysgenesis.

89. Chen J, Gao C, Zheng C, Lin X, Ning Y, Ma L, et al. MicroRNA-202 safeguards meiotic progression by preventing premature degradation of REC8 mediated by separase. 2021.

90. Griffin J, Emery BR, Christensen GL, Carrell DT. Analysis of the Meiotic Recombination Gene REC8 for Sequence Variations in a Population with Severe Male Factor Infertility. *Syst Biol Reprod Med*. 2008 Jan 9;54(3):163–5.

91. Hann MC, Lau PE, Tempest HG. Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality? *Asian J Androl*. 2011 Mar 7;13(2):212–8.
92. Nicholls C, Li H, Liu J. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Aug 25;39(8):674–9.
93. Wang J, Yu X, Cao X, Tan L, Jia B, Chen R, et al. GAPDH: A common housekeeping gene with an oncogenic role in pan-cancer. *Comput Struct Biotechnol J*. 2023;21:4056–69.
94. Huang IS, Chen WJ, Wang ZL, Li LH, Chen YK, Wu YL, et al. The impact of low-intensity extracorporeal shock waves on testicular spermatogenesis demonstrated in a rat model. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2023 Feb 4;86(2):197–206.
95. Kaya C, Barbaros Baseskioglu A, Yigitaslan S, Yasemin Ozatik F, Ozatik O, Uslu S. The therapeutic potential of amifostine on cyclophosphamide-induced testicular dysfunction in rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine (IJRM)*. 2019 Jun 10;17(4):245–52.
96. Hamzeh M, Hosseinimehr SJ, Karimpour A, Mohammadi HR, Khalatbary AR, Talebpour Amiri F. Cerium Oxide Nanoparticles Protect Cyclophosphamide-induced Testicular Toxicity in Mice. *Int J Prev Med*. 2019 Jan;10(1).
97. Park A, Yang Y, Jo J, Yoon SR. Modified MYOMI-14 Korean herbal formulations have protective effects against cyclophosphamide-induced male infertility in mice. *Andrologia*. 2021 Jun 22;53(5).
98. Zhao R, Ran L, Yao H, He Y, Lu X, Zhu W, et al. Moxibustion ameliorates ovarian function in premature ovarian insufficiency rats by activating cAMP/PKA/CREB to promote steroidogenesis in ovarian granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2024 Sep;242:106547.
99. Foulkes NS, Mellström B, Benusiglio E, Sassone-Corsi P. Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature*. 1992 Jan;355(6355):80–4.

100. Sassone-Corsi P. Regulating the balance between differentiation and apoptosis: role of CREM in the male germ cells. *J Mol Med*. 1998 Oct 29;76(12):811–7.
101. D’Andrea M, Lawrence D, Nagele R, Wang C, Damiano B. PCNA indexing as a preclinical immunohistochemical biomarker for testicular toxicity. *Biotechnic & Histochemistry*. 2008 Jan 12;83(5):211–20.
102. Levi M, Ben-Aharon I, Shalgi R. Irinotecan (CPT-11) Treatment Induces Mild Gonadotoxicity. *Frontiers in reproductive health*. 2022;4:812053.
103. Liu X, Li Q, Wang Z, Liu F. Identification of abnormal protein expressions associated with mouse spermatogenesis induced by cyclophosphamide. *J Cell Mol Med*. 2021 Feb 12;25(3):1624–32.
104. EDDY E, OBRIEN D. 5 Gene Expression during Mammalian Meiosis. In: *Current Topics in Developmental Biology* Volume 37. Elsevier; 1997. p. 141–200.
105. Taniuchi Y, Hiraide K, Su R, Ijuin K, Wei X, Horii T, et al. Analysis of absolute amounts of two meiotic cohesin subunits, RAD21L and REC8, in mouse spermatocytes. *J Reprod Dev*. 2023 Apr 3;69(2):78–86.
106. Xu H, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GTJ, McKay MJ. Absence of Mouse REC8 Cohesin Promotes Synapsis of Sister Chromatids in Meiosis. *Dev Cell*. 2005 Jun;8(6):949–61.