T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

UPS ile İlişkili NEDL2 Ekspresyonunun Varikosel Patogenezi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bağdat Zeynep SEVER

Birinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seda OCAKLI

İkinci Danışman: Doç. Dr. Tuba ÖZDEMİR SANCI

TOKAT- 2026

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Seda OCAKLI danışmanlığında hazırlamış olduğum "UPS ile ilişkili NEDL2 ekspresyonunun varikosel patogenezi üzerindeki etkilerinin araştırılması" adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımı kabul edeceğimi beyan ederim.

28/07/2026

Bağdat Zeynep SEVER

JÜRİ KABUL VE ONAY SAYFASI

Bağdat Zeynep SEVER tarafından hazırlanan "**UPS ile İlişkili NEDL2 Ekspresyonunun Varikosel Patogenezi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 28/07/2026 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan):

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY

……./……./…….

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle akademik gelişimime katkı sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında yol gösteren ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Seda OCAKLI'ya; bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum, değerli görüş ve önerileriyle tez çalışmama katkı sağlayan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Tuba ÖZDEMİR SANCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum, destek ve katkılarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Fikret GEVREK, Dr. Öğr. Üyesi Nilgün ÖKSEL'e, Dr. Öğr. Üyesi Sevilcan GAZİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarına katılma fırsatı sunarak akademik gelişimime önemli katkılar sağlayan, bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle benimle paylaşan, araştırma kültürünü kazanmamda ve laboratuvar çalışmalarını öğrenmemde yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Semir GÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın laboratuvar sürecinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman destek olan, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, dostlukları ve içtenlikleriyle bu süreci benim için daha anlamlı ve keyifli hale getiren sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Asiye YANCI ve Nisanur ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sevgi, güven ve destekleriyle her zaman yanımda olan, bana güç veren canım aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2025/67 numaralı yüksek lisans projesi desteğiyle gerçekleştirilmiştir.

ÖZET

UPS ile İlişkili NEDL2 Ekspresyonunun Varikosel Patogenezi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Sever, Zeynep Bağdat

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr.Öğr.Üyesi Seda OCAKLI
Temmuz 2026, XVII+75 Sayfa

Ubikitin-proteazom sistemi (UPS), antijen sunumu ve işlenmesi, hücre siklusu, apoptoz, hücresel savunma, hücre sinyalizasyonu ve transkripsiyon gibi birçok hücre içi biyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, UPS'nin fertilizasyon, akrozomal reaksiyon ve zona pellusida (ZP) bağlanması gibi üreme ile ilişkili süreçlerde de önemli işlevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur. UPS E3 ubikitin ligaz ailesi üyelerinden biri olan NEDL2'nin sperm fonksiyonları ve fertilizasyon süreçlerindeki olası rollerine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmasına karşın, varikosel ile ilişkisi henüz araştırılmamıştır. Bu tez çalışmasında, NEDL2'nin varikosel ile ilişkili infertilitedeki olası rolünün ortaya konulması özellikle varikosel tanısı almış fakat sperm sayısı ve morfolojisi açısından normal sınırlar içerisinde olan bireylerin sperm hücrelerinde varikosel patogenezinde moleküler yolakların özelliklede UPS eksenli moleküler mekanizmaların ve bu mekanizmalar içerisinde NEDL2'nin olası rolünün ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 40 varikoselli infertil birey ve 20 kontrol fertil grubundan elde edilen semen örneklerinde sperm parametreleri değerlendirilmiş; NEDL2'nin ekspresyon düzeyi ve hücresel lokalizasyonu immünofloresan, akım sitometrisi ve Western blot yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda, varikosel ve kontrol grupları arasında semen parametreleri ile NEDL2 ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı farklılıklar saptanmıştır. NEDL2 ekspresyonunun varikosel grubunda kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, morfolojik anomalilerin yoğun olduğu bölgelerde NEDL2 lokalizasyonunun belirginleştiği gözlemlenmiş, ancak genel NEDL2 ekspresyon şiddetinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, NEDL2'nin sperm morfolojisinin

düzenlenmesinde ve varikosele bağlı hücresel değişikliklerde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Bu çalışma, NEDL2'nin varikosel ile ilişkili infertilitedeki ekspresyon profilini ortaya koyan ilk çalışmalardan biridir. Elde edilen sonuçlar, NEDL2'nin varikosel patofizyolojisinde ve sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde potansiyel bir role sahip olabileceğini göstermekte olup, erkek infertilitesinde biyobelirteç olarak değerlendirilebilmesine yönelik ileri çalışmalara temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Varikosel, erkek infertilitesi, NEDL2, ubikitin-proteazom sistemi, spermatozoa.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of UPS-Associated NEDL2 Expression on the Pathogenesis of Varicocele

Sever, Zeynep Bağdat
Department of Histology and Embryology
Supervisor: Assist. Prof. Seda OCAKLI
July 2026, XVII + 75 Pages

The ubiquitin–proteasome system (UPS) plays a critical role in the regulation of numerous intracellular biological processes, including antigen processing and presentation, cell cycle progression, apoptosis, cellular defense mechanisms, cell signaling, and transcription. Recent studies have also demonstrated that the UPS is involved in reproductive processes such as fertilization, the acrosome reaction, and zona pellucida (ZP) binding. Although limited studies have suggested potential roles of NEDL2, a member of the UPS E3 ubiquitin ligase family, in sperm function and fertilization, its association with varicocele has not yet been investigated. Therefore, this thesis aimed to elucidate the potential role of NEDL2 in varicocele-associated infertility, particularly by investigating UPS-related molecular mechanisms involved in the pathogenesis of varicocele and evaluating the possible contribution of NEDL2 in spermatozoa obtained from patients diagnosed with varicocele despite having sperm concentration and morphology within the normal reference ranges.

For this purpose, semen samples obtained from 40 infertile men with varicocele and 20 control fertile subjects were analyzed. Conventional semen parameters were evaluated, and the expression level and cellular localization of NEDL2 were investigated using immunofluorescence, flow cytometry, and western blot analysis.

The results demonstrated significant differences between the varicocele and control groups with respect to semen parameters and NEDL2 expression levels. NEDL2 expression was significantly reduced in the varicocele group compared with the fertile control group. Furthermore, NEDL2 localization was found to be more prominent in regions exhibiting morphological abnormalities, although the overall intensity of NEDL2

expression remained lower than that observed in the control group. These findings suggest that NEDL2 may contribute to the regulation of sperm morphology and may play a role in the cellular alterations associated with varicocele.

To the best of our knowledge, this study is among the first to characterize the expression profile of NEDL2 in varicocele-associated infertility. The findings indicate that NEDL2 may have a potential role in the pathophysiology of varicocele and the regulation of sperm function, providing a basis for future studies evaluating its potential as a biomarker in male infertility.

Keywords: Varicocele, male infertility, NEDL2, ubiquitin–proteasome system, spermatozoa.

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ 1
2.İLGİLİ ARAŞTIRMALAR 4
2.1.ERKEK ÜREME SSİSTEMİ 4
2.1.1. Testisin Histolojik Yapısı 4
2.1.2. Seminifer Tübüller ve Testiküler Hücreler 4
2.2 SPERMATOGENEZ 5
2.2.1.Spermatogenez Evreleri 5
2.2.2. Sperm Hücresinin Yapısı ve Özellikleri 8
2.3. VARİKOSEL 10
2.3.1 Varikoselin Oluşum Mekanizması 11
2.3.2. Varikoselin Testis ve Sperm Üzerine Etkileri 11
2.4. UBİKİTİN PROTEAZOM SİSTEMİ 12
2.4.1. Ubikitiniasyon Mekanizması 13
2.4.2. UPS'nin Spermatogenezdeki Rolü 14
2.5. NEDL2 VE HÜCRESEL PROTEİN YIKIMINDAKİ ROLÜ 14
3. YÖNTEM 16
3.1.ÇALIŞMADA KULLANILAN MALZEMELER 17
3.1.1.Kimyasallar ve Solüsyonlar 17
3.1.2. Deneyde Kullanılan Antikorlar 18
3.1.3.Kullanılan Cihazlar 18
3.2.SİTOLOJİK İŞLEMLER 19
3.2.1. Sperm Analizi 19
3.2.2 Kruger Strict 20
3.2.3.İmmünofloresan Yöntemi 21
3.2.4. Akım (Flow) Sitometri 22
3.2.5.Western Blot Yöntemi 23
3.2.6. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE İSTATİKSEL ANALİZLER 25
4.BULGULAR 26
4.1. SPERM HÜCRELERİNDE SEMEN ANALİZİ SONUÇLARI 26
4.2. SPERM HÜCRELERİNDE KRUGER STRİCT ANALİZİ 31
..... 34
4.3. SPERM HÜCRELERİNDE NEDL2 LOKALİZASYONUNUN VE EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ 34
4.4. SPERM HÜCRELERİNDE NEDL2 EKSPRESYONUNUN AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 48
4.5. SPERM HÜCRELERİNDE NEDL2 EKSPRESYONUNUN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 50

4.TARTIŞMA 52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 68
6. KAYNAKLAR 69
EKLER 73
EK1. 73
ÖZGEÇMİŞ 74

TABLOLAR

Tablo 3. 1. Normal Spermiyogram Parametreleri 20
Tablo 3. 2. IF Protokol Basamakları 22

Tablo 4. 1. Kontrol Bireylere Ait Standart Semen Analizi Sonuçları 27
Tablo 4. 2. Varikosel Bireylere Ait Standart Semen Analizi Sonuçları 28
Tablo 4. 3. Kontrol ve Varikosel Bireylere Ait Spermiyogram Sonuçları Karşılaştırılması 30
Tablo 4. 4. Kruger Morfolojisi Sonuçları Analizi 32
Tablo 4. 5. Kontrol Grubuna Ait Sperm Hücrelerinde NEDL2 Lokalizasyonunun Bölgesel Dağılımı (sayı ve %) 35
Tablo 4. 6. Varikosel Grubuna Ait Sperm Hücrelerinde NEDL2 Lokalizasyonunun Bölgesel Dağılımı (sayı ve %) 35
Tablo 4. 7. Kontrol ve Varikosel Grubuna Ait Bireylerin Sperm Hücrelerinde NEDL2 Lokalizasyonu 36
Tablo 4. 8. Kontrol Grubu ve Varikosel Grubundaki Bireylere Ait Boyama Paternlerinin karşılaştırılmalı Sonuçları 37

ŞEKİLLER

Şekil 2. 2 Spermatogenezin şematik gösterimi 6
Şekil 2. 3 Spermiyogenezin şematik gösterimi 8
Şekil 2. 4 Sperm hücresinin yapısal organizasyonu. 10
Şekil 2. 5 Varikosel diyagramı 12
Şekil 2. 6 Ubikitin-proteasom sistemi (UPS) ve ilişkili protein yıkım mekanizmalarının şematik gösterimi 13

Şekil 3. 1. Deney Akış Planı 16

Şekil 4. 1.Kontrol ve varikosel gruplarına ait sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, total motilite ve ileri hareketli sperm (PR) oranlarının bireysel dağılımı. 31
Şekil 4. 2.Kontrol ve varikosel bireylere ait sperm morfolojilerinin Kruger strict ile gösterilmesi 33
Şekil 4. 3.Kontrol ve varikosel gruplarında normal sperm sayısı, sperm morfolojik anomalileri (baş, boyun ve kuyruk) ile normal ve anormal sperm yüzdelerinin karşılaştırılması. 34
Şekil 4. 4. Kontrol (n:7) ve varikosel (n:7) bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 boyanma paternlerinin yüzdesel dağılımı. 39
Şekil 4. 5. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde birinci boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) VE birleşik görüntü (D) 39
Şekil 4. 6. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde ikinci boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D) 40
Şekil 4. 7. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde üçüncü boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D) 41
Şekil 4. 8. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde dördüncü boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D) 41
Şekil 4. 9. Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde birinci boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D) 43
Şekil 4. 10. Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde ikinci boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D) 44

Şekil 4. 11. Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde üçüncü boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D) 45
Şekil 4. 12. Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde dördüncü boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D) 46
Şekil 4. 13. Kontrol (n:7) ve varikosel (n:7) bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 immünoreaktivitesinin lokalizasyon paternlerinin yüzdesel dağılımı. 47
Şekil 4. 14. Kontrol bireylerde akım sitometrik analizler ile NEDL2 ekspresyonunun gösterilmesi. 48
Şekil 4. 15. Varikosel bireylerde akım sitometrik analizler ile NEDL2 ekspresyonunun gösterilmesi. 49
Şekil 4. 16. NEDL2 ekspresyonunun kontrol ve infertil bireylerde akım sitometrik yöntemle karşılaştırılmalı olarak değeri. 50
Şekil 4. 17. NEDL2 ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi.....51
Şekil 4. 18. NEDL2 ekspresyonunun kontrol ve varikosel bireylerde western blot analizi ile karşılaştırmalı olarak değeri..... 51

SİMGELER VE KISALTMALAR

C°	:	Santigrat derece
µg	:	Mikrogram
µm	:	Mikrometre
ATG	:	Otofaji ilişkili gen/protein
ATP	:	Adenozin trifosfat
DAPI	:	4′,6-diamidino-2-phenylindole
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DUB	:	deubikitinaz enzimler
E1	:	ubikitin aktive edici enzim
E2	:	ubikitin konjugasyon enzimi
E3	:	ubikitin ligaz
Gly76	:	Glisin (Glycine)
mA	:	Miliamper
NEDL2	:	NEDD4-benzeri ubikitin ligaz 2
NGS	:	Normal keçi serumu
NP-40	:	Nonidet P-40
PBS	:	Fosfat Tamponlu Çözelti
pH	:	Hidrojen gücü
PKA	:	Protein kinaz A
PSA	:	Pisum sativum agglutinin
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
UPS	:	Ubikiti-Proteazom Sistemi
ZP	:	Zona Pellucida

1.GİRİŞ

Klinik infertilite, çiftlerin düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen en az bir yıl süreyle gebelik elde edememesi durumu olarak tanımlanmakta olup dünya genelinde çiftlerin yaklaşık %20–25'ini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. İnfertilite yalnızca fiziksel değil, aynı zamanda psikolojik ve sosyal açıdan da bireylerin yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. İnfertilitenin gelişiminde hem kadın hem de erkek kaynaklı faktörler rol oynamakta, erkek kaynaklı faktörlerin ise infertilite vakalarının yaklaşık %30–50'sinden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Szamatowicz & Szamatowicz, 2020). Erkek infertilitesine neden olan faktörler arasında hormonal bozukluklar, erektil disfonksiyon, genetik anomaliler ve varikosel gibi çeşitli patolojiler yer almaktadır. Bu nedenler arasında varikosel, %12,3'lük oran ile önemli bir yer tutmakta ve erkek infertilitesinin en yaygın nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Erdemir & Kılıç, 2011) .

Varikoselin klinik önemi, erkek infertilitesine neden olan patolojiler arasında cerrahi olarak düzeltilebilir en sık faktörlerden biri olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, varikoselektomi sonrasında semen parametrelerinde iyileşme görülmesine rağmen spontan gebelik oranlarının her hastada aynı düzeyde artış göstermemesi, hastalığın patofizyolojisinin tam olarak açıklanamadığını düşündürmektedir. Varikosel, skrotum içerisinde bulunan pampiniform pleksus venlerinin anormal genişlemesi ile karakterize vasküler bir hastalık olup çoğunlukla sol tarafta görülmektedir. Bunun temel nedeninin, sol testiküler venin anatomik drenaj özellikleri ve artmış hidrostatik basınca maruz kalması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca varikoselli erkeklerin yaklaşık yarısında bilateral tutulum görülebilmektedir (Alsaikhan vd., 2016). Varikosel, genel erkek popülasyonunun yaklaşık %15'inde görülürken, primer infertilitesi bulunan erkeklerde bu oran %30–40'a, sekonder infertilitesi olan erkeklerde ise %80'in üzerine çıkabilmektedir. Hastalığın bazı olgularda testiküler atrofi, spermatogenik bozukluk, hormonal düzensizlik ve sperm DNA hasarı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Johnson & Sandlow, 2017). Varikosel sonucunda gelişen skrotal hipertermi, testisin fizyolojik olarak ihtiyaç duyduğu düşük sıcaklık dengesini bozmakta ve bu durum spermatogenezin olumsuz etkilenmesine yol açmaktadır (Arya vd., 2022). Bununla birlikte, genel popülasyonda varikoselin yüksek prevalansa sahip olması ve bazı

hastalarda semen parametrelerinin normal sınırlar içerisinde bulunması, varikosel ile infertilite arasındaki ilişkinin yalnızca tek bir mekanizma ile açıklanamayacağını göstermektedir (World Health Organization, 1992). Bu nedenle varikoselin fertilite üzerindeki etkilerinin multifaktöriyel mekanizmalar çerçevesinde değerlendirilmesi gerekmektedir.

Günümüzde varikoselin neden olduğu hücresel ve moleküler değişikliklerin tamamı tam olarak aydınlatılmamış olsa da oksidatif stres, hipoksi, toksik metabolit reflüsü, hipogonadizm ve ağır metal birikimi gibi çeşitli mekanizmaların varikosel kaynaklı testiküler hasarda etkili olduğu düşünülmektedir (Karakeçi & Orhan, 2019). Bu mekanizmaların altında yatan moleküler etkileşimlerin araştırılması, varikosel kaynaklı infertilitenin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Ubikitin-proteazom sistemi (UPS), antijen sunumu, hücre döngüsü kontrolü, apoptozis, hücresel sinyal iletimi ve transkripsiyon gibi birçok biyolojik süreçte görev alan temel hücre içi protein yıkım mekanizmasıdır. Bu sistem, düzenleyici proteinlerin kontrollü yıkımını sağlayarak hücresel homeostazın korunmasında önemli rol üstlenmektedir (Ciechanover & Iwai, 2004 ; Varshavsky, 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalar, UPS'nin yalnızca genel hücresel mekanizmalarda değil, aynı zamanda erkek üreme sistemi üzerinde de önemli etkileri bulunduğunu ortaya koymuştur. Özellikle sperm kapasitasyonu, akrozomal reaksiyon ve zona pellusida bağlanması gibi fertilizasyon basamaklarında UPS'ye ait proteinlerin aktif rol aldığı bildirilmektedir.

NEDD4 benzeri ubikitin ligaz 2 (NEDL2/HECW2) UPS'ye ait önemli proteinlerden biridir. N-terminalinde C2 alanı ve WW protein-protein etkileşim modülleri ile C-terminalinde HECT ubikitin ligaz alanı içeren HECT tipi bir ubikitin ligazıdır. NEDL2'nin temel işlevi ubikitin ligaz aktivitesi olmakla birlikte, hücresel fonksiyonları henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Mao vd., 2020). Yapılan çalışmalar, NEDL2'nin p73'ün transkripsiyonel aktivitesini artırdığını ve laminin yanlış eksprese edildiği hücrelerde ATR kinazının yıkımında rol oynadığını göstermektedir. Bununla birlikte, diğer HECT tipi ubikitin ligazlarının iyi tanımlanmış fonksiyonlarıyla karşılaştırıldığında, NEDL2'nin işlevi ve düzenlenme mekanizmaları hakkında

literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Lu vd., 2013). NEDL2'nin sperm kapasitasyonu ve apoptozis süreçlerinde görev alması, bu proteinin varikosel ile ilişkili moleküler mekanizmalarda da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle NEDL2 proteininin varikosel ile ilişkisinin araştırılması, erkek infertilitesinin moleküler temellerinin anlaşılmasına katkı sağlayabilecek önemli ve özgün bir çalışma alanı oluşturmaktadır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışmasının amacı varikosel patogenezinde UPS'nin olası rolünü NEDL2 proteini üzerinden araştırmak ve NEDL2 ekspresyonu ile klinik semen parametreleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Böylece, NEDL2'nin varikosel ilişkili infertilitede tanısal ve prognostik değere sahip potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirilecektir.

Sonuç olarak, NEDL2 proteininin varikoselli bireylerden elde edilen spermatozoalarda ekspresyonunun literatürde yeterince araştırılmamış olması, varikosel ilişkili infertilitenin moleküler patogenezinin aydınlatılması ve yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi açısından bu tez çalışmasına özgünlük kazandırmaktadır.

Bu kapsamda çalışmanın temel hipotezi; varikoselin, ubikitin proteazom sisteminin önemli bileşenlerinden biri olan NEDL2'nin ekspresyonunu etkileyebileceğini ve bu değişikliğin varikosel ilişkili infertilitenin patogenezinde rol oynayabileceğidir. Ayrıca, NEDL2 ekspresyon düzeyinin varikoselin tanısında kullanılabilecek potansiyel bir biyobelirteç olabileceği öngörülmektedir.

2.İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

2.1.ERKEK ÜREME SSİSTEMİ

Erkek üreme sistemi; testisler, genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri ve penisten oluşan kompleks bir sistemdir. Aksesuar bezler arasında veziküla seminalis, prostat ve bulbouretral bezler yer almakta olup bu yapılar spermin taşınması, korunması ve fonksiyon kazanmasında önemli görev üstlenmektedir. Sistemin temel organı olan testis ise hem spermatogenez yoluyla sperm üretimini gerçekleştirmekte hem de başta testosteron olmak üzere androjen hormonlarının sentezinden sorumlu bulunmaktadır. Androjenler yalnızca spermatogenezin devamı için değil, aynı zamanda embriyonik dönemde erkek fenotipinin gelişimi, sekonder cinsiyet karakterlerinin oluşumu ve erkek üreme fonksiyonlarının düzenlenmesi açısından da kritik öneme sahiptir. Bu nedenle erkek üreme sistemi, hormonal düzenleme ile histolojik organizasyonun birbiriyle yakın ilişki içinde olduğu dinamik bir biyolojik sistem olarak değerlendirilmektedir (Ross & Pawlina, *Histology: A Text and Atlas*, 2020).

2.1.1. Testisin Histolojik Yapısı

Testisler, vücut boşluğu dışında yer alan skrotum içerisine uzanan oval şekilli çift üreme organlarıdır. Testislerin bu konumu vücut ısısından 2-3°C daha düşük sıcaklıkta olmasını sağlamaktadır. Her bir testis, yoğun bağ dokusundan oluşan tunika albuginea ile çevrili olup bu kapsülden uzanan bağ dokusu bölmeleri testis parankimini yaklaşık 200–300 lobüle ayırmaktadır. Her lobül içerisinde, bir ila üç seminifer tübül bulunmaktadır. Lobüller içerisinde spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüller bulunurken, tübüller arasındaki interstisyel dokuda testosteron sentezinden sorumlu Leydig hücreleri ve çeşitli destek hücreleri yer almaktadır. Yetişkin bir insan testisinin ortalama hacmi yaklaşık 30 mL'dir (Neto vd., 2016; Suede vd., 2023).

2.1.2. Seminifer Tübüller ve Testiküler Hücreler

Testisin fonksiyonel birimi olarak kabul edilen seminifer tübüller, organ hacminin büyük bölümünü oluşturur. Histolojik olarak seminifer tübüller; bazal membran, Sertoli hücreleri ve farklı gelişim evrelerinde bulunan germ hücrelerinden meydana gelmektedir.

İnsan testisinde şimdiye kadar spermatogenezin farklı aşamalarını temsil eden 13 farklı germ hücresi tipi tanımlanmıştır. Seminifer tübüller arasında bulunan interstisyel dokuda ise testosteron sentezinden sorumlu Leydig hücreleri ile çeşitli destek hücreleri yer almaktadır. Ayrıca tübülleri çevreleyen peritübüler doku; miyoid hücreler, fibroblast benzeri hücreler ve kollajen liflerden oluşmakta olup Sertoli hücreleri ile birlikte kan-testis bariyerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Neto vd., 2016a).

2.2 SPERMATOGENEZ

Spermatogenez, erkek gonadlarında yer alan seminifer tübüller içerisinde gerçekleşen ve ilkel germ hücrelerinden olgun spermatozoaların oluşumuna kadar ilerleyen kompleks bir hücresel farklılaşma sürecidir. Bu süreç, erkek fertilitesinin temel belirleyicilerinden biri olup, hücresel, moleküler ve hormonal mekanizmaların hassas bir dengesi ile düzenlenmektedir. Spermatogenezin herhangi bir aşamasında meydana gelen aksaklıklar, sperm üretiminde niceliksel veya niteliksel bozukluklara yol açarak infertilite ile sonuçlanabilmektedir (Griswold, 2016; de Kretser vd., 1998; Walker, 2011).

2.2.1.Spermatogenez Evreleri

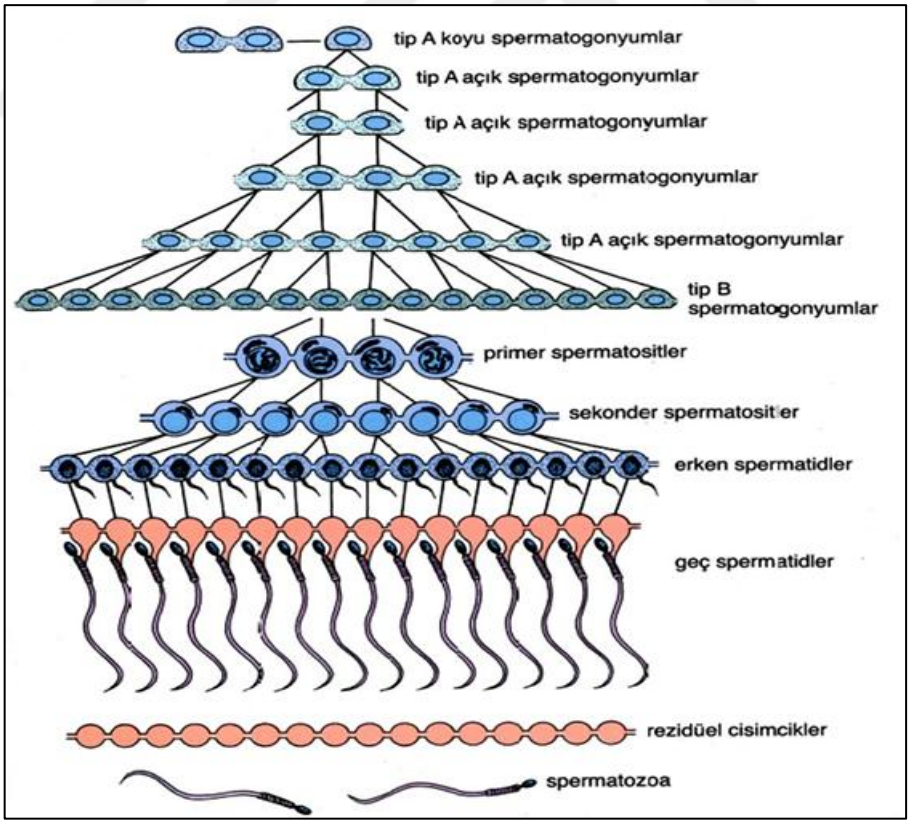
Spermatogenez üç farklı evreye ayrılmaktadır;

- Spermatogonyal (mitotik) faz,
- Spermatosit (mayoz) faz,
- Spermatid (spermiyogenesiz) faz.

Spermatogonyal faz (mitotik çoğalma): Spermatogonyal fazda, bazal membrana komşu olarak bulunan spermatogonyumlar mitoz bölünmeler ile çoğalarak hem kök hücre havuzunu korumakta hem de farklılaşacak hücreleri oluşturmaktadır. Bu bağlamda, spermatogonyal kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesi, sürecin sürekliliği açısından kritik bir rol oynamaktadır (Oatley & Brinster, 2012). Bu hücreler morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre Tip A ve Tip B olarak sınıflandırılmaktadır. **Tip A spermatogonyumlar** kök hücre özelliği göstererek kendini yenileme kapasitesini sürdürürken, bir kısmı farklılaşarak **Tip B spermatogonyumlara** dönüşmektedir. Tip B spermatogonyumlar ise farklılaşma yönü belirlenmiş hücreler olup primer spermatositleri oluşturmaktadır (Ross Histology: A Text and Atlas). Ayrıca bu

hücrelerin niş mikro çevresi ile olan etkileşimleri, hücresel dengeyi belirleyen temel faktörler arasında yer almaktadır (Yoshida, 2016). Bu aşamada meydana gelen bozuklukların, germ hücre rezervinde azalmaya yol açarak uzun vadede sperm üretim kapasitesini düşürebileceği belirtilmektedir (de Rooij, 2017).

Spermatosit faz (mayotik bölünme): Spermatogonyal fazı takiben spermatogonyumların farklılaşmasıyla **primer spermatositler** oluşmakta ve bu hücreler mayotik bölünmeye girerek genetik materyalin yeniden düzenlendiği ve haploid hücrelerin oluştuğu mayotik evreyi başlatmaktadır. Mayoz I bölünmesi sırasında homolog kromozomlar arasında gerçekleşen crossing-over olayları genetik çeşitliliğin temelini oluştururken, mayoz II bölünmesi sonucunda haploid spermatidler meydana gelmektedir. Bu süreçte özellikle DNA bütünlüğünün korunması ve kromozomal segregasyonun hatasız gerçekleşmesi, fertilite açısından kritik öneme sahip olmaktadır (Handel & Schimenti, 2010). Mayotik evrede meydana gelen aksaklıkların anöploidi, spermatogenik duraksama ve germ hücre kaybı ile ilişkili olduğu ve erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden birini oluşturduğu bildirilmektedir (Oakberg, 1956).



Şekil 2. 1. Spermatogenezin şematik gösterimi
(Ross & Pawlina, *Histology: A Text and Atlas*, 2020.)

Spermatid faz (spermiogenez): Spermatogenezin son evresi olan spermatid fazda ise, yuvarlak spermatidlerin olgun spermatozoalara dönüştüğü, hücre bölünmesinin olmadığı ancak belirgin yapısal değişimlerin gerçekleştiği bir farklılaşma sürecidir (Bao & Bedford, 2016). Bu evredeki değişimler, spermatidin hareket ve fertilizasyon yeteneği kazanmasını sağlamaktadır ve dört temel evrede incelenmektedir;

- Golgi fazı
- Kep fazı
- Akrozom fazı
- Olgunlaşma fazı

Golgi fazı: Bu başlangıç evresinde spermatid sitoplazmasında çekirdeğe yakın konumlanmış belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum yapıları bulunmaktadır. Golgi kompleksinde biriken ve PAS-pozitif özellik gösteren pro-akrozomal granüller zamanla birleşerek akrozomal vezikülü oluşturmaktadır. Glikoprotein açısından zengin bu yapı, çekirdek zarfına komşu şekilde konumlanır ve spermin anterior kutbunun belirlenmesinde rol oynamaktadır. Aynı süreçte sentriyoller hücrenin posterior kısmına doğru yer değiştirerek flagellumun temelini oluşturan aksonemin gelişimini başlatmaktadır (Neto vd., 2016)

***Kep (cap) fazı*:** Bu evrede akrozomal vezikül genişleyerek yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını örter ve "akrozomal kep" adı verilen yapı oluşmaktadır. Bu süreçte çekirdek zarfındaki porlar kaybolmakta ve akrozom hidrolitik enzimler açısından zengin olgun bir organel haline gelmektedir (L. O'Donnell vd., 2011).

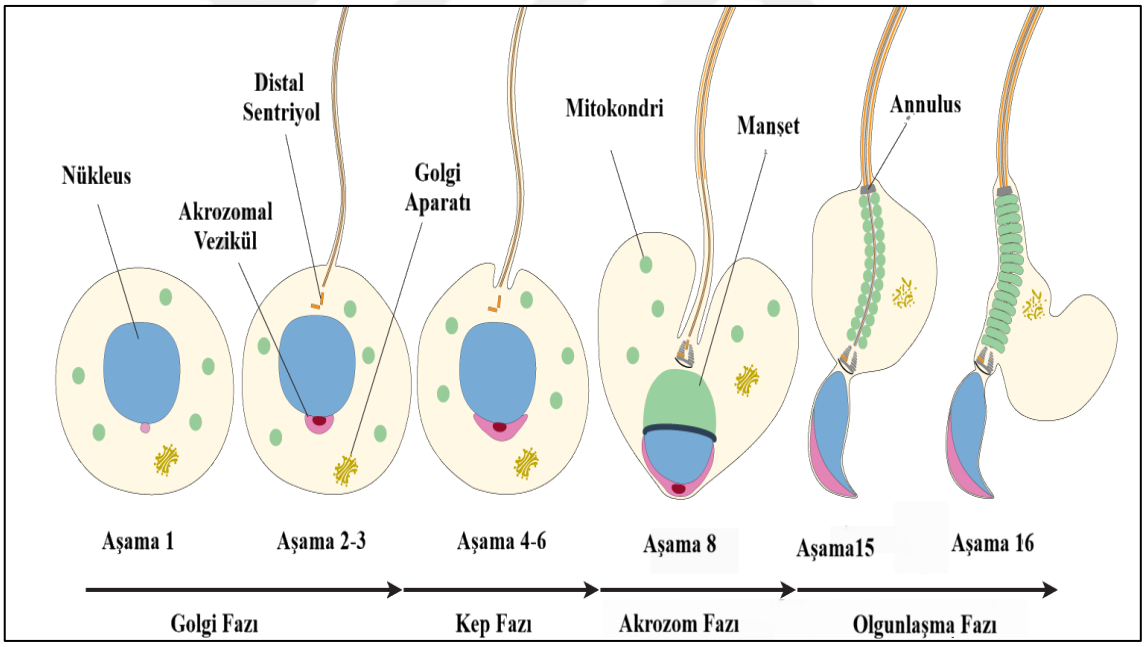
***Akrozom fazı*:** Spermatid bu aşamada yeniden organize olarak seminifer tübüllerin bazaline yönelirken gelişen flagellum lümene doğru uzanmaktadır. Çekirdek yoğunlaşır, uzar ve yassılaşır; akrozom ile birlikte hücrenin anterior kısmında yer alır. Sitoplazma posterior bölgeye doğru kayar. Bu evrede mikrotübüllerden oluşan "manşet" yapısı, hücre şekillenmesinde geçici destek sağlar. Sentriyollerden gelişen yapılar, aksonemin çevresinde dış yoğun lifleri oluşturur ve kuyruk yapısının organizasyonuna katkıda bulunur. Ayrıca mitokondriler orta parça bölgesinde helikal bir dizilim oluşturarak sperm hareketi için gerekli enerjinin sağlanmasına katkıda bulunur (Lehti & Sironen, 2017).

Flagellum yapısı; orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç ana bölümde incelenir. Orta parçada mitokondriyal kılıf belirginken, esas parçada fibröz kılıf yapısı

hâkimdir ve en uzun segmenti oluşturur. Distalde yer alan son parça ise daha kısa bir segment olarak tanımlanır (Neto vd., 2016).

Akrozom, hyalüronidaz, akrozin ve çeşitli proteazlar gibi enzimler içeren özelleşmiş bir lizozomal yapı olarak kabul edilir. Fertilizasyon sırasında gerçekleşen akrozom reaksiyonunda bu enzimler salgılanarak spermatozoanın oosit çevresindeki yapıları aşmasını sağlar. Hyalüronidaz korona radiata geçişinde rol oynarken, akrozin ve benzeri enzimler zona pellucidanın parçalanmasına katkıda bulunur (Buffone vd., 2014).

***Olgunlaşma (maturasyon) fazı*:** Son aşamada spermatid çevresindeki fazla sitoplazma uzaklaştırılır ve rezidüel cisimler oluşur. Bu yapılar Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Aynı zamanda hücreler arası bağlantıları sağlayan intersellüler köprüler ortadan kalkar ve spermatidler bağımsız hale gelir. Sertoli hücrelerinden olgun spermlerin lümene bırakılması "spermiasyon" olarak adlandırılır. Bu süreçte hücre adezyon molekülleri ve özellikle integrin ilişkili sinyal mekanizmalarının düzenleyici rol oynadığı düşünülmektedir (L. O'Donnell vd., 2011, 2011).



Şekil 2. 2**.** Spermiyogenezin şematik gösterimi
(Miyata vd., 2024).

2.2.2. Sperm Hücresinin Yapısı ve Özellikleri

Spermiyogenez sürecinin tamamlanmasının ardından oluşan olgun spermatozoon, ileri derecede özelleşmiş bir hücre olup baş, boyun (bağlantı parçası), orta parça ve kuyruk olmak üzere dört ana bölümden oluşur. Olgun bir insan spermi yaklaşık olarak 60

μm uzunluğa sahiptir. Bu yapısal organizasyon, sperm hücresinin fertilizasyon yeteneğini kazanması açısından kritik öneme sahiptir (Neto vd., 2016a).

Sperm başı, yoğunlaşmış kromatin içeren çekirdek ile bunun ön kısmını örten akrozomdan meydana gelir. Spermiyogenez sırasında histonların büyük ölçüde protaminlerle yer değiştirmesi sonucunda DNA yüksek derecede paketlenmiş hale gelir ve bu durum genetik materyalin korunmasını sağlar. Akrozom ise Golgi kökenli olup hyalüronidaz, akrozin ve çeşitli proteolitik enzimler içerir; bu enzimler fertilizasyon sırasında oosit çevresindeki yapıların geçilmesinde görev alır (Buffone vd., 2014).

Boyun bölgesi, sperm başı ile kuyruk arasında bağlantıyı sağlayan ve sentriyol kökenli yapılar içeren bir segmenttir. Bu bölge, flagellum organizasyonunun başlangıç noktasıdır. Distal sentriyol, bazal cisimcik olarak işlev görerek aksonem oluşumunu başlatır ve sperm kuyruğunun temel iskeletini oluşturan mikrotübül düzenini organize etmektedir (Lehti & Sironen, 2017).

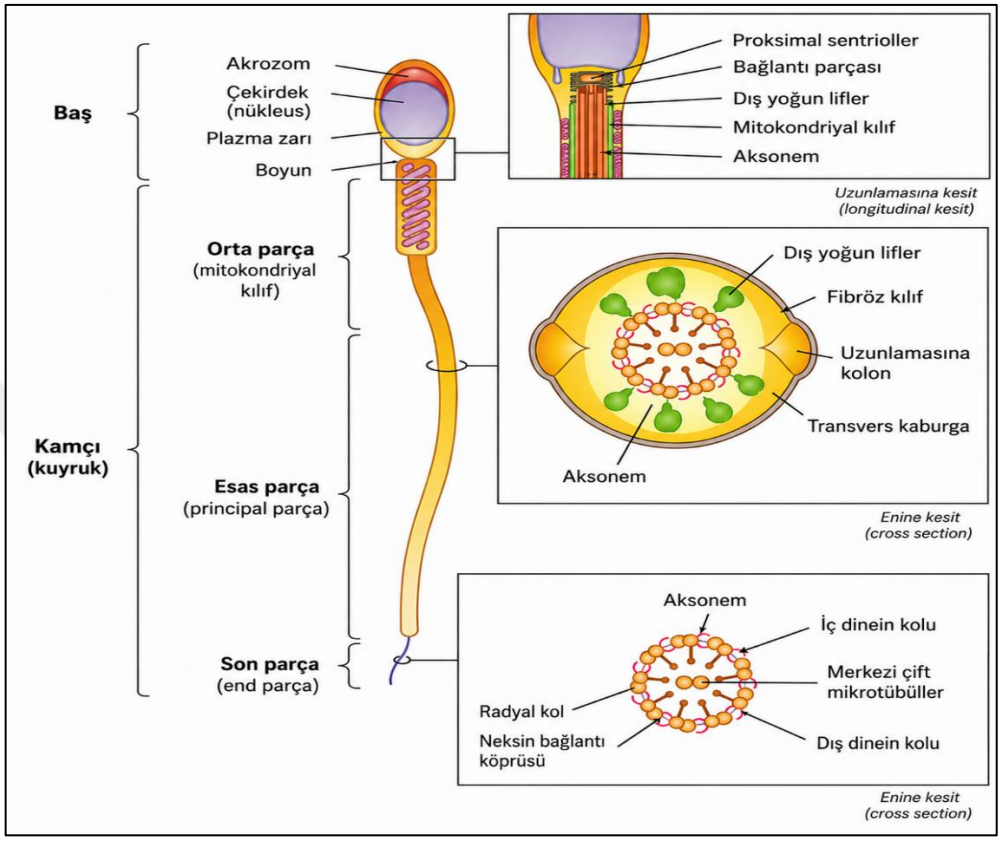
Orta parça, aksonem etrafında helikal şekilde dizilmiş mitokondrilerden oluşur. Bu mitokondriyal kılıf, sperm motilitesi için gerekli olan ATP üretimini sağlar. Orta parçada ayrıca dış yoğun lifler (outer dense fibers) bulunur ve bu yapılar mekanik destek sağlayarak flagellumun stabilitesine katkıda bulunur (Neto vd., 2016a).

Kuyruğun esas parçası, aksonemin etrafını saran fibröz kılıf ile karakterizedir ve sperm hareketinin büyük kısmından sorumludur. En distal kısım olan son parça ise yalnızca aksonem yapısından oluşur. Aksonem, dokuz çift periferik ve iki merkezi mikrotübülden oluşan klasik “9+2” düzenine sahiptir ve bu yapı sperm hareketinin temelini oluşturur (Lehti & Sironen, 2017).

Sonuç olarak olgun spermatozoon hem genetik materyalin taşınmasını hem de aktif hareket kabiliyeti ile fertilizasyonun gerçekleşmesini sağlayacak şekilde ileri düzeyde farklılaşmış bir hücredir. Bu kompleks yapının doğru organizasyonu, erkek fertilitesi açısından belirleyici bir faktördür (Neto vd., 2016a).

Spermatogenez ve spermiyogenez süreçlerinin koordineli ilerlemesi sonucunda oluşan olgun spermatozoonun yapısal ve fonksiyonel özellikleri, fertilizasyon başarısını

doğrudan belirlemektedir. Bununla birlikte, testiküler fizyolojiyi etkileyen bazı patolojik durumlar bu süreci sekteye uğratabilmektedir. Bu patolojiler arasında en sık karşılaşılanlardan biri varikoseldir.



Şekil 2. 3. Sperm hücresinin yapısal organizasyonu.
(Teves & Roldan, 2022)

2.3. VARİKOSEL

Varikosel, skrotumda yer alan pampiniform pleksusun anormal venöz dilatasyonu ve genişlemesi ile karakterize bir klinik durum olarak tanımlanmaktadır. Varikoselin çoğunlukla sol testiste görüldüğü, ancak olguların yaklaşık %50'sinde bilateral tutulumun da eşlik ettiği bildirilmektedir. Erkek popülasyonunda varikosel prevalansının yaklaşık %15 olduğu, primer infertiliteye sahip erkeklerde bu oranın %30–40'a, sekonder infertilite olgularında ise %85'e kadar yükseldiği rapor edilmiştir (Alsaikhan vd., 2016b). Bu bulgular, varikoselin erkek faktörlü infertilitenin en sık karşılaşılan etiyolojik nedenlerinden biri olduğunu ortaya koymaktadır.

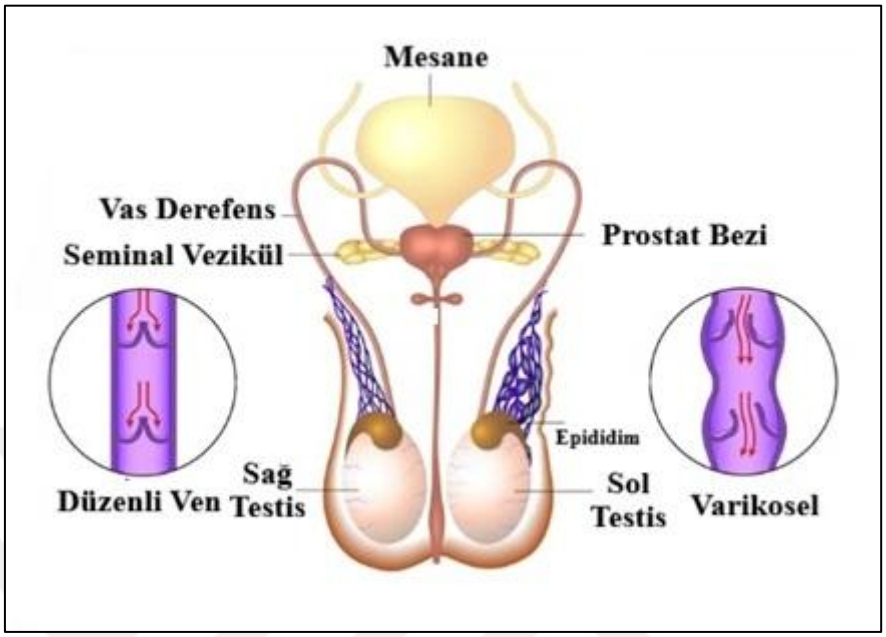
2.3.1 Varikoselin Oluşum Mekanizması

Varikosel, erkek infertilitesinin en sık düzeltilebilir nedenlerinden biri olarak kabul edilen vasküler bir patolojidir. Varikosel patogenezinin temelinde, testiküler venlerde venöz dönüşün bozulması, venöz kapak yetmezliği ve buna bağlı olarak venöz basıncın artması sonucu pampiniform pleksusta venöz stazın meydana gelmesidir. Özellikle sol testiküler venin sol renal vene dik açıyla açılması ve daha yüksek hidrostatik basınca maruz kalması nedeniyle varikosel olgularının büyük çoğunluğu sol tarafta görülmektedir (Leslie vd., 2023). Venöz staz sonucunda testiküler sıcaklık artışı, hipoksi, oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi meydana gelmekte; bu durum spermatogenezin bozulmasına ve testiküler mikrosirkülasyonun olumsuz yönde etkilenmesine yol açmaktadır (Galea vd., 2023). Güncel moleküler çalışmalar, varikoselin yalnızca hemodinamik bir bozukluk olmadığını; aynı zamanda inflamatuvar yanıtlar, mitokondriyal disfonksiyon ve gen ekspresyonundaki değişiklikler gibi çeşitli moleküler mekanizmaların da hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Munoz-Lopez vd., 2024).

2.3.2. Varikoselin Testis ve Sperm Üzerine Etkileri

Varikosel varlığında, bazı hastalarda testis hacminde azalma, spermatogenik fonksiyonlarda bozulma, endokrin işlevlerde düzensizlik ve sperm DNA bütünlüğünde hasar gibi çeşitli testiküler patolojiler gelişebilmektedir (Johnson & Sandlow, 2017b). Varikoselin neden olduğu skrotal hipertermi, testislerin spermatogenez için ihtiyaç duyduğu vücut sıcaklığından yaklaşık 2–3 °C daha düşük ortamın korunmasını engelleyerek bu sürecin olumsuz etkilenmesine yol açmaktadır. Bunun yanı sıra artan venöz basınç, basıncı dengelemek amacıyla küçük damarlarda daralmaya neden olmakta, bu durum testise giden kan akımını azaltarak oksijen ve besin taşınmasını kısıtlamakta ve sonuçta hipoksiye yol açabilmektedir. Ayrıca varikosel, testiküler mikroçevrede değişiklik oluşturarak Leydig hücre fonksiyonlarını bozmakta ve testosteron üretimini olumsuz etkileyebilmektedir. Venöz kapak yetmezliğine bağlı olarak gelişen reflü ile toksik maddelerin testis dokusuna ulaşması da bu sürece katkı sağlamaktadır. Tüm bu mekanizmalar sonucunda artan reaktif oksijen türleri, sperm hücrelerinde zar hasarı, DNA parçalanması ve hücre ölümü gibi olumsuz etkiler oluşturarak spermatogenez

sürecini ve sperm fonksiyonlarını bozmakta, dolayısıyla fertilite kapasitesinin azalmasına neden olabilmektedir (Arya vd., 2022)



Şekil 2. 4**.** Varikosel diyagramı
(Al-Yousef, 2025)

Varikoselin oluşturduğu hipertermi, hipoksi ve oksidatif stres gibi olumsuz testiküler koşullar yalnızca spermatogenezi doğrudan etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda hücresel protein dengesinin korunmasında kritik rol oynayan ubikiitin proteazom sisteminin işleyişini de bozabilmektedir. Bu nedenle varikoselin moleküler düzeydeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için ubikitin sistemine ilişkin mekanizmaların incelenmesi önem kazanmaktadır.

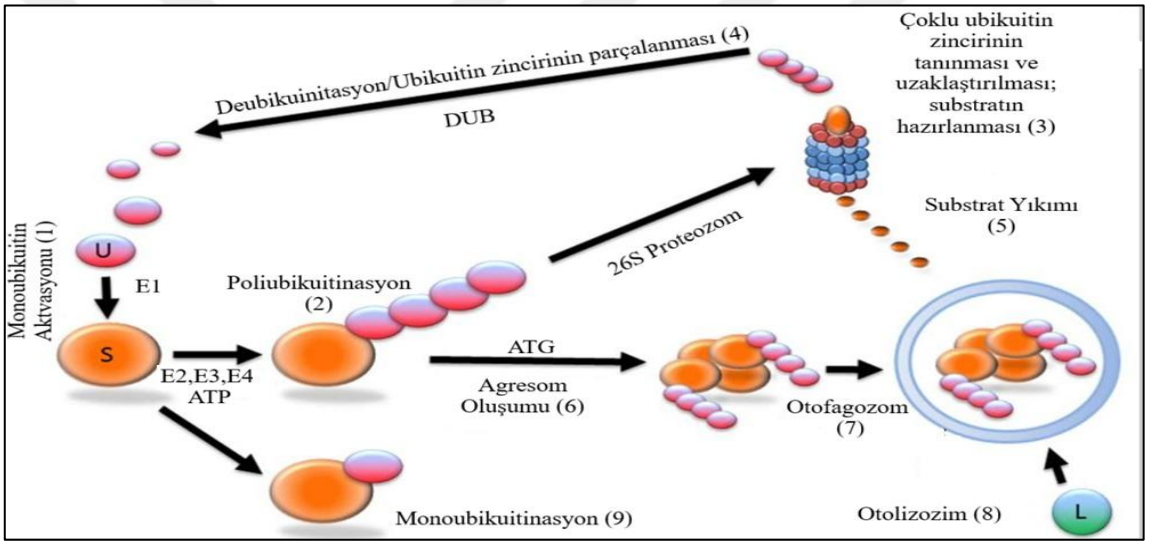
2.4. UBİKİTİN PROTEAZOM SİSTEMİ

Ubikitin–proteazom sistemi (UPS), hücresel protein yıkımının düzenlenmesinde ve bazı durumlarda protein aktivitesinin kontrolünde kritik bir rol üstlenmektedir. Ubikitin, mayadan insana kadar yüksek düzeyde korunmuş olup 76 amino asitten oluşan küçük bir polipeptittir ve yalnızca iki amino asitlik sınırlı bir varyasyon göstermektedir. UPS'in işleyişi, ubikitin aktive edici enzim (E1), ubikitin konjugasyon enzimi (E2) ve ubikitin ligaz (E3) olmak üzere üç basamaklı bir enzimatik kaskad aracılığıyla başlatılmaktadır. Bu sistemde ubikitin, C-terminalindeki glisin (Gly76) kalıntısı

üzerinden hedef proteinlerdeki veya diğer ubikitin moleküllerindeki lizin kalıntılarına kovalent bağlanarak aktarılmaktadır. Özellikle E3 ligazların substrat spesifitesi, sistemin etkinliği açısından kritik öneme sahiptir (Xiong vd., 2022).

2.4.1. Ubikitiniasyon Mekanizması

Çoğu durumda poli-ubikitin zinciri ile işaretlenen proteinler, proteazom kompleksi tarafından tanınarak yıkıma uğratılmakta ve böylece fonksiyonları sonlandırılmaktadır. Ancak bazı durumlarda bu zincir, deubikitinaz enzimleri (DUB'lar) tarafından uzaklaştırılabilmekte ve hem ubikitin hem de hedef protein geri dönüştürülebilmektedir.



Şekil 2. 5 Ubikitin-proteasom sistemi (UPS) ve ilişkili protein yıkım mekanizmalarının şematik gösterimi
(Sutovsky, 2018).

Süreç monoubikitin aktivasyonu ile başlayarak E1 aktivasyon enzimi, E2 konjugasyon enzimi ve E3 ubikitin ligaz aracılığıyla hedef proteinlerin poliubikitin zincirleri ile işaretlenmesiyle devam eder, bu işaretleme 26S proteazom tarafından tanınarak ATP bağımlı şekilde substratın küçük peptitlere ayrılmasını sağlar; deubikitinazlar (DUB) ubikitin zincirlerini geri kazanırken, sistem içinde yer alan alternatif yollarla yıkılamayan proteinler agresom oluşumu ve otofaji–lizozom sistemi (ATG proteinleri aracılığıyla otofagozom ve otolizozom oluşumu) ile elimine edilir,

ayrıca monoubikitinasyon bazı proteinlerin proteazom dışı hücresel süreçlerde fonksiyon görmesine aracılık eder.

Proteazomlar, ubikitin–proteazom sisteminin (UPS) temel bileşenleri olup protein yıkımının merkezi yürütücüleridir ve 20S çekirdek parçacık (core particle, CP) ile bir veya iki düzenleyici parçacıktan (regulatory particle, RP) oluşmaktadır. 20S CP, yaklaşık 750 kDa molekül ağırlığında olup 28 alt birimden meydana gelen silindirik bir kompleks yapısındadır. Bu yapı, iki dış alfa (α1–α7) ve iki iç beta (β1–β7) halkasından oluşan dört katmanlı bir düzenleme göstermektedir. Her halka yedi alt birim içerir ve varil benzeri bir yapı oluşturmaktadır. Beta alt birimleri arasında yer alan β1, β2 ve β5 sırasıyla kaspaz-benzeri, tripsin-benzeri ve kimotripsin-benzeri proteolitik aktivitelerden sorumludur. Bu temel form, konstitutif 20S proteazomu (c20S) olarak adlandırılmaktadır (Xiong vd., 2022).

2.4.2. UPS'nin Spermatogenezdeki Rolü

Proteazom komplekslerinin ubikitin ile işaretlenmiş proteinlerin seçici yıkımında merkezi bir rol üstlenmesi, bu sürecin hedef özgüllüğünün ubikitin proteazom sistemi içerisinde yer alan düzenleyici enzimler tarafından sağlandığını ortaya koymaktadır. Hücre içi protein yıkımına ilişkin temel mekanizmaların yanı sıra, son yıllarda bu sistemin üreme sistemi fizyolojisinde de kritik işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle fertilizasyon sürecinde kapasitasyon, akrozomal reaksiyon ve zona pellucida (ZP) bağlanması gibi önemli aşamaların düzenlenmesinde ubikitin proteazom sisteminin etkin rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Özellikle proteinlerin ubikitin ile işaretlenmesinde görev alan E3 ubikitin ligazlar, substrat tanınmasının belirlenmesinde kritik bir kontrol noktası oluşturmaktadır. Bu bağlamda ubikitin ligaz ailesine ait çeşitli proteinler, hücresel protein homeostazının sağlanmasında farklı fizyolojik süreçlerde görev almaktadır. Bu E3 ligazlardan biri olan NEDL2, UPS sisteminin önemli düzenleyici bileşenlerinden biri olarak protein yıkım süreçlerinde ve hücresel stres yanıtlarında rol oynamaktadır.

2.5. NEDL2 VE HÜCRESEL PROTEİN YIKIMINDAKİ ROLÜ

UPS proteinlerinden NEDD4-benzeri ubikitin ligaz 2 (NEDL2/HECW2), HECT tipi E3 ligaz ailesine ait olup N-terminal C2 alanı, iki WW protein–protein etkileşim

modülü ve C-terminal HECT katalitik domaini içeren yapısal bir organizasyona sahiptir (Mao vd., 2020). Bu modüler yapı, NEDL2'nin hedef proteinleri tanımasını ve ubikitin transfer reaksiyonlarını katalize etmesini sağlayarak hücresel protein yıkım süreçlerinde önemli bir rol üstlenmesine olanak tanımaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, NEDL2'nin yalnızca hücresel homeostaz ve protein degradasyonunda değil, aynı zamanda hücre proliferasyonu, apoptoz ve DNA hasar yanıtı gibi temel biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde de görev aldığını göstermektedir. Özellikle TP73 gibi tümör baskılayıcı proteinlerle etkileşime girerek bu proteinlerin stabilitesini ve transkripsiyonel aktivitesini düzenlediği bildirilmiştir. Bu etkileşim sonucunda p73 aracılı apoptotik yanıtın güçlendiği ve hücresel stres yanıt mekanizmalarının modüle edildiği ifade edilmektedir (Miyazaki vd., 2003).Bununla birlikte NEDL2'nin ATR kinaz gibi DNA hasar yanıtında rol alan proteinlerin yıkım süreçlerine katkıda bulunabileceği ve bu yolla hücresel stres yanıtını düzenleyebileceği rapor edilmiştir. NEDD4 ailesine ait E3 ligazların yalnızca kanser biyolojisinde değil, aynı zamanda DNA hasar onarımı ve hücresel denge mekanizmalarında da kritik roller üstlendiği gösterilmiştir (Lu vd., 2013). Bu durum, NEDL2'nin de dahil olduğu bu protein ailesinin hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde geniş bir düzenleyici kapasiteye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Özellikle HECW2/NEDL2'nin tümör biyolojisi ile ilişkisine odaklanan güncel çalışmalar, bu proteinin kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini ortaya koymaktadır. HECW2'nin farklı kanser türlerinde hücre proliferasyonu ve apoptotik yanıtlar üzerindeki düzenleyici etkileri, onun tümör gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir moleküler kontrol noktası olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle NEDL2'nin inhibisyonu veya modülasyonu, gelecekte anti-tümör stratejiler açısından umut vadeden bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Shen vd., 2024).

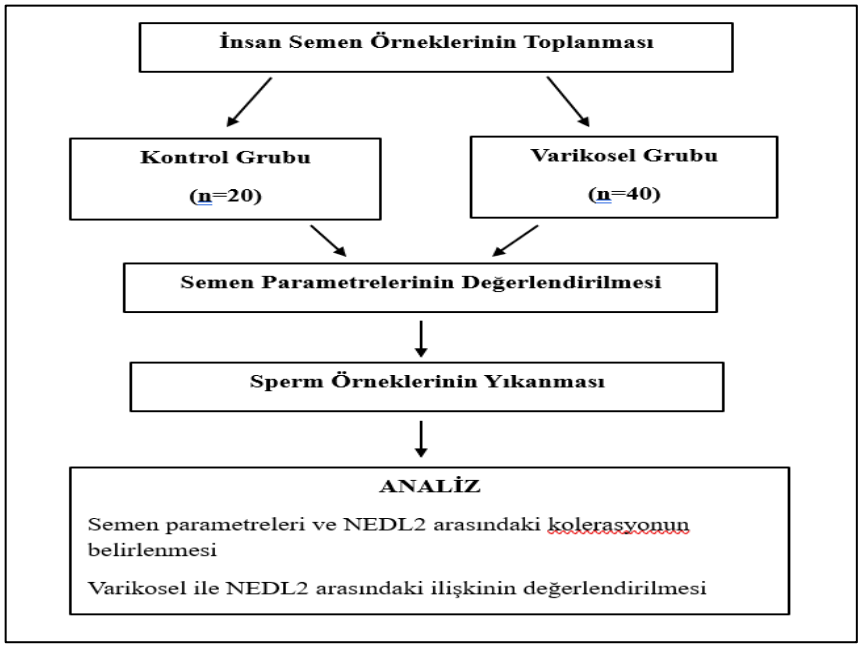
Bununla birlikte testis dokusunda ubikitin proteazom sisteminin yüksek aktivite göstermesi, spermatogenez sürecinde protein yıkım mekanizmalarının kritik rol oynadığını göstermektedir (Richburg vd., 2014). Bu bağlamda NEDL2 gibi E3 ligazların erkek üreme sistemi üzerindeki olası fonksiyonlarının araştırılması, gamet gelişimi ve fertilizasyon süreçlerinin anlaşılması açısından önem arz etmektedir.

3. YÖNTEM

Bu çalışma, 27.12.2024 tarihli **"Müdahale Olmayan Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu"** onayının alınmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Etik kurul başvurusunda çalışma kapsamında kontrol grubu (n=20) ve varikosel grubu (n=20) olmak üzere toplam 40 bireyin değerlendirilmesi planlanmıştır. Ancak çalışma sürecinde araştırma kriterlerini karşılayan ek varikosel örneklerine ulaşılması nedeniyle varikosel grubundaki örnek sayısı artırılmış ve çalışma toplam **60** semen örneği üzerinden yürütülmüştür.

Araştırmada kullanılan semen örnekleri, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarına başvuran, varikosel tanısı almış bireyler ile sağlıklı gönüllülerden elde edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen toplam 60 semen numunesi **kontrol grubu (n=20)** ve **varikosel grubu (n=40)** olmak üzere iki gruba ayrılarak değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasına, kontrol grubu için 18–45 yaş arasında, herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan ve son 12 ay içinde çocuk sahibi olmuş fertil bireyler ile üroloji bölümünde varikosel tanısı alarak sperm analizi amacıyla androloji laboratuvarına yönlendirilen varikoselli bireyler dahil edildi. Semen örneğinde lökosit veya eritrosit bulunan, semen likefaksiyonunda sorun saptanan, ayrıca 18 yaş altı ve 45 yaş üstü bireyler çalışma dışında bırakıldı. Tez çalışmasında aşağıdaki deney akış planı uygulandı;



Şekil 3. 1. Deney Akış Planı

3.1.ÇALIŞMADA KULLANILAN MALZEMELER

3.1.1.Kimyasallar ve Solüsyonlar

NaCl

KCl

Normal Keçi Serumu

Triton-X

Formaldehit

Methanol

Yağsız Süt tozu

Tris

NP-40

Proteinaz İnhibitör Coctail

Glisin

Tween 20

Ponceu S

Glasiyal Asetik Asit

B-Merkaptoethanol

Sodyum Dodesil Sülfat

Bromfenol Mavisi

NaOH

HCl

NaN3

KCl

NaH2PO4

Protein Ladder

Floresan kapatma medyumu

Etanol

Entellan

Boyama tamponu x1 (R&D systems)

Permeabilizasyon tamponu x1 (R&D systems)

3.1.2. Deneyde Kullanılan Antikorlar

Primer Antikor	Firma	Dilüsyon Oranı
NEDL2 Polyclonal Antibody	invitrogen	1/100

Sekonder Antikor	Firma	Dilüsyon Oranı
Alexa Flour Goat Anti-Rabbit	invitrogen	1/300
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody	invitrogen	1/300

3.1.3.Kullanılan Cihazlar

-80 °C Derin Dondurucu	Thermo Scientific
Akım Sitometri Cihazı	ACEA NovoCyte 3000
Binoküler Çift Başlı Mikroskop	Nikon
Buzdolabı	Arçelik
CO_2'li İnkübatör	Panasonic
Çeker Ocak	Hedlab
Etüv	Nüve EN500
Hassas Terazi	Radwag
İnvert Mikroskop ve Kamera Sistemi	Olympus
Class II Biyogüvenlik Kabini	ScanLaf Mars Labogene
Manyetik Karıştırıcı	Thermo Scientific
Mikropipet Seti	Brand
Mini Santrifüj	Biosan
Nemli Ortam Kapları	Hayat Medikal
Nikon Eclipse E600 Floresan Mikroskobu	Nikon
Orbital Karıştırıcı	Sigma, Almanya
pH Metre	Hanna
PureLab Option-Q Distile Su Arıtma Cihazı	ELGA
Semidry Blotlama Cihazı	Scie-Plas
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific
Sonikatör	Bandelin, Almanya
Vorteks	Thermo Scientific

Western Blot Seti Invitrogen

3.2.SİTOLOJİK İŞLEMLER

Bu işlemler için öncelikle cinsel perhizi takiben ikinci ve beşinci günler arasında mastürbasyon tekniği ile elde edilen semen örnekleri steril kaplar içerisinde toplandı. 37 °C etüvde bekletilen semen örneği likefiye olduktan sonra en geç 60 dk. içerisinde analiz edildi. Mikroskobik inceleme için değerlendirme amacıyla örneklem alınmadan önce numune iyice karıştırıldı ve Makler sperm sayım kamarasına 1 damla (yaklaşık 10 ul) semen örneğinden konularak mikroskop altında inceleme yapıldı. Semen hacmi, sperm konsantrasyonu, sperm hareketliliği ve sperm morfolojisi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre değerlendirildi. Sperm değerlendirilmesi yapılırken ana olarak şu paramatreler incelendi;

- Yaş
- Ejakülat volümü
- Ejakülat rengi
- Likefaksiyon süresi
- Sperm konsantrasyonu (%)
- Motilite (%)
- İleri hareketli sperm (%)
- Yerinde hareketli sperm (%)
- Hareketsiz sperm (%)
- Normal morfoloji (%)

3.2.1. Sperm Analizi

Rutin semen analizi amacıyla androloji laboratuvarına başvuran ve cinsel perhiz süresi 2–7 gün arasında olan donörlerden elde edilen sperm örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Mastürbasyon yöntemiyle alınan semen örnekleri steril idrar kaplarında toplanmış ve ardından 37°C sıcaklıktaki etüvde muhafaza edilmiştir. Örnekler 15 dakikalık aralıklarla kontrol edilerek likefaksiyon süreleri belirlenmiştir. Likefiye olan semen örnekleri öncelikle makroskobik, ardından mikroskobik olarak değerlendirilmiştir.

Makroskobik incelemede semen örneklerinin hacmi, rengi, viskozitesi ve likefaksiyon süresi değerlendirilmiştir. Mikroskobik inceleme öncesinde numuneler homojenizasyon sağlamak amacıyla iyice karıştırılmış ve her örnekten yaklaşık 10 μL

semen alınarak Makler sperm sayım kamarasına yerleştirilmiştir. Örnekler ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Mikroskobik değerlendirmede öncelikle sperm örnekleri aglütinasyon varlığı ile epitel hücreleri, lökositler ve eritrositler gibi hücreleri içerebilen "yuvarlak hücreler" açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra spermatozoalar hareketlilik yönünden incelenmiş ve her sperm hücresinin motilitesi, Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2021) kriterlerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır:

• **İleri hareketli (progresif motilite):** Hızından bağımsız olarak doğrusal bir hat üzerinde veya geniş dairesel hareketlerle aktif şekilde ilerleyen spermatozoaları içerir.

• **Yerinde hareketli (non-progresif motilite):** İleriye doğru hareket etmeyen, yalnızca yerinde veya küçük dairesel hareketler sergileyen spermatozoalardır.

• **Hareketsiz (immotil):** Herhangi bir hareket göstermeyen spermatozoaları ifade eder.

Çalışmada normal spermiyogram parametrelerinin değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü'nün 2021 yılı kriterleri esas alınmış olup, referans değerler aşağıdaki tabloda (Tablo 3.1.) sunulmuştur.

Tablo 3. 1. Normal Spermiyogram Parametreleri

Parametre	**WHO 2021**
Semen volümü	≥1.4 mL
Total sperm sayısı	≥39 milyon/ejakülat
Sperm konsantrasyonu	≥16 milyon/mL
Total motilite	≥42%
Progressive motilite	≥30%
Vitalite	≥54%
Normal morfoloji	≥4%
pH	≥7.2
Yuvarlak hücre/lökosit	<1 milyon/mL

3.2.2 Kruger Strict

Rutin semen analizi yapılan semen örneklerine detaylı morfolojik inceleme yapabilmek için ise Kruger Strict Sperm Morfoloji Analizi uygulandı. Kruger Strict

Morfoloji Kriterlerine Göre Normal Sperm Değerlendirilmesi yapabilmek için Diff-Quik Boyama Prosedürü (Sperm morfolojisi için hızlı boyama işlemi) uygulandı. Hızlı boyama yöntemleri, özellikle gün içerinde kısa zamanda sonuç verdiğinden dolayı tercih edilmektedir.

Her bir hastadan 4 lam sperm yayma yapıldı. Her lamdan 50 hücre sayımı yapılarak toplamda 200 hücre morfolojik olarak detaylı olarak incelendi. Kruger Strict Morfoloji Kriterlerine Göre Normal Sperm Değerlendirilmesi yapılırken spermin baş kısmı (düzgün oval yapıda, akrozom başın ön kısmının %40-70'ini oluşturmalı ve başın uzunluğu ortalama 3-5 µm, eni ise yaklaşık 2-3 µm olmalıdır), spermin boyun kısmı (implantasyonu başın uzun ekseni boyunca ve intakt olmalıdır), spermin orta kısmı (eni yaklaşık 1 µm boyu ise başın uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır) ve de spermin kuyruğu (düzgün yapıda ve orta kısmından biraz daha ince, kıvrılma ve bükülme olmayan yaklaşık 45 µm bir uzunluğa sahip olmalıdır) morfolojik olarak spermin dört bölgesinde anomali olup olmaması dikkate alınarak detaylı olarak bir inceleme yapıldı.

3.2.3.İmmünofloresan Yöntemi

Rutin semen analizine tabi tutulan örnekler bir falkon tüpüne alındı ve üzerine 1X PBS eklendikten sonra pipetaj yapılarak homojenize edildi. Numuneler 1800 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından çöken peletin üzerindeki PBS uzaklaştırıldı ve pelet yeniden 1X PBS ile süspanse edilerek aynı koşullarda (1800 rpm'de 15 dakika) santrifüj yapıldı. İkinci santrifüj sonrasında üst sıvı uzaklaştırıldı ve hücrelerin fiksasyonu amacıyla pelet üzerine 4-5 ml %2'lik formaldehit eklendi. Numuneler 40 dakika süreyle fikse edildikten sonra 1800 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında formaldehit uzaklaştırıldı ve pelet iki kez 1X PBS ile yıkanarak her yıkama sonrasında 1800 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Son yıkamanın ardından üst sıvı tamamen uzaklaştırıldı ve pelet hacminin yaklaşık üç katı kadar 1X PBS eklenerek immünofloresan analizleri için hazır hale getirildi.

Tablo 3. 2. IF Protokol Basamakları

Yapılan işlem	**Süre**
Pappen ile lam üzerine 22x22 kare alan çizildi	-
Çizilen alana 400 µl 1X PBS koyuldu	-
Eklenilen PBS üzerine 5 µl homojen numuneden koyuldu	5 dk
Permeablizasyon	40 dk
Blocking (Protein Blok)	30 dk
Primer Antikor (NEDL2 1/100)	Gece boyu
Oda ısısında bekletme	15 dk
Labelling solüsyonda yıkama	5 dk
PBS	5 dk
PBS	5 dk
Sekonder antikor (karanlıkta) (Alexa Flour Goat Anti-Rabbit 1/300)	40 dk
Labelling solüsyonda yıkama	5 dk
PBS	10 dk
PBS	10 dk
Dapili kapama	-

Kapama işleminden sonra preparatları Nikon Eclipse E600 mikroskopta incelendi ve görüntüler Nikon Ds-Fi1 kamera ile kaydedildi.

3.2.4. Akım (Flow) Sitometri

İmmünfloresan analizinde belirtildiği şekilde %2 formaldehit ile fikse edilerek 1X PBS içerisinde saklanan sperm örnekleri, akım sitometrik analizlerde kullanılmıştır. Gruplar arasında eşit hücre sayısının sağlanabilmesi amacıyla örnekler ependorf tüplerine 150.000 hücre/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Numuneler 2000 rpm'da 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet üzerine permeabilizasyon amacıyla %0,1 Triton-X 100 içeren 0,1 M PBS'den 500 µl eklenmiştir. Permeabilizasyonun ardından nonspesifik antikor bağlanmasını önlemek amacıyla hücreler %5 normal keçi serumu (NGS) içeren boyama tamponuiçerisinde +4 °C'de 10 dakika bloklandı. Bloklama sonrasında hücreler yeniden santrifüj edilerek süpernatant

uzaklaştırıldı. Bloklama sonrasında örnekler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her tüpe 500 µL boyama tamponu eklenmiş, Anti-NEDL2 primer antikoru 1:100 dilüsyon oranında ilave edilerek 1 saat inkübe edilmiştir. Takiben Anti-Rabbit Fitc sekonder antikoru 1:100 dilüsyon oranında eklenmiş ve örnekler 1 saat daha inkübe edilmiştir. Analizler ACEA NovoCyte akım sitometri cihazında gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler NovoExpress yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.5.Western Blot Yöntemi

Hücre Ekstraktının Hazırlanması

-80 °C'de saklanan sperm örneklerinin homojenizasyonu proteinaz inhibitörü içeren lizis solüsyonu ile kimyasal muameleden sonra fiziksel muamele olarak da sonikatör kullanılarak gerçekleştirildi. Aynı gün hazırlanarak soğutulmuş liziz solüsyonu içerisine alınan sperm örnekleri ultrasonik homojenizatör (sonikatör) ile 15-30 saniye kadar muamele edilerek homojenize olmaları sağlanıldı takiben 10 dakika +4 °C'de 14,000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrası oluşan pelletin üzerindeki süpernatant hücre sitoplazmik ekstraktı ayrı bir ependorf tüpüne alınarak kullanılırken pellet kısmı atılmıştır. Elde edilen hücreler SDS jel yükleme solüsyonu ile 1/10 (yükleme solüsyonu/lizat) oranında karıştırılmış ve 96 °C'de 10 dakika kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır. Kaynatma sırasında buharlaşarak ependorf tüpünün kapağında toplanma olasılığına karşı tüpler santrifüj edilerek jele yüklemeye hazır hale getirildi.

1D-SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS Jel elektroforez ünitesine %4-12'lik Bis- Tris Jel (1.0 mmX10 well) yerleştirilmiş ve jel yerleştirildikten sonra tankın içerisinde oluşan orta bölüme 1X Running Buffer elektoforez solüsyonu döküldü. Jelin içerisindeki kuyucuklara yerleştirilmiş olan tarak jelden nazikçe uzaklaştırılıp, kuyucuklar insülin iğnesi kullanılarak elektroforez solüsyonu ile yıkandı. Tankın ön ve arka bölümlerine orta bölümden bir sızma olmadığından emin olunduktan sonra ön ve arka bölümlerde 1X Running Buffer elektoforez solüsyonu ile doldurulmuştur. Takiben örnekler hızlı bir

şekilde jele yüklendikten sonra proteinlerin jel içerisinde elektrik akımı etkisi ile ilerleyebilmeleri için jel elektroforez ünitesi güç kaynağına bağlanmış ve 120 Volt, 300 miliamper ve 250 Watt ayarında yaklaşık 1 saat 40 dakika yürütülerek proteinlerin jelde ayrıştırılmaları sağlandı.

İmmünoblotlama

Yürütme bitmeden önce membran ve altı adet filtre kağıdı blotlama solüsyonu içinde bekletilmiştir. Yürütme bittikten sonra jel elektroforez ünitesinden çıkartılmış ve jel üzerindeki elektrik iletken bölge kesilmiştir. Jeli kasetten blotlama solüsyonu içerisine nazikçe bırakılmış ve solüsyon içerisinde iyice yıkanması sağlanmıştır. Islanan filtre kağıdından üç tanesi transfer ünitesine yerleştirip üzerine membran, onun üzerine jel, en üste ise tekrar üç adet filtre kâğıdını yerleştirip transfer cihazı 200 mA, 120 Volt ve 44 250 Watt ayarında 1 saat 30 dakika boyunca jelden membrana proteinlerin transfer olması gerçekleştirildi. Transfer süresi bittikten sonra ilk olarak jelden membrana proteinlerin geçip geçmediğini anlamak içim membran Ponceu S boyası ile 1-2 dk uygulandı ve boyanmış proteinlerin membrana geçtiğinden emin olduktan sonra membran önce distile su sonra ise Tween içeren PBS ile boya tamamen gidene kadar yıkanmıştır. Bu işlemden sonra membrana uygulayacağımız antikor ile membran arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirgemek için %3'lük süt tozu ile oda ısısında 1 saat **rotator** üzerinde bloklama yapıldı. Süt tozu solüsyonundaki proteinler mebran üzerinde hedef proteinden yoksun olan tüm bölgeyi kaplar. Böylece kullanacağımız primer antikorların sadece hedef proteinlere bağlanması sağlanır. Sonuç olarak zemin kirliliğinden kaynaklanan pozitif sonuçlar önlenir. Daha sonra membrandan süt tozu uzaklaştırılarak primer antikor ile (NEDL2 1/500) ile gece boyu +4' °C'de inkübe edildi. Membran ertesi gün üç kez PBS-Tween ile yıkandı ve takiben HRP konjuge (Anti-Rabbit)-sekonder antikor içerisinde 1 saat bekletildi. Sekonder inkübasyonun ardından üç kez PBS-Tween ile yıkanan membran ECL Detection Ajanı ile 2-5 dakika inkübe edildi ve görüntüleme cihazı kullanılarak membran üzerindeki proteinler görüntülendi. Sekonder antikor üzerinde bulunan HRP enzimi, ECL içerisinde bulunan Lumigen-PS3 subsratını katalizler ve açığa çıkan luminol ışımaya yol açar ve bu ışıma UVP cihazı ile toplanarak ölçülür. Membran üzerindeki bantların dansitesi Image J programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE İSTATİKSEL ANALİZLER

İmmunofloresan değerlendirmeler; her bir hastadan 200 sperm hücrede NEDL2 ekspresyonunun, sperm hücresinde baş boyun kuyruk bölgelerindeki yoğunluğuna bakılarak kontrol ve hasta grubu karşılaştırıldı. Western blot çalışmaları sonrası band yoğunlukları Image J analiz programında okutulmuştur. Akım sitometri çalışmalarından elde edilen datalar ise NovoExpress yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Çalışmamızda gruplar arası karşılaştırma yapmadan önce, verilerin parametrik test varsayımlarını karşılayıp karşılamadığını belirlemek amacıyla **ilk olarak Shapiro-Wilk normallik testini** uyguladık. Normallik gösteren değişkenler için **Bağımsız t-testi**, normal dağılım göstermeyen değişkenler için ise **Mann-Whitney U testini** tercih ederek analizlerimizin istatistiksel olarak en doğru ve güvenilir sonuçları vermesini sağladık.

İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism 9 kullanılarak değerlendirilmiş ve anlamlılık $p < 0.0.5$ olarak değerlendirilmiştir. Farklı gruplar arasındaki ortaya çıkabilecek muhtemel farklılıklar karşılaştırmalı testler (t test, one-way ANOVA) ile değerlendirilmiştir.

4.BULGULAR

Tez çalışmamızda Ubikitin-Proteazom Sistemi proteinlerinden olan NEDL2 proteininin varikosel patogenezi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Varikosel patogenezinde NEDL2 proteininin rolünü saptayabilmek için hasta grubu varikosel tanısı almış bireylere ait sperm örneklerinde ve kontrol grubu olarak sağlıklı bireylere ait sperm örnekleri çalışılmıştır. Bu amaçla Kontrol (n=20), varikosel (n=40) bireylere ait semen örnekleri önce spermiyogram ve Kruger morfoloji analizine tabi tutulmuştur. Daha sonra NEDL2 proteininin lokalizasyon ve ekspresyonunundaki değişiklikler immünofloresan yöntemiyle, protein ekspresyonları ise western blot ve akım sitometri yöntemi ile karşılaştırmalı olarak ile değerlendirilmiştir.

4.1. SPERM HÜCRELERİNDE SEMEN ANALİZİ SONUÇLARI

Tezimde semen analizi için üniversitemizin androloji laboratuvarına başvuran varikosel (n=40) bireyler ve kontrol (n=20) bireyler WHO (Dünya Sağlık Örgütü, 2021, Laboratuvar El Kitabı, İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi, 6. Baskı, Cambridge Üniversitesi, Cambridge, UK) kriterlerine göre standart semen analizine tabii tutulmuştur. Cinsel perhiz süresi 2-7 gün arasında olan bireylerden semen örnekleri alınmıştır. Standart semen analizi ile sperm örneğinin hacmi, ejakülatın mililitredeki sperm sayısı, tüm ejakülattaki sperm sayısı, tüm spermlerin hareketlilik yüzdesi, ileri hareketli spermlerin yüzdesi, yerinde hareketli spermlerin yüzdesi, hareketsiz sperm yüzdesi, yaş ve likefaksiyon süresi kriterlerine bakılmıştır ve Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’ de özetlenmiştir. Ayrıca bu kriterlerin ortalama olarak karşılaştırılması da Tablo 4.3 de sunulmuştur.

Tablo 4. 1. Kontrol Bireylere Ait Standart Semen Analizi Sonuçları

	Hacim (ml)	Sperm Sayısı 10^6×ml	Toplam Sperm Sayısı $\times 10^6$	Total Motilite %	İleri Hareketli Sperm **(PR)** %	Yerinde Hareketli Sperm **(NP)** %	İmmotil Sperm **(IM)** %	Yaş	Likefaksiyon Süresi
Kontrol 1 (K1)	4	64	256	48,4	32,8	15,6	51,6	41	30 dk
Kontrol 2 (K2)	2,5	39	97,5	94,9	94,9	0	5,1	28	20 dk
Kontrol 3 (K3)	8	67	536	40,3	40,3	0	59,7	37	30 dk
Kontrol 4 (K4)	3,20	132	422,4	95,5	91,7	3,8	4,5	21	30 dk
Kontrol 5 (K5)	2	149	298	87,9	86,6	1,3	12,1	27	30 dk
Kontrol 6 (K6)	2,5	115	287,5	92,2	92,2	0	7,8	28	30 dk
Kontrol 7 (K7)	2	43	86	79,1	76,7	2,3	20,9	30	30 dk
Kontrol 8 (K8)	5	57	285	80,7	72,2	3,5	19,3	34	30 dk
Kontrol 9 (K9)	1,5	46	69	84,7	80,4	4,3	15,2	23	30 dk
Kontrol 10 (K10)	4	39	156	30,8	30,8	0	69,2	35	60 dk
Kontrol 11 (K11)	0,5	33	16,5	78,7	54,5	24,2	21,2	31	30 dk
Kontrol 12 (K12)	3,20	70	224	80	72,9	7,1	20	37	30 dk
Kontrol 13 (K13)	3	87	261	82,7	80,5	2,3	17,2	25	30 dk
Kontrol 14 (K14)	3	51	153	70,5	62,7	7,8	29,4	25	30 dk
Kontrol 15 (K15)	3	25	75	84	84	0	16	29	30 dk
Kontrol 16 (K16)	2,5	20	50	80	75	5	20	30	30 dk
Kontrol 17 (K17)	5,5	65	357,5	87,7	83,1	4,6	12,3	45	30 dk
Kontrol 18 (K18)	2,6	63	163,8	52,4	31,7	20,6	47,6	41	30 dk
Kontrol 19 (K19)	3	61	183	73,8	67,2	6,6	26,2	28	30 dk
Kontrol 20 (K20)	2,5	117	292,5	48,7	45,3	3,4	51,3	23	30 dk
Kontrol Ortalama	**3.18**	**67.15**	**213.49**	**73.65**	**67.78**	**5.62**	**26.33**	**30.90**	**31,00**

Tablo 4. 2. Varikosel Bireylere Ait Standart Semen Analizi Sonuçları

	Hacim (ml)	Sperm Sayısı 10^6×ml	Toplam Sperm Sayısı ×10^6	Total Motilite %	İleri Hareketli Sperm **(PR)** %	Yerinde Hareketli Sperm **(NP)** %	İmmotil Sperm **(IM)** %	Yaş	Likefaksiyon Süresi
Varikosel 1 (VR1)	5	13	65	23,1	15,4	7,7	84,6	20	40 dk
Varikosel 2 (VR2)	2	7	14	14,3	0	14,3	85,7	28	30 dk
Varikosel 3 (VR3)	3,5	11	38,5	45,5	45,5	0	54,5	37	60 dk
Varikosel 4 (VR4)	6	0,9	5,4	44,4	22,2	22,2	56,6	27	30 dk
Varikosel 5 (VR5)	3	40	120	82,5	80	2,5	17,5	21	40 dk
Varikosel 6 (VR6)	1,5	18	27	50	27,8	22,2	50	29	40 dk
Varikosel 7 (VR7)	2	6	12	50	50	0	50	29	60 dk
Varikosel 8 (VR8)	4	41	164	43,9	36,6	7,3	56,1	20	40 dk
Varikosel 9 (VR9)	3	22	66	77,3	63,6	13,6	22,7	23	30 dk
Varikosel 10 (VR10)	3	32	96	53,1	34,4	18,8	46,9	22	30 dk
Varikosel 11 (VR11)	3	11	33	36,4	18,2	18,2	63,6	35	40 dk
Varikosel 12 (VR12)	2	30	60	90	90	0	10	25	30 dk
Varikosel 13 (VR13)	5	32	160	53,1	43,8	9,4	46,9	30	60 dk
Varikosel 14 (VR14)	4,1	15	61,5	73,3	66,7	6,7	26,7	25	60 dk
Varikosel 15 (VR15)	0,5	15	7,5	53,3	46,7	6,7	46,7	28	60 dk
Varikosel 16 (VR16)	0,5	2	1	50	50	0	50	22	60 dk
Varikosel 17 (VR17)	3,2	20	64	90	85	5	10	32	30 dk
Varikosel 18 (VR18)	5	49	245	93,8	91,8	2	6,1	28	30 dk
Varikosel 19 (VR19)	2	29	58	58,6	48,3	10,3	41,4	19	30 dk
Varikosel 20 (VR20)	5	1,8	9	50	33,3	16,7	50	18	30 dk

Tablo 4. 3. (Devam) Varikosel Bireylere Ait Standart Semen Analizi Sonuçları

Varikosel 21 (VR21)	4,5	5	22,5	60	40	20	40	30	30 dk
Varikosel 22 (VR22)	4,5	62	279	61,3	58,1	3,2	38,7	23	60 dk
Varikosel 23 (VR23)	4	43	172	69,8	53,5	16,3	30,2	27	60 dk
Varikosel 24 (VR24)	3,5	19	66,5	84,2	78,9	5,3	15,8	28	40 dk
Varikosel 25 (VR25)	6	0,5	3	100	100	0	0	29	40 dk
Varikosel 26 (VR26)	4,5	39	175,5	74,4	71,8	2,6	25,6	39	40 dk
Varikosel 27 (VR27)	3	86	258	84,9	82,6	2,3	15,1	27	30 dk
Varikosel 28 (VR28)	1,5	17	25,5	58,8	47,1	11,8	41,2	27	60 dk
Varikosel 29 (VR29)	2,5	62	155	74,2	64,5	9,7	25,8	29	30 dk
Varikosel 30 (VR30)	2	46	92	78,2	64,7	10,9	21,7	26	60 dk
Varikosel 31 (VR31)	3,5	9	31,5	55,6	55,6	0	44,4	26	60 dk
Varikosel 32 (VR32)	5,5	12	66	66,6	58,3	8,3	33,3	18	30 dk
Varikosel 33 (VR33)	4,5	0,3	1,35	33,3	33,3	0	66,7	23	30 dk
Varikosel 34 (VR34)	4	53	212	39,6	35,8	3,8	60,4	22	60 dk
Varikosel 35 (VR35)	2,3	3	6,9	66,6	33,3	33,3	33,3	24	30 dk
Varikosel 36 (VR36)	2	38	76	73,7	60,5	13,2	26,3	35	30 dk
Varikosel 37 (VR37)	2,5	24	60	50	37,5	12,5	50	36	60 dk
Varikosel 38 (VR38)	2,5	19	47,5	68,4	57,9	10,5	31,6	25	40 dk
Varikosel 39 (VR39)	2	15	30	73,3	53,3	20	26,7	31	60 dk
Varikosel 40 (VR40)	2,5	5	12,5	80	60	20	20	24	60 dk
Varikosel Ortalama	**3.00**	**28.78**	**84.50**	**60.33**	**54.08**	**6.25**	**39.68**	**27.53**	**43.25**

Bu tablolarda kontrol ve varikosel bireylere ait semen parametrelerine tek tek (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2) bakıldığında bu parametrelerin bazılarında kontrol ve varikosel bireyler arasında istatiksel olarak farklılıklar gözlenmiştir. Kontrol bireylerde, sperm konsantrasyonunun ve sperm hareketliliğinin sahip sperm yüzdesinin varikosel bireylere göre yüksek olduğu saptanmıştır.

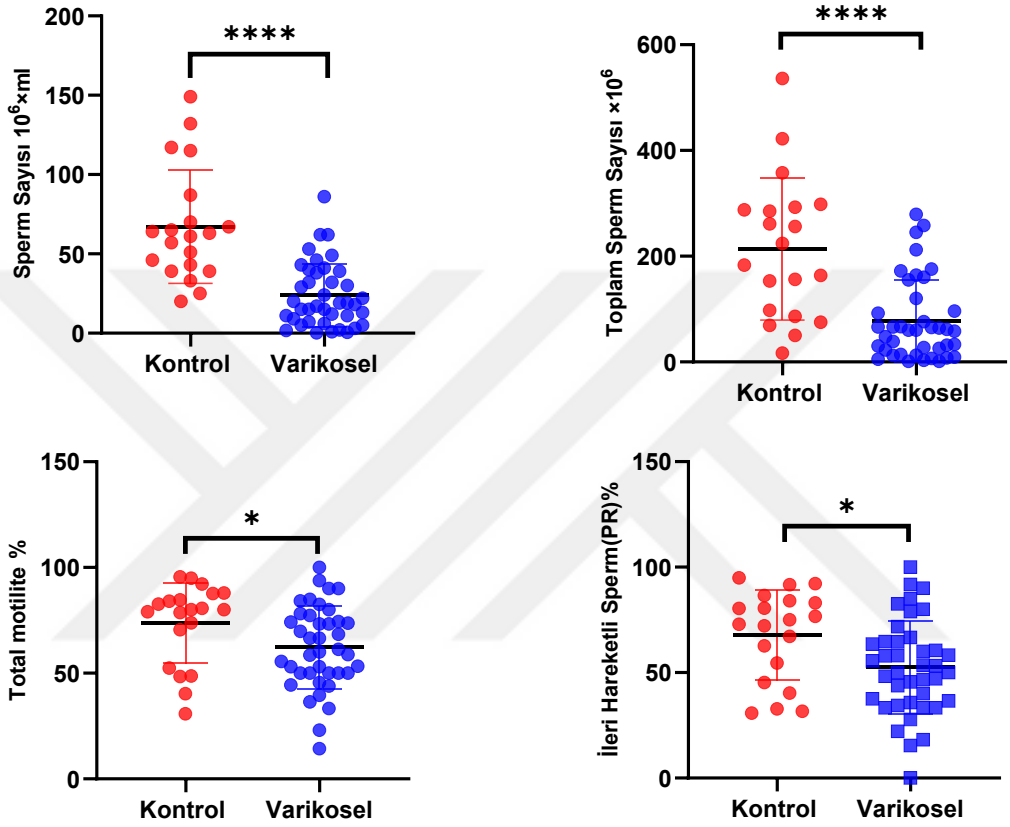
Tablo 4. 4. Kontrol ve Varikosel Bireylere Ait Spermiyogram Sonuçları Karşılaştırılması

Parametre	**Kontrol (n=20) Ort ± SS**	**Varikosel (n=40) Ort ± SS**	**P değeri**
Hacim (ml)	3.18 ± 1.60	3.00 ± 1.40	0.682
Sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$/ml)	67.15 ± 35.76	28.78 ± 20.14	0.000001*
Toplam sperm sayısı ($\times 10^6$)	213.49 ± 134.20	84.50 ± 76.64	0.000031*
PR (ileri hareketli) (%)	67.78 ± 21.29	54.08 ± 22.21	0.018*
NP (yerinde hareketli) (%)	5.62 ± 6.85	6.25 ± 8.04	0.049*
IM (hareketsiz) (%)	26.33 ± 18.98	39.68 ± 19.95	0.026*
Total motilite (%)	73.65 ± 18.97	60.33 ± 19.49	0.026*
Yaş	30.90 ± 6.66	27.53 ± 5.17	0.009
Likefaksiyon süresi	31.00 ± 7.18	43.25 ± 13.50	0.000089*

**İstatiki olarak anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0,05).*

Tablo 4.3' te verilen değerler incelendiğinde varikosel grubunda sperm sayısı, toplam sperm sayısı, total motilite ve ileri hareketli sperm oranı anlamlı derecede düşük bulundu. Sperm konsantrasyonu (28.78 ± 20.14) ve toplam sperm sayısı (84.50 ± 76.64) kontrol grubuna göre ileri düzeyde düşük bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p <0,001). Motilite parametreleri incelendiğinde, total motilite ve ileri hareketli sperm yüzdesi (PR) varikosel grubunda anlamlı olarak azalmış; buna karşılık hareketsiz sperm oranı (IM) ve yerinde hareketli sperm oranı (NP) anlamlı düzeyde artış göstermiştir (p <0,05). Likefaksiyon süresi varikosel grubunda (43.25 ± 13.50 dk) kontrol

grubuna (31.00 ± 7.18 dk) kıyasla anlamlı derecede yüksekti (p <0,001). Semen hacmi açısından ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir (p =0.682). Bu parametrelerin gruplara göre dağılımı ve varyasyonu bireysel nokta grafikleri ile Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1.Kontrol ve varikosel gruplarına ait sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, total motilite ve ileri hareketli sperm (PR) oranlarının bireysel dağılımı.

Grafiklerde ortalama ± standart sapma gösterilmiştir. *p<0,05, **p<0,0001.

Her bir nokta bir bireyi temsil etmekte olup, yatay çizgi ortalamayı, dikey hata çubukları ise standart sapmayı (±SD) göstermektedir.

4.2. SPERM HÜCRELERİNDE KRUGER STRİCT ANALİZİ

Tezimde sperm morfolojilerini değerlendirmek için Kruger strict analizi yapılmıştır. Sperm örnekleri her bir sperm hücresi için baş bölgesi, boyun bölgesi ve

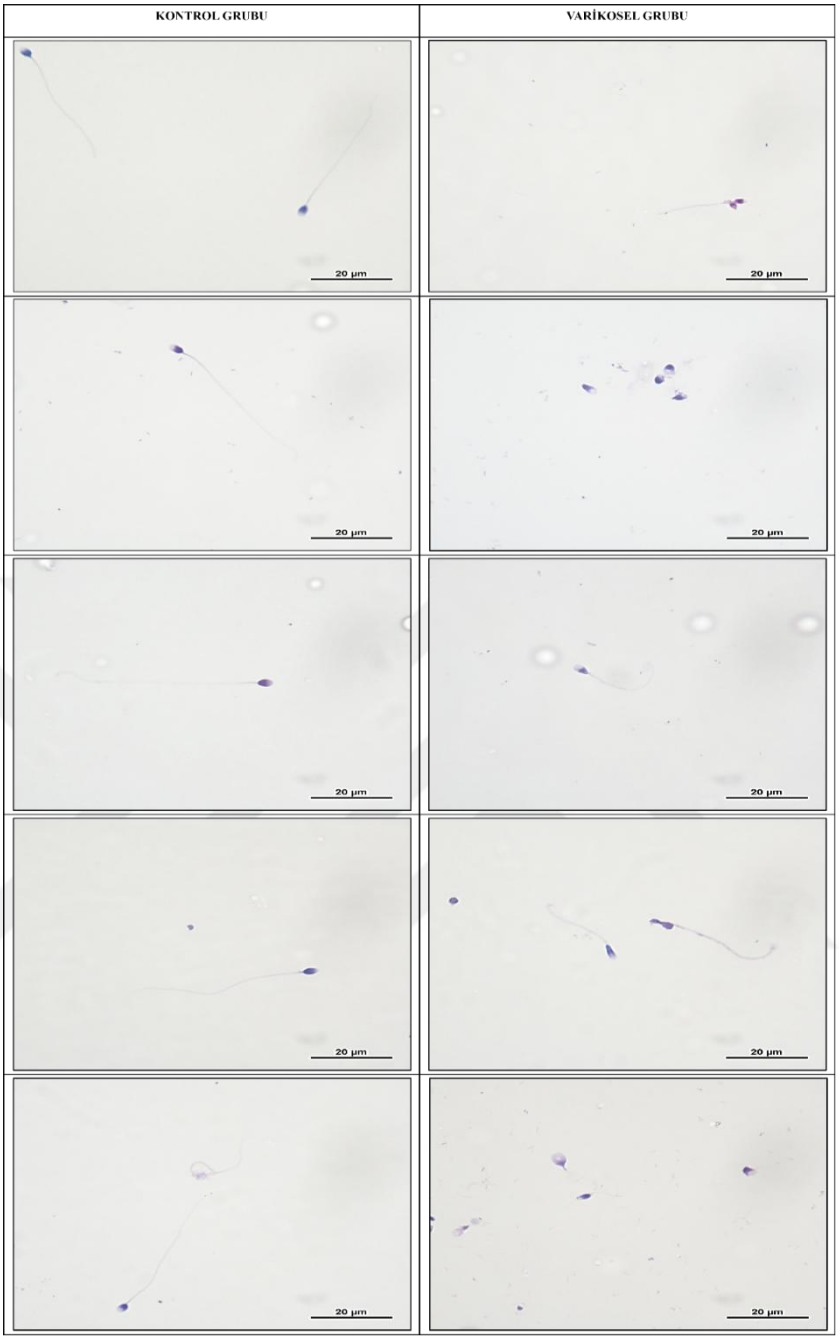
kuyruk bölgesinin morfolojisi açısından değerlendirilmiştir. Kruger morfoloji analizi için her bireye ait sperm yayma preparatları Diff Quik boyama ile boyandıktan sonra 200 hücre morfolojik incelemeye tabii tutulmuştur. Tezimde kullandığım kontrol bireylere ve varikosel bireylere ait Kruger test sonuçları tablo 4.4'de verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4. 5. Kruger Morfolojisi Sonuçları Analizi

Parametre	Kontrol Grubu (Ort±SS)	Varikosel Grubu (Ort±SS)	P değeri
Anormal sperm yüzdesi (%)	83.85 ± 6.42	98.60 ± 1.90	<0.001
Normal sperm yüzdesi (%)	16.15 ± 6.42	1.40 ± 1.90	<0.001
Normal sperm sayısı	32.30 ± 12.83	2.80 ± 3.79	<0.001
Baş morfolojisi	68.40 ± 24.52	90.50 ± 39.81	0.156
Boyun morfolojisi	19.50 ± 10.48	16.60 ± 10.80	0.550
Kuyruk morfolojisi	79.80 ± 25.85	89.90 ± 44.90	0.547

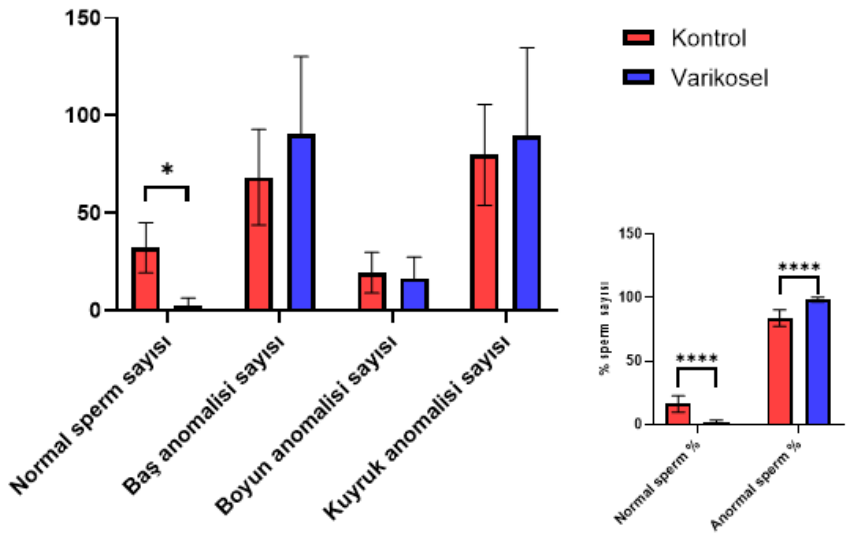
**İstatiki olarak anlamlı farkı ifade etmektedir (p<0,05).*

İki grup arasında sperm parametreleri karşılaştırıldığında, anormal sperm yüzdesi, normal sperm yüzdesi ve normal sperm sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu (p<0.001). Varikosel grubunda anormal sperm yüzdesi anlamlı derecede yüksek iken, normal sperm yüzdesi ve normal sperm sayısı anlamlı derecede düşük bulundu. Buna karşın baş morfolojisi (p=0.156), boyun morfolojisi (p=0.550) ve kuyruk morfolojisi (p=0.547) açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Kontrol ve varikosel bireylere ait sperm morfolojileri Şekil 4.5' te gösterilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında varikosel grubunda normal morfoloji oranının kontrol grubuna göre azaldığı, anormal sperm morfolojisi oranının ise arttığı gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu farklılığın anlamlı olup olmadığı p değeri ile değerlendirilmiştir.



Şekil 4. 2.Kontrol ve varikosel bireylere ait sperm morfolojilerinin Kruger strict ile gösterilmesi

A, B, C, D, E kontrol bireylere ait spermatozoonlar olup normal morfoloji göstermektedir. F, G, H, I, İ varikosel bireylere ait spermatozoonlar olup F' de kuyruksuz morfoloji, G' de çift baş morfoloji, H' de kısa kuyruk, I' da amorf baş ve boyunda kıvrılma, sivri baş ve kısa kuyruk morfolojisi, İ'de ise büyük baş, vakuol ve zayıf kısa kuyruk morfolojisi gösterilmiştir.



Şekil 4. 3.Kontrol ve varikosel gruplarında normal sperm sayısı, sperm morfolojik anomalileri (baş, boyun ve kuyruk) ile normal ve anormal sperm yüzdelerinin karşılaştırılması.

4.3. SPERM HÜCRELERİNDE NEDL2 LOKALİZASYONUNUN VE EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ

Kontrol (n=7) ve varikosel (n=7) bireylere ait sperm hücrelerindeki NEDL2 proteininin lokalizasyonunu ve ekspresyonunu karşılaştırmalı olarak incelemek için sperm yayma preparatları immünofloresan yöntemi uygulandıktan sonra floresan mikroskobisi altında incelenmiştir.

Öncelikle kontrol grubu ve varikosel grubuna ait bireylerin sperm yayma preparatlarında NEDL2 immünofloresan uygulanan her preparatta toplam 200 hücre değerlendirilmiş olup, her bir grup için toplam 1,400 hücre analiz edilmiştir. NEDL2 ekspresyonunun lokalizasyonu belirlenen boyanma paternlerine göre değerlendirilmiş olup, bir sperm hücresinde ekspresyonu birden fazla bölgede eş zamanlı olarak gözlemlenebildiğinden aynı hücre birden fazla lokalizasyon kategorisinde yer alabilmiştir. Bu nedenle tablodaki bölgesel dağılım değerleri, değerlendirilen toplam sperm hücresi sayısına karşılık gelmemekte, değerlendirmeler lokalizasyon açısından yapılmıştır (Tablo 4.5.) (Tablo 4.6.).

Tablo 4. 6. Kontrol Grubuna Ait Sperm Hücrelerinde NEDL2 Lokalizasyonunun Bölgesel Dağılımı (sayı ve %)

NEDL2 İmmünoreaktivitesi	Post-Akrozomal	Bağlantı Parçası	Mitokondriyal Kılıf	Kuyruk Esas Parça	Kuyruk Son Parça
Kontrol (n=7, 1400 sperm) Sayı	25,43 ± 27,25	200.00 ± 0.00	30,43 ± 29,61	200.00 ± 0.00	16,43 ± 28,31
Kontrol (n=7, 1400 sperm) %	12.71 ± 13.63	100.00 ± 0.00	15.21 ± 14.80	100.00 ± 0.00	8.21 ± 14.15

Kontrol grubuna ait sperm hücrelerinde NEDL2 lokalizasyonu tüm hücrelerde bağlantı parçası ve kuyruk esas parçasında gözlenirken (%100), post-akrozomal bölge, mitokondriyal kılıf ve kuyruk son parçasındaki lokalizasyonun daha düşük oranlarda ve bireyler arasında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 4. 7. Varikosel Grubuna Ait Sperm Hücrelerinde NEDL2 Lokalizasyonunun Bölgesel Dağılımı (sayı ve %)

NEDL2 İmmünoreaktivitesi	Post-Akrozomal	Bağlantı Parçası	Mitokondriyal Kılıf	Kuyruk Esas Parça	Kuyruk Son Parça
Varikosel (n=7, 1400 sperm) Sayı	39,86 ± 71,91	171,43 ± 75,59	96,86 ± 83,95	171,43 ± 75,59	33,86 ± 32,69
Varikosel (n=7, 1400 sperm) %	19.93 ± 35.96	85.71 ± 37.80	48.43 ± 41.97	85.71 ± 37.80	16.93 ± 16.34

Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde morfolojik düzensizliklerin daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, NEDL2 lokalizasyonunun morfolojik anomali gösteren bölgelerde daha sık gözlendiği dikkati çekmiştir. Ayrıca, kontrol grubuna kıyasla varikosel grubunda NEDL2'nin mitokondriyal kılıf bölgesindeki lokalizasyonun olduğu hücre sayısının artığı belirlenmiştir. (Tablo 4.6).

Kontrol ve varikosel gruplarında belirlenen NEDL2 lokalizasyonlarının bölgesel dağılımına ilişkin karşılaştırmalı analiz sonuçları Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 8. Kontrol ve Varikosel Grubuna Ait Bireylerin Sperm Hücrelerinde NEDL2 Lokalizasyonu

Bölge	**Kontrol (%: Ort ± SD)**	**Varikosel (%: Ort ± SD)**	**p-değeri**
Post-Akrozomal	12.71% ± 13.63%	19.93% ± 35.96%	0.9905
Bağlantı Parçası	100.00% ± 0.00%	85.71% ± 37.80%	0.8424
Mitokondriyal Kılıf	15.21% ± 14.80%	48.43% ± 41.97%	0.0971
Kuyruk Esas Parça	100.00% ± 0.00%	85.71% ± 37.80%	0.8424
Kuyruk Son Parça	8.21% ± 14.15%	16.93% ± 16.34%	0.9780

Sperm morfolojik lokalizasyon alanları temel alınarak gerçekleştirilen kantitatif immünofloresan analiz sonuçlarına göre; NEDL2 protein ekspresyonunun hem kontrol hem de varikosel gruplarında dinamik bir dağılım sergilediği saptanmıştır.

Kontrol grubuna ait sperm hücreleri incelendiğinde NEDL2 lokalizasyonu özellikle **bağlantı parçası** ve **kuyruk esas parça** bölgelerinde homojen ve yüksek yoğunlukta (%100.00 ± 0.00) lokalize olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, kontrol grubunda post-akrozomal alanda (%12,71 ± 13,63) ve kuyruk son parçada (%8,21 ± 14,15) NEDL2 lokalizasyonu gösteren sperm hücrelerinin oranı daha düşük olarak belirlenmiştir.

Varikosel patolojisine sahip bireylerden elde edilen spermler incelendiğinde ise, NEDL2 lokalizasyonu, morfolojik bölgelere göre belirgin değişimler gözlemlenmiştir. En dikkat çekici değişim **mitokondriyal kılıf** bölgesinde ortaya çıkmıştır. Kontrol grubunda mitokondriyal kılıfta NEDL2 lokalizasyonu %15,21 ± 14,80 iken, varikosel grubunda %48,43 ± 41,97 olarak belirlenmiştir. Ancak gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,191) (Tablo 4.7).

Varikosel grubunda bağlantı parçası ve kuyruk esas parça bölgelerinde NEDL2 lokalizasyonu gösteren sperm hücrelerinin oranı kontrol grubuna kıyasla daha düşük (%85,71 ± 37,80) bulunmuş, ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p>0,05). Benzer şekilde, post-akrozomal alanda (%19,93 ± 35,96) ve

kuyruk son parçada (%16,93 ± 16,34) NEDL2 lokalizasyonu gösteren sperm hücrelerinin oranı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmasına rağmen, gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05) (Tablo 4.7).

Bölgesel NEDL2 lokalizasyonunun değerlendirilmesinin ardından, sperm hücrelerinde gözlenen lokalizasyon dağılımı boyanma paternleri açısından analiz edilmiştir. Gruplar arası NEDL2 ekspresyonuna bakıldığında varikosel grubunda kontrol grubuna kıyasla düşük ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. Kontrol ve varikosel gruplarındaki bireylere ait sperm hücresi bölgelerinin boyanmasına göre dört farklı boyanma paterni belirlenmiştir. Birinci boyanma paterninde NEDL2 ekspresyonu, sperm hücresinin bağlantı parçası ve kuyruk esas parçasında yoğun olarak gözlenirken; baş, mitokondriyal kılıf ve kuyruk son parçasında izlenmemiştir (Şekil 4.7).

İkinci boyama paterninde ise baş ve kuyruk son parçada ekspresyon görülmezken, mitokondriyal kılıfta şiddetli olmak üzere esas parçada da NEDL2 ekspresyonu görülmüştür (Şekil4.7).

Üçüncü boyama paternine göre mitokondriyal bölge ve kuyruk son parçada NEDL2 ekspresyonu görülmezken kuyruk esas parçada ve başın post akrozomal bölgesinde şiddetli bir NEDL2 ekspresyonu görülmüştür.

Dördüncü boyama paterninde ise başta ekspresyon göstermezken, bağlantı parçasında, kuyruk esas parçada ve zayıf ekspresyon gösterdiği mitokondriyal bölgede de NEDL2 ekspresyonu gözlemlenmiştir.

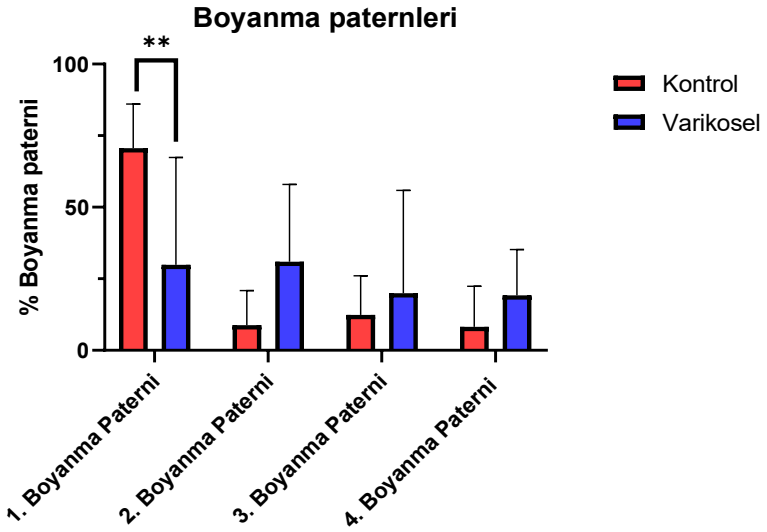
Tablo 4. 9. Kontrol Grubu ve Varikosel Grubundaki Bireylere Ait Boyama Paternlerinin karşılaştırılmalı Sonuçları

Parametre	**Grup 1 (Ort±SS)**	**Grup 2 (Ort±SS)**	**p değeri**
Birinci Boynma Paterni	70.64 ± 15.10	29.86 ± 38.56	0.0088*
İkinci Boyanma Paterni	8.79 ± 12.29	30.93 ± 26.79	0.3008
Üçüncü Boyanma Paterni	12.36 ± 13.65	19.93 ± 39.46	0.9594
Dördüncü Boyanma Paterni	8.21 ± 14.08	19.21 ± 16.20	0.8593

Farklı sperm boyanma paternlerinin hücreler arasındaki dağılımını belirlemek amacıyla, 7 farklı kontrol ve varikosel bireyden elde edilen sperm örneklerinde immünofloresan boyama uygulanmıştır. Her preparatta 200 sperm hücresi değerlendirilmiş olup, toplamda her grup için 1.400 sperm hücresi analiz edilmiştir. Kontrol grubunda birinci boyanma paterni toplam hücrelerin %70,64'inde gözlenirken, ikinci boyanma paterni %8,79 oranında saptanmıştır. Üçüncü boyanma paterni hücrelerin %12,36'sında tespit edilirken, dördüncü boyanma paterni ise %8,21 oranında bulunmuştur (Tablo 4.8). Varikosel grubunda ise boyanma paternleri sırasıyla %29,86, %30,93, %19,93 ve son olarak %19,21 olarak saptanmıştır (Tablo 4.8.). Buna göre, kontrol grubunda birinci boyanma paterni en yüksek oranda gözlenirken, varikosel grubunda ikinci boyanma paterni en yüksek oranda saptanmıştır.

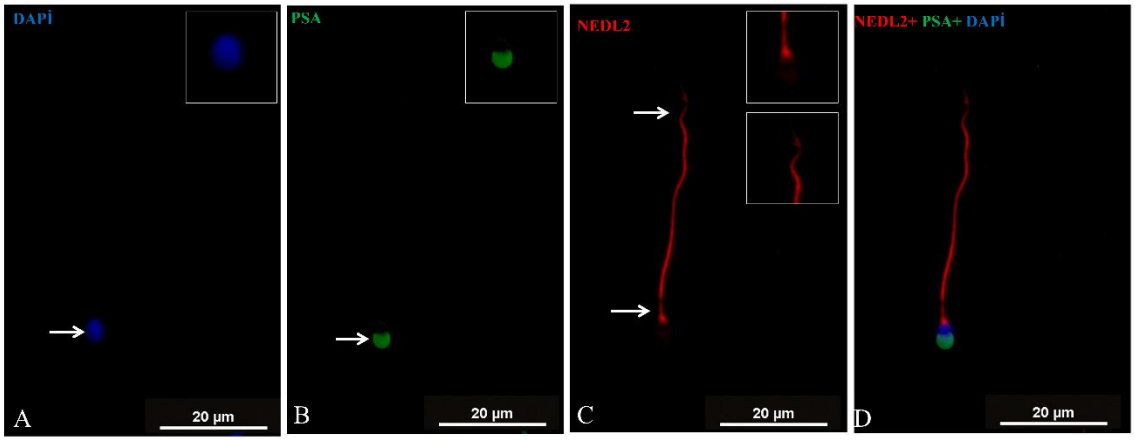
İmmünofloresan incelemelerde, varikoselli bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 ekspresyonu genel olarak kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, lokalizasyon temelli değerlendirmede mitokondriyal bölgede NEDL2 lokalizasyonu gösteren sperm hücrelerinin varikosel grubunda daha yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, NEDL2 ekspresyonunun sperm hücresinin baş, bağlantı parçası ve kuyruk bölgelerinde farklı boyanma paternleri sergilediği, bu farklılığın özellikle mitokondriyal bölgede belirginleştiği gözlenmiştir.

Kontrol ve varikosel grupları arasında yapılan karşılaştırmada, yalnızca birinci boyanma paterni açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p=0,024$). Birinci boyanma paterni kontrol grubunda, varikosel grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek oranda gözlenmiştir. Buna karşın, ikinci, üçüncü ve dördüncü boyanma paternleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (sırasıyla $p=0,143$; $p=0,896$ ve $p=0,219$). Sonuç olarak, değerlendirilen boyanma paternleri içerisinde yalnızca birinci boyanma paterni kontrol ve varikosel gruplarını ayırt eden anlamlı bir farklılık göstermiş, diğer boyanma paternlerinin ise gruplar arasında benzer dağılım sergilediği belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 4. Kontrol (n:7) ve varikosel (n:7) bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 boyanma paternlerinin yüzdesel dağılımı**.**

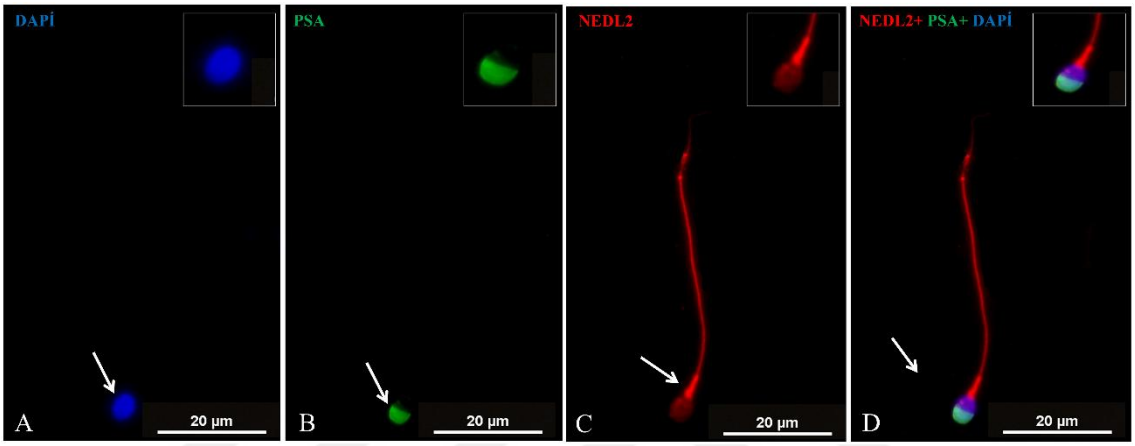
NEDL2'nin lokalizasyon gösterdiği bölgelere göre dört farklı boyanma paterni belirlenmiştir. Bu boyanma paternleri ayrıntılı olarak incelendiğinde; Kontrol grubundaki bireylere ait sperm hücrelerinde, NEDL2 ekspresyonunun lokalizasyonuna göre dört farklı boyanma paterni belirlenmiştir. Birinci boyanma paterninde NEDL2 ekspresyonu sperm hücresinin baş, mitokondriyal kılıf ve kuyruk son parçasında gözlenmezken, bağlantı parçası ve kuyruk esas parçada yoğun olarak saptanmıştır (Şekil 4.6.).



Şekil 4. 5. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde birinci boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) VE birleşik görüntü (D)

A: DAPI ile boyanmış sperm çekirdeği. B: PSA ile boyanmış akrozomal bölge. C: NEDL2'nin bağlantı parçası ve kuyruğun esas parçasındaki lokalizasyonu. D: DAPI, PSA ve NEDL2 sinyallerinin birleşik görüntüsü.

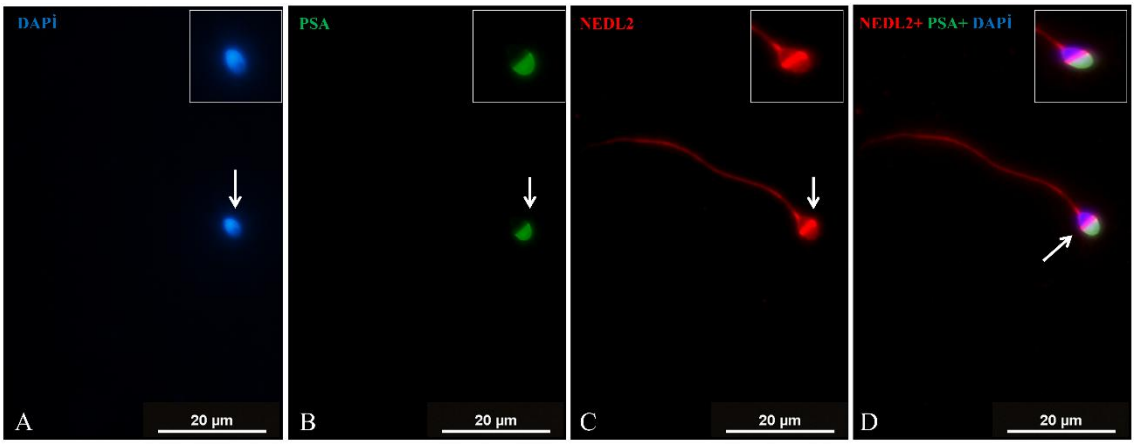
İkinci boyama paternine göre ise NEDL2 baş, bağlantı ve kuyruk son kısımda lokalizasyon göstermezken kuyruk mitokondriyal kılıfta ve kuyruk esas parçada şiddetli ekspresyon sergileyerek lokalize olmuştur (Şekil4.7.).



Şekil 4. 6. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde ikinci boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D)

A: DAPI ile boyanmış sperm çekirdeği. B: PSA ile boyanmış akrozomal bölge. C: NEDL2'nin mitokondriyal kılıf ve kuyruğun esas parçasındaki lokalizasyonu. D: DAPI, PSA ve NEDL2 sinyallerinin birleşik görüntüsü.

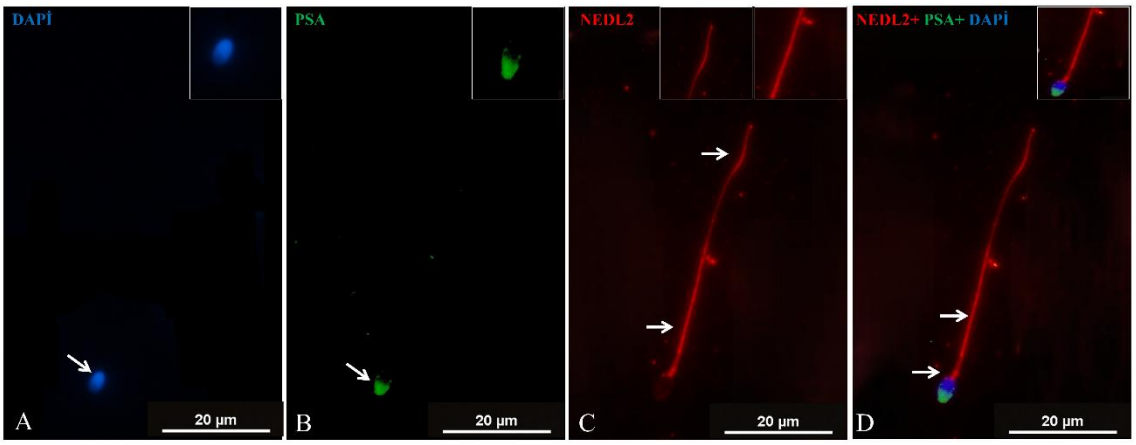
Üçüncü boyanma paterninde NEDL2 ekspresyonunun özellikle spermatozoonun post-akrozomal bölgesinde ve bağlantı parçasında yoğunlaştığı gözlenmiştir. Ayrıca ekspresyonun kuyruğun esas parçası boyunca devam ettiği belirlenmiştir. Buna karşın mitokondriyal kılıf bölgesinde ve kuyruk son parçasında NEDL2 ekspresyonu saptanmamıştır (Şekil 4.8.).



Şekil 4. 7. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde üçüncü boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D)

A: DAPI ile boyanmış sperm çekirdeği. B: PSA ile boyanmış akrozomal bölge. C: NEDL2'nin post-akrozomal bölge, bağlantı parçası ve kuyruğun esas parçasındaki lokalizasyonu. D: DAPI, PSA ve NEDL2 sinyallerinin birleşik görüntüsü.

Dördüncü boyanma paterninde NEDL2 ekspresyonunun spermatozoonun baş bölgesinde bulunmadığı gözlenmiştir. Buna karşın bağlantı parçası, kuyruğun esas parçası ve son parçasında belirgin bir ekspresyon saptanmıştır. Mitokondriyal kılıf bölgesinde de NEDL2 lokalizasyonu izlenmekle birlikte, bu bölgedeki boyanma şiddetinin diğer pozitif bölgelere kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4. 8. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sperm hücrelerinde dördüncü boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D)

A: DAPI ile boyanmış sperm çekirdeği. B: PSA ile boyanmış akrozomal bölge. C: NEDL2'nin kuyruğun esas parçası ve son parçasındaki lokalizasyonu. D: DAPI, PSA ve NEDL2 sinyallerinin birleşik görüntüsü.

Kontrol grubunda gözlendiği üzere, varikosel grubu hastalarına ait sperm yaymalarında gerçekleştirilen immünofloresan analizler sonucunda da dört farklı boyanma paterni tespit edilmiştir. İncelenen preparatlarda NEDL2 ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla varikosel grubunda genel olarak daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, morfolojik anomali gösteren bölgelerde NEDL2 ekspresyonunun yoğunlaştığı, ancak genel sinyal şiddetinin kontrol grubuna göre daha zayıf olduğu belirlenmiştir.

Birinci boyanma paterninde NEDL2 sperm hücrelerinin baş ve mitokondriyal bölgesi hariç tüm kuyrukta ekspresyon göstermiştir. (Şekil 4.10).

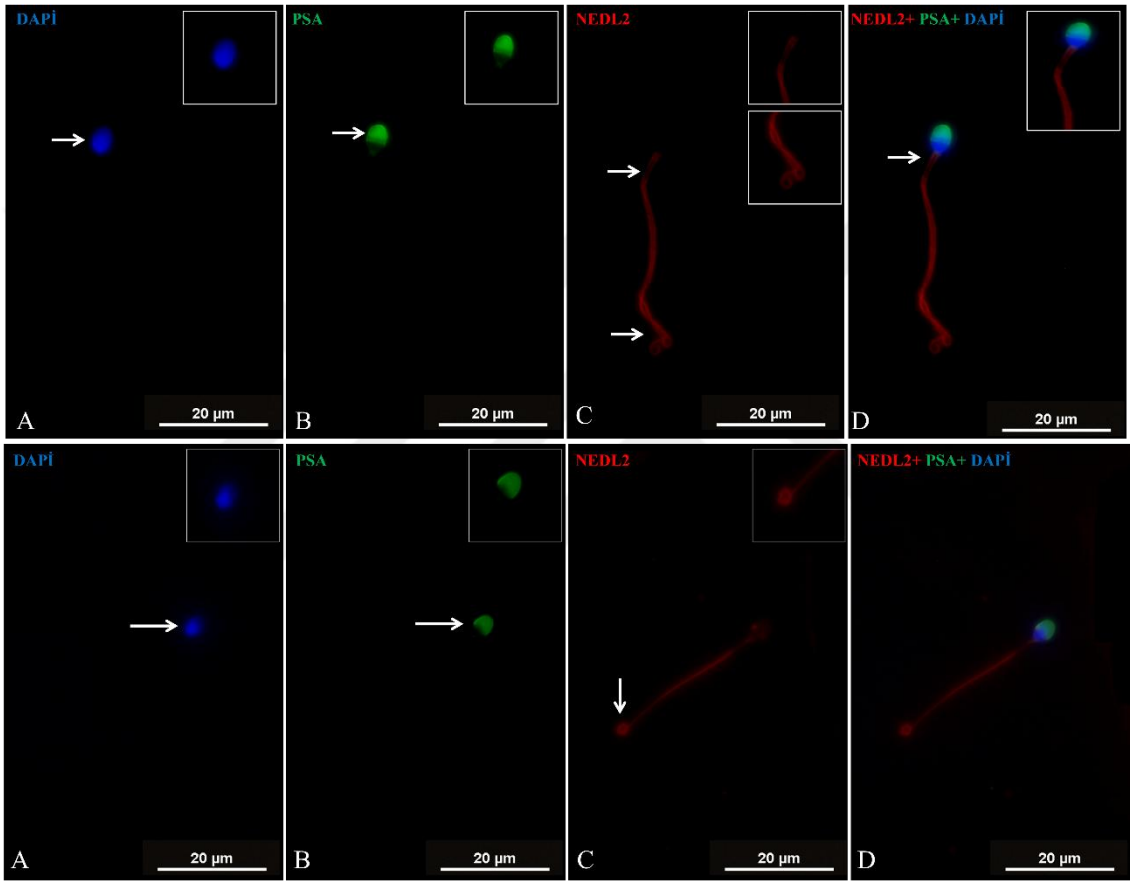
İkinci boyama paterninde NEDL2 ekspresyonu, baş bölgesi ve kuyruğun son parçasında gözlenmemiştir. Buna karşın, mitokondriyal kılıfta belirgin NEDL2 ekspresyonu tespit edilmiştir. Ayrıca, esas parçadan kuyruğun son parçasına doğru ekspresyon yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.11).

Üçüncü boyama paterninde ise NEDL2 ekspresyonunun mitokondriyal bölge ve kuyruğun son parçasında bulunmadığı belirlenmiştir. Buna karşılık, esas parçada pozitif NEDL2 boyanması saptanmıştır. Bununla birlikte, baş anomalisi gösteren spermatozoalarda NEDL2 ekspresyonunun başın post-akrozomal bölgesinde kümelenme şeklinde ekspresyon verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.12).

Dördüncü boyama paterninde ise başta ekspresyon göstermezken, bağlantı parçasında ve tüm kuyrukta kontrol grubuna kıyasla azalan NEDL2 ekspresyonu gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).

Varikosel tanısı konulan VR5 ve VR3 kodlu bireylere ait sperm hücrelerinde, immünofloresan çalışmalar sonucunda birinci boyanma paterninin bu bireylerde daha sık gözlenmesi nedeniyle, NEDL2 ekspresyonu bu patern doğrultusunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sperm başı, bağlantı parçası ve mitokondriyal

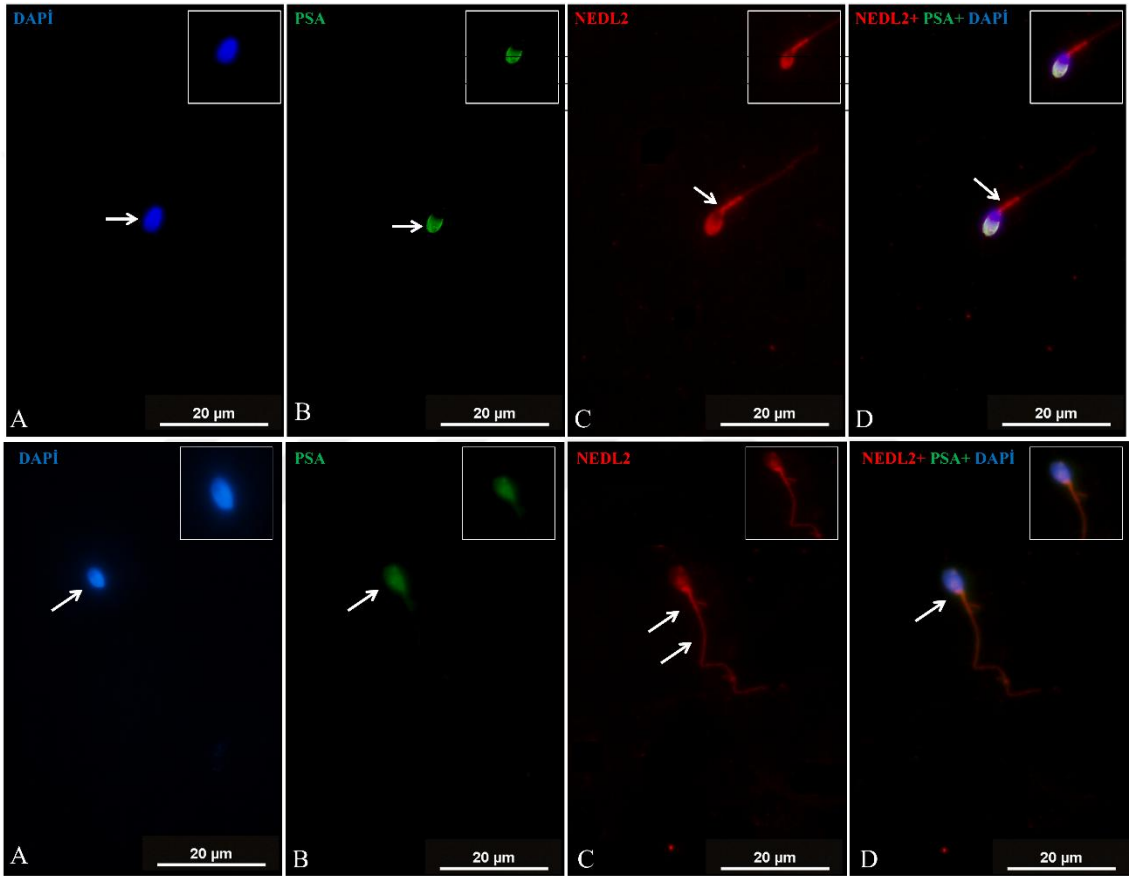
bölgede her iki varikosel bireyde de NEDL2 ekspresyonunun negatif olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, esas parçada kontrol grubuna benzer şekilde varikosel grubunda da NEDL2 ekspresyonu saptanmış olsa da kontrol grubuna kıyasla ekspresyon şiddetinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, kontrol grubunda kuyruğun son parçasında NEDL2 ekspresyonu gözlenmezken, varikoselli bireylerde bu bölgede pozitif boyanma tespit edilmiştir. (Şekil 4.10).



Şekil 4. 9. Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde birinci boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D)
A: DAPI ile boyanmış sperm çekirdeği. B: PSA ile boyanmış akrozomal bölge. C: NEDL2'nin esas parçada ve kuyruğun son parçasındaki lokalizasyonu. D: DAPI, PSA ve NEDL2 sinyallerinin birleşik görüntüsü. Varikosel grubunda NEDL2 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla daha zayıf olduğu gözlenmiştir.

Varikosel tanısı alan VR2 ve VR6 kodlu bireylere ait sperm hücrelerinde, immünofloresan çalışmalar sonucunda ikinci boyanma paterninin bu bireylerde daha sık

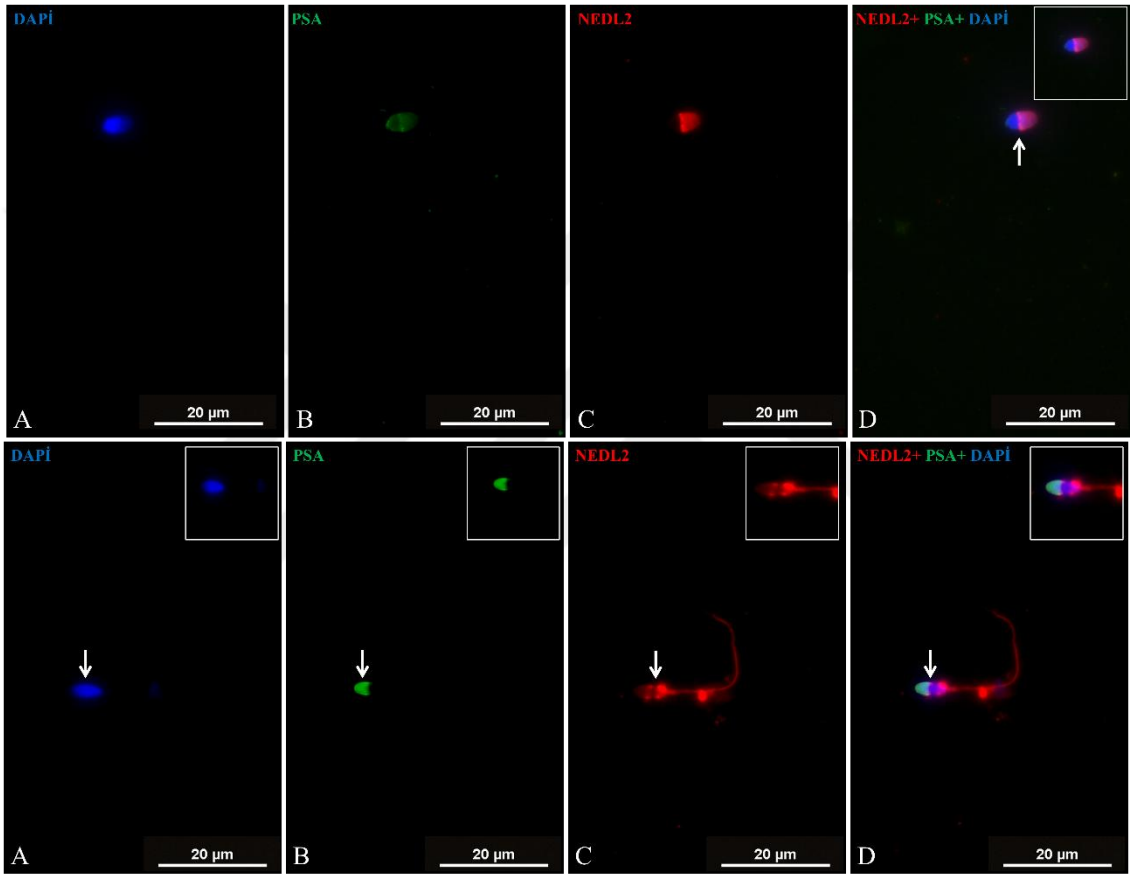
gözlenmesi nedeniyle, NEDL2 ekspresyonu bu patern doğrultusunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda sperm başı, bağlantı parçası ve kuyruğun son parçasında ekspresyon gözlenmezken, varikosel grubunda da benzer şekilde baş, bağlantı parçası ve kuyruğun son parçasında NEDL2 ekspresyonunun negatif olduğu belirlenmiştir. Mitokondriyal bölgede ise kontrol grubuna kıyasla azalan NEDL2 ekspresyonu saptanmıştır. Bununla birlikte, kontrol grubuna göre varikosel grubunda sperm kuyruğunun esas parçasında NEDL2 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4. 10. Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde ikinci boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D)

A: DAPI ile boyanmış sperm çekirdeği. B: PSA ile boyanmış akrozomal bölge. C: NEDL2'nin mitokondriyal bölge ve esas parçadaki lokalizasyonu. D: DAPI, PSA ve NEDL2 sinyallerinin birleşik görüntüsü. Varikosel grubunda NEDL2 ekspresyonunun mitokondriyal bölgede ve esas parçada kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlenmiştir.

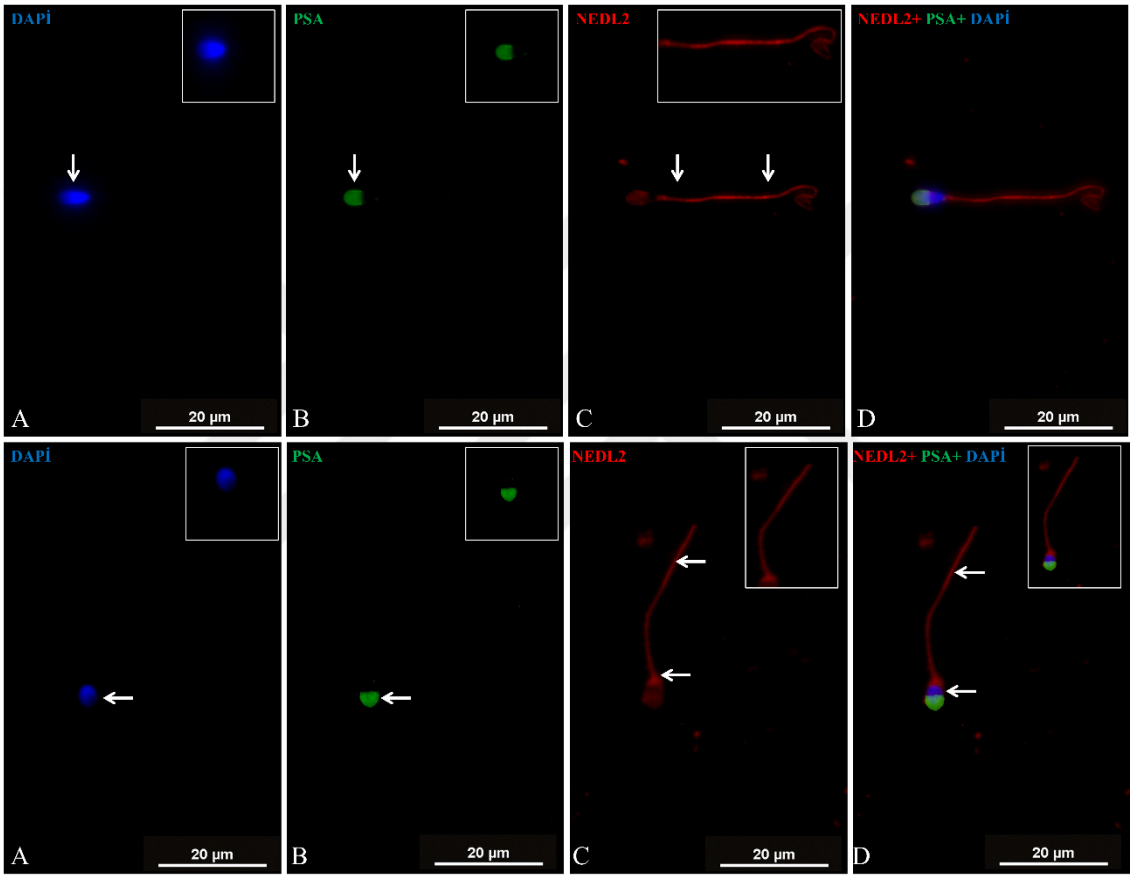
Varikosel tanısı alan VR4 ve VR6 kodlu bireylere ait sperm hücrelerinde, immünofloresan çalışmalar sonucunda üçüncü boyanma paterninin bu bireylerde daha sık gözlenmesi nedeniyle, NEDL2 ekspresyonu bu patern doğrultusunda değerlendirilmiştir. Üçüncü boyama paternine göre NEDL2, spermlerin baş bölgesinde dağınık granüler kümelenmeler şeklinde ekspresyon göstermiştir. Ayrıca, mitokondriyal bölgede ekspresyon düzeyinde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4. 11**.** Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde üçüncü boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D)

A: DAPI ile boyanmış sperm çekirdeği. B: PSA ile boyanmış akrozomal bölge. C: NEDL2'nin baş bölgesinde dağınık granüler kümelenmeler şeklindeki lokalizasyonu. D: DAPI, PSA ve NEDL2 sinyallerinin birleşik görüntüsü. Varikosel grubunda NEDL2 ekspresyonunun baş bölgesinde dağınık granüler kümelenmeler şeklinde dağılım gösterdiği, mitokondriyal bölgede ise ekspresyon yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir.

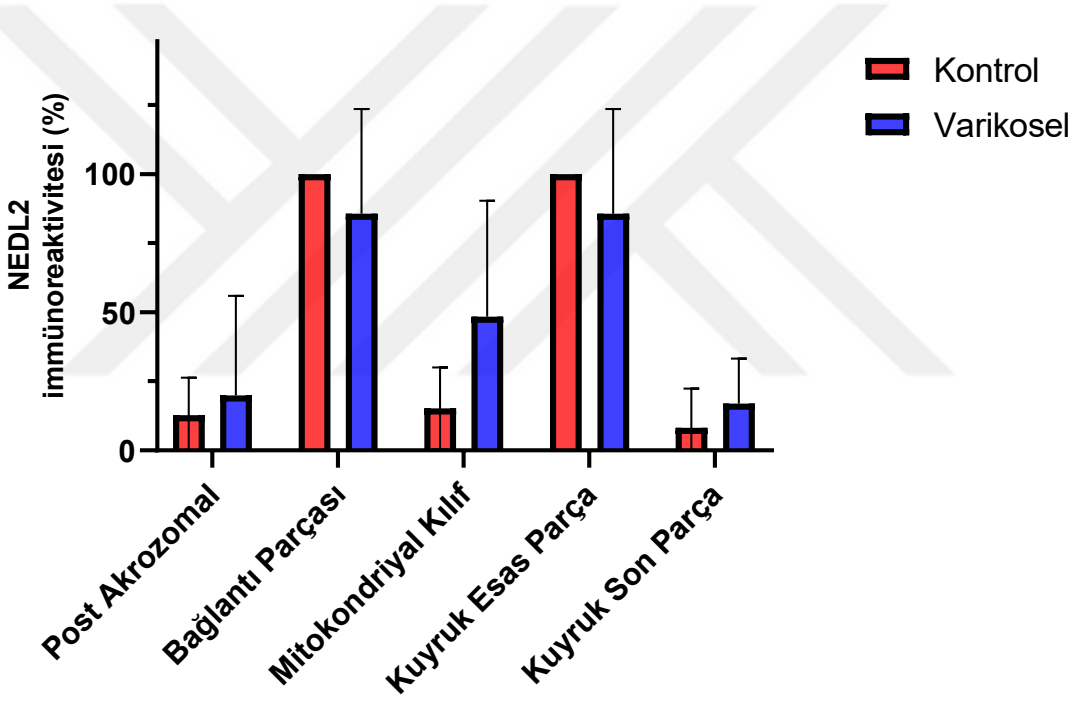
Varikosel tanısı alan VR6 ve VR7 kodlu bireylere ait sperm hücrelerinde, immünofloresan çalışmalar sonucunda üçüncü boyanma paterninin bu bireylerde daha sık gözlenmesi nedeniyle, NEDL2 ekspresyonu bu patern doğrultusunda değerlendirilmiştir. Dördüncü boyama paternine göre NEDL2, spermatozoanın baş bölgesi dışında bağlantı parçası ve kuyruğun tamamında ekspresyon göstermiştir.



Şekil 4. 12. Varikosel grubuna ait sperm hücrelerinde dördüncü boyanma paternine göre DAPI (A), PSA (B), NEDL2 (C) ve birleşik görüntü (D)

A: DAPI ile boyanmış sperm çekirdeği. B: PSA ile boyanmış akrozomal bölge. C: NEDL2'nin bağlantı parçası ve kuyruğun tamamındaki ekspresyonu. D: DAPI, PSA ve NEDL2 sinyallerinin birleşik görüntüsü. Varikosel grubunda NEDL2 ekspresyonunun spermatozoanın baş bölgesi dışında bağlantı parçası ve kuyruğun tüm segmentlerinde gözlendiği tespit edilmiştir.

Kontrol ve varikosel gruplarında elde edilen tüm immünofloresan bulgular birlikte değerlendirildiğinde, NEDL2 ekspresyonunun her iki grupta da ağırlıklı olarak sperm kuyruğu boyunca lokalize olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, varikosel grubunda özellikle mitokondriyal kılıf, post-akrozomal bölge ve kuyruk son parçasındaki dağılım paternlerinde kontrol grubuna kıyasla değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca varikoselli bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 ekspresyonunun bazı morfolojik anomalilerle ilişkili bölgelerde yoğunlaşma eğilimi gösterdiği dikkat çekmiştir. Gruplar arasındaki NEDL2 ekspresyonunun bölgesel dağılımına ilişkin karşılaştırmalı değerlendirme Şekil 4.14'te sunulmuştur.



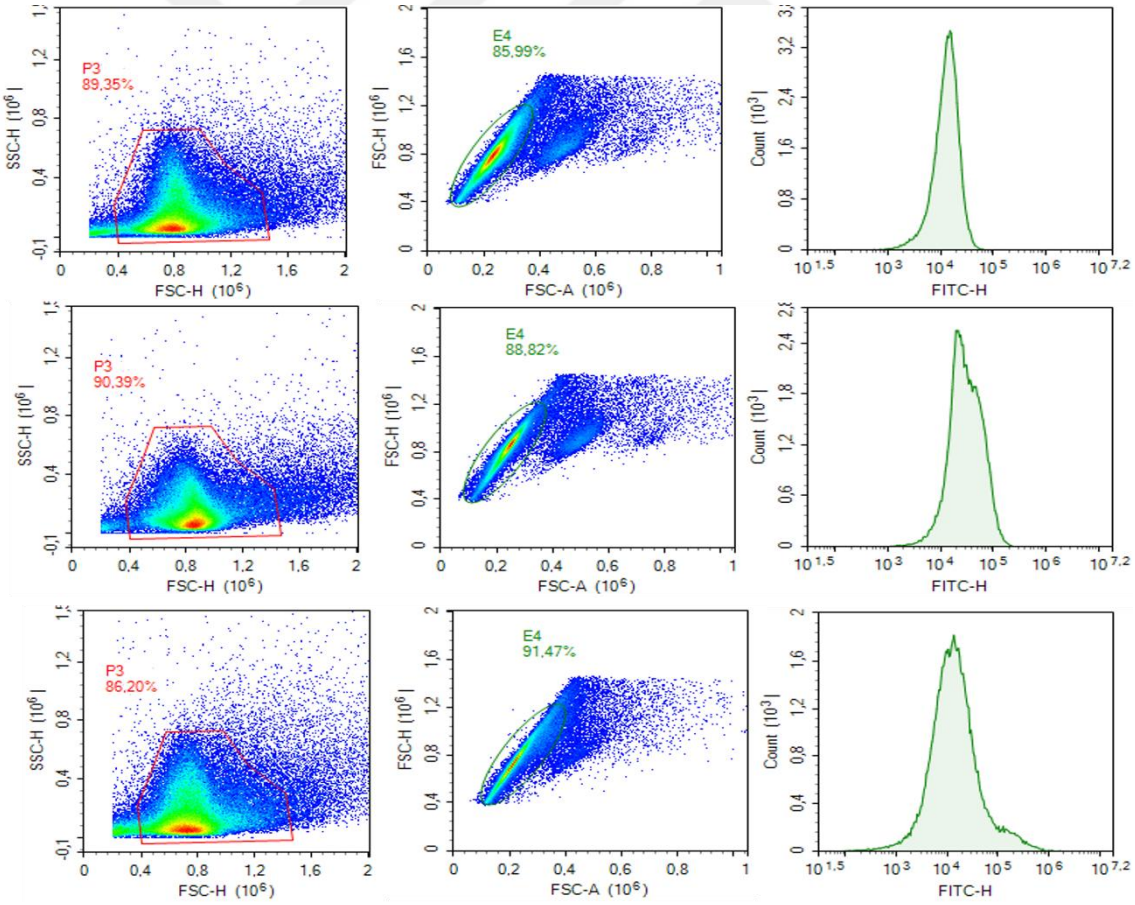
Şekil 4. 13. Kontrol (n:7) ve varikosel (n:7) bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 ekspresyonunun lokalizasyon paternlerinin yüzdesel dağılımı.

Kontrol ve varikosel gruplarına ait NEDL2 lokalizasyonu karşılaştırıldığında, mitokondriyal kılıf bölgesinde varikosel grubunda artış eğilimi, bağlantı parçası ve kuyruk esas parçada ise azalma eğilimi gözlenmiştir. Post-akrozomal ve kuyruk son parça bölgelerinde ise daha sınırlı farklılıklar saptanmıştır.

4.4. SPERM HÜCRELERİNDE NEDL2 EKSPRESYONUNUN AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

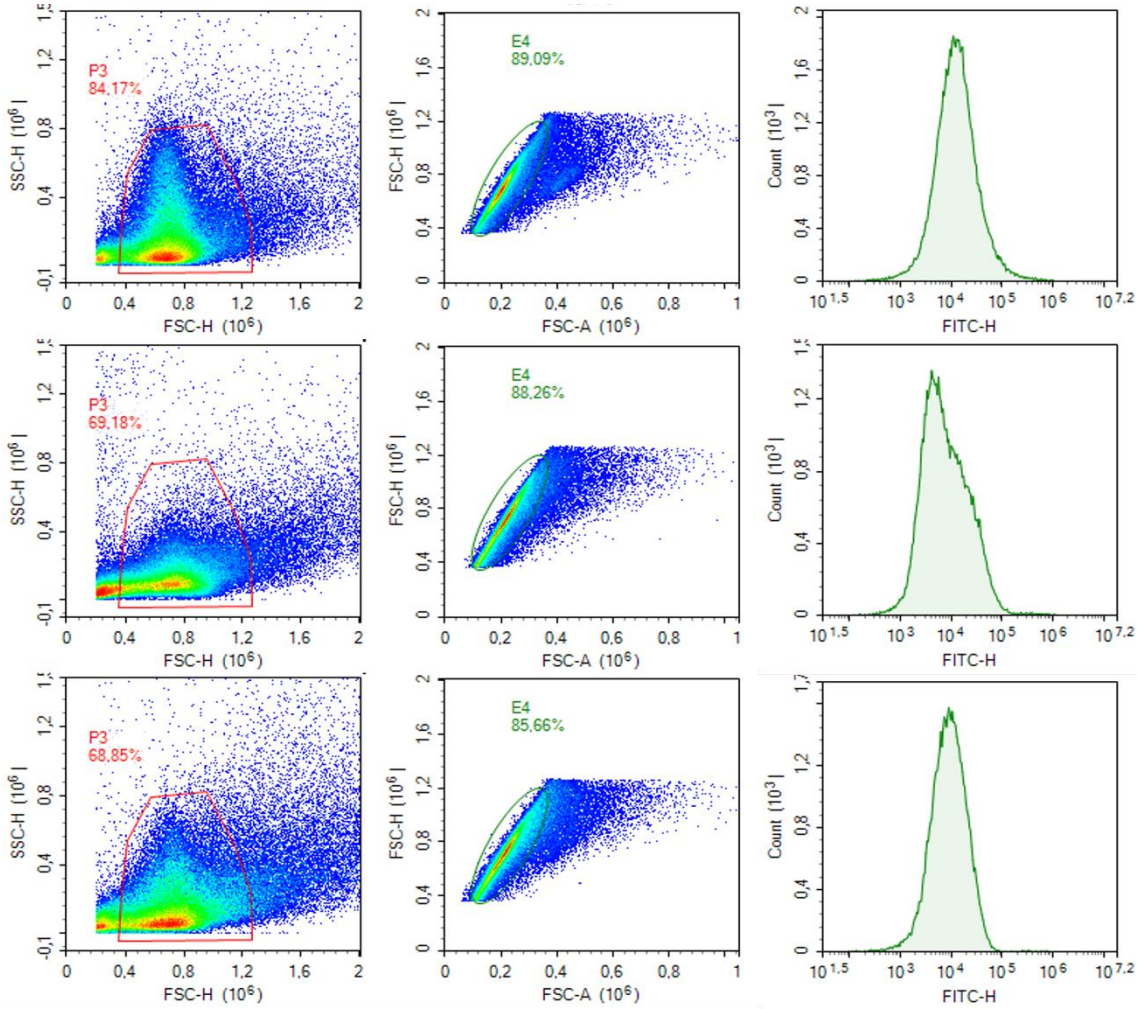
NEDL2 proteininin kontrol ve varikosel bireylere ait sperm hücrelerindeki lokalizasyonlarını belirledikten sonra bu proteinin ekspresyon derecesini belirlemek için akım sitometri yöntemi ile deneylere devam edilmiştir. Bu amaçla öncelikle sperm hücresinin boyutu göz önüne alınarak öncelikle hücre popülasyonumuz seçilmiş, daha sonra ise bu popülasyon içerisinde başka hücrelerle birleşip hatalı ışıma verecek hücreleri elemek amacıyla akım sitometri cihazı içerisindeki akış kabininden tek tek ışıma vererek geçen hücreler seçilmiş ve de bu hücrelerin yoğunluğu ölçülmüştür.

Akım sitometri deneyleri sonucunda yaptığımız analizler sonucunda NEDL2 antikoru ile işaretlenen kontrol bireylere ait sperm hücrelerinin varikosel bireylere göre daha yoğun bir ekspresyon verdiği görülmüştür.



Şekil 4. 14. Kontrol bireylerde akım sitometrik analizler ile NEDL2 ekspresyonunun gösterilmesi.

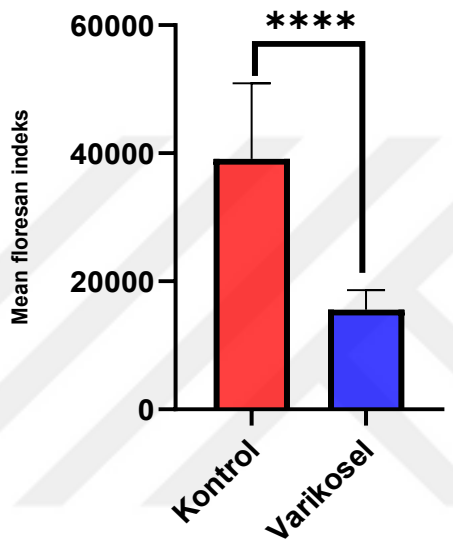
Üç farklı fertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan akım sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinden akan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait NEDL2 ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.



Şekil 4. 15. Varikosel bireylerde akım sitometrik analizler ile NEDL2 ekspresyonunun gösterilmesi.

Üç farklı infertil bireyden alınan sperm örnekleri ile yapılan akım sitometrik analizler sonucunda belirlediğimiz sperm popülasyonuna ait grafik (solda), bu popülasyonlar içerisinde tek sıra halinde akış kabini içerisinden akan hücrelere ait sperm popülasyonuna ait grafik (ortada) ve bu hücrelere ait NEDL2 ekspresyonuna ait grafik (sağda) görülmektedir.

Akış sitometrisi analizi sonucunda, kontrol grubunda NEDL2 pozitif hücre oranı %39,136, varikosel grubunda ise %15,560 ± olarak belirlenmiştir. Bağımsız örneklem t-testi sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p<0,0001). Gruplar arasındaki ortalama fark-23,576 (%95 GA:-28,091 – -19,060) olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, varikosel grubunda NEDL2 pozitif hücre oranının kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığını göstermektedir.



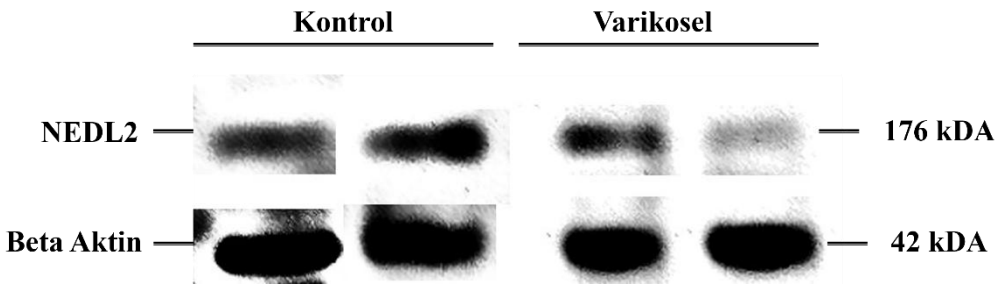
Şekil 4. 16. NEDL2 ekspresyonunun kontrol ve infertil bireylerde akım sitometrik yöntemle karşılaştırılmalı olarak değeri.

Bu proteinin ekspresyonunda infertil bireylerde fertil bireylere göre anlamlı bir azalma saptanmıştır (p<0.001)

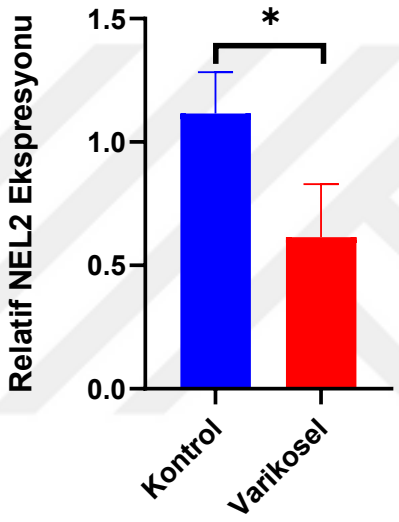
4.5. SPERM HÜCRELERİNDE NEDL2 EKSPRESYONUNUN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

İmmünofloresan ve akım sitometri analizleri kantitatif olarak desteklemek amacı ile western blot analizi yapılmıştır. Kontrol ve varikosel bireylere ait sperm ekstraktları ile yapılan western blot analizi sonucunda elde edilen membranın NEDL2 antikoru ile muamelesi sonucunda NEDL2 (176 kDa) proteinine karşılık gelen bantların kontrol bireylerde varikosel bireylere göre daha yüksek dansitometriye sahip olduğu saptanmıştır. (Şekil18). Yani, NEDL2 kontrol bireylerin spermlerinde daha fazla eksprese

edilmektedir.



Şekil 4. 17. NEDL2 eskpresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi



Şekil 4. 18**.** NEDL2 ekspresyonunun kontrol ve varikosel bireylerde western blot ile karşılaştırmalı olarak değeri

NEDL2 varikosel bireylerde kontrol bireylere göre anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0.001$).

4.TARTIŞMA

Varikosel, erkek infertilitesinin en sık görülen ve düzeltilebilir nedenlerinden biri olup, testiküler fonksiyonlar üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu bilinmektedir (Leslie vd., 2023). Varikoselin patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, artmış testiküler sıcaklık, hipoksi, venöz staz ve özellikle oksidatif stresin hastalığın gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Galea vd., 2023). Varikosel varlığında reaktif oksijen türlerinin artışı, sperm hücrelerinde zar hasarı, DNA parçalanması ve hücre ölümü gibi olumsuz etkiler oluşturarak sperm fonksiyonlarını bozmakta ve sperm kalitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Arya vd., 2022). **Bu nedenle, varikosel ile ilişkili oksidatif stresin hücresel protein homeostazı üzerindeki etkilerinin araştırılması önem arz etmektedir.**

Hücresel protein homeostazının sürdürülmesinde temel görev üstlenen ubikitin-proteazom sistemi (UPS), hasarlı, yanlış katlanmış veya fonksiyonunu kaybetmiş proteinlerin seçici olarak yıkımından sorumludur. UPS içerisinde substrat proteinlerin ubikitin ile işaretlenmesini takiben 26S proteazom tarafından yıkıma uğratılması, hücresel protein kalitesinin korunmasında merkezi bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Sutovsky, 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalar, UPS'nin yalnızca hücre içi protein döngüsünün düzenlenmesinde değil, aynı zamanda erkek üreme sistemi fizyolojisinde de önemli işlevlere sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle sperm kapasitasyonu, akrozomal reaksiyon ve zona pellucida ile etkileşim gibi fertilizasyonun kritik aşamalarında UPS'nin aktif rol oynadığı bildirilmektedir (Zimmerman & Sutovsky, 2009) (Sutovsky, 2011). Ayrıca proteazomal aktivitenin inhibisyonunun sperm kapasitasyonu ve fertilizasyon süreçlerini olumsuz etkilediği gösterilmiş olup, bu durum UPS'nin sperm fonksiyonları açısından önemini desteklemektedir (Zimmerman & Sutovsky, 2009) (Zigo vd., 2023). UPS'nin hedef özgüllüğü büyük ölçüde E3 ubikitin ligazlar tarafından belirlenmekte olup, bu enzimler substrat proteinlerin tanınması ve işaretlenmesinde kritik düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır (Glickman & Ciechanover, 2002). **Bu nedenle, varikosel ve bu süreçte görev alan protein kalite kontrol sistemlerinin ve bu mekanizmalar içerisinde oldukça önemli bir yere sahip UPS'nin varikosel patogenezdeki rolünün araştırılması da önem arz etmektedir.**

Ubikitin-proteazom sisteminin substrat seçiciliğini belirleyen E3 ubikitin ligazlardan biri olan NEDL2 (HECW2), protein homeostazının düzenlenmesinde görev alan önemli bir düzenleyici proteindir. Literatürde NEDL2'nin protein degradasyonunun yanı sıra hücresel homeostaz, hücresel stres, apoptoz, DNA hasar yanıtının düzenlenmesinde ve protein yıkım mekanizmalarının düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir (Miyazaki vd., 2003) (Lu vd., 2013) (Mao vd., 2020). Son yıllarda NEDL2'nin özellikle tümör biyolojisindeki düzenleyici etkileri üzerinde durulmasına karşın (Shen vd., 2024b), erkek üreme sistemi ve infertilitedeki rolüne ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır. Testis dokusunda UPS'nin yüksek aktivite göstermesi ve spermatogenez boyunca protein kalite kontrolünün kritik öneme sahip olması, NEDL2'nin erkek üreme fizyolojisinde ve sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Richburg vd., 2014).

Literatürde ubikitin-proteazom sisteminin infertilitedeki rolünü ve UPS bileşenlerinin sperm fonksiyonları ile ilişkisini değerlendiren çok sayıda deneysel ve derleme çalışma bulunmasına karşın, bu çalışmaların büyük bölümü sistemin genel mekanizmalarına odaklanmıştır (Sutovsky, 2011) (Zimmerman & Sutovsky, 2009). Buna karşılık, E3 ubikitin ligazlarından biri olan NEDL2'nin varikosel tanılı bireylerin sperm hücrelerindeki dağılımı ve özellikle varikosel patogenezindeki olası rolüne ilişkin çalışma sayısı oldukça sınırlıdır.

Literatürdeki bu bilgiler ışığında; tezimde NEDL2'nin varikosel patogenezindeki olası rolünü aydınlatmak ve literatüre katkı sağlamak amacıyla sperm örnekleri üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda varikosel ve kontrol gruplarına ait semen parametreleri değerlendirilmiş, sperm morfolojisi ise Kruger kriterlerine göre analiz edilmiştir. Ayrıca sperm hücresinde NEDL2'nin lokalizasyonu, hücresel düzeydeki değişiklikler ve protein ekspresyonundaki farklılıklar immünofloresan, akım sitometri ve western blot analizleri ile karşılaştırmalı çalışılmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda NEDL2 proteininin varikosel tanısı alan bireylerin spermlerinde sağlıklı bireylerin sperm hücrelerine göre anlamlı bir azalma göstermesi NEDL2 ve üyesi olduğu UPS'nin varikoselin patogenezinde rol aldığı yönündeki hipotezimizi güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Varikoselin Semen Parametreleri ve Sperm Morfolojisi Üzerindeki Etkileri

M H Nasr-Esfahani ve ark., (2009), yapmış olduğu varikoselektomi öncesi ve sonrası semen parametrelerine baktıkları çalışmalarında varikoselin semen parametrelerini normal değerler altına düşürdüğünü göstermişlerdir (Nasr-Esfahani vd., 2009). Çalışmamızda elde edilen semen analizi sonuçları değerlendirildiğinde, varikosel grubunda sperm yoğunluğu ve toplam sperm sayısında kontrol grubuna kıyasla belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermesi litaretürü desteklemektedir. Bu durum, varikoselin spermatogenez süreci üzerindeki olumsuz etkisini destekleyen literatür ile uyumlu olup, testiküler fonksiyon bozukluğunun sperm üretimi üzerinde belirgin bir baskı oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu sonuçlar, varikoselin semen parametreleri üzerindeki olumsuz etkisini bildiren literatür ile uyumludur.

Motilite parametreleri incelendiğinde, progresif hareketli sperm oranında (PR) ve total motilitede belirgin azalma izlenirken, immotil sperm oranındaki artış varikosel grubunda sperm hareketliliğinin ciddi şekilde etkilendiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, varikosel varlığında artan oksidatif stres ve testiküler yapı bozukluğunun Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve ATP üretimindeki azalma sonucunda sperm hareketliliğinin olumsuz etkilenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca likefaksiyon süresinin varikosel grubunda uzamış olması, semen sıvılaşma sürecinde enzimatik ve biyokimyasal değişikliklerin etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Semen hacmi açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması ise varikoselin daha çok sperm üretimi ve hareketliliği üzerine etkili olduğunu, seminal sıvı sekresyonundan ziyade spermatogenez ve sperm fonksiyonlarını hedef aldığını göstermektedir.

İlki ve ark., (2025), varikoselli ve sağlıklı bireylerde gerçekleştirdiği çalışmada, varikosel grubunda sperm morfolojisinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu bildirilmiştir (İlki vd., 2025). Çalışmamızda Kruger (strict) morfoloji sonuçları da bu bulgularla uyumlu olup bu literatürü desteklemektedir. Bu durum, varikoselin artmış skrotal sıcaklık ve oksidatif stres gibi mekanizmalar aracılığıyla sperm morfolojisini olumsuz etkilediğini düşündürmektedir.

Literatürde, Nasr-Esfahani ve ark., (2009) tarafından varikoselektomi öncesi ve sonrası semen parametrelerinin değerlendirildiği çalışmada varikoselin semen kalitesini

olumsuz etkilediği, İlki ve ark., (2025) tarafından ise varikoselli bireylerde sperm morfolojisinin sağlıklı bireylere göre anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, varikoselin sperm üretimi, motilitesi ve morfolojisini çok yönlü olarak olumsuz etkileyerek semen kalitesinde genel bir azalmaya neden olduğu görülmektedir. Bu doğrultuda, tez çalışmamızda varikosel grubunda sperm yoğunluğu ve toplam sperm sayısındaki azalma, progresif ve total motilitedeki düşüş, immotil sperm oranındaki artış ile anormal morfolojili sperm oranındaki artış, literatürde bildirilen varikoselin semen kalitesi üzerindeki olumsuz etkileriyle uyum göstermektedir. Bu bulgular, varikoselde artan oksidatif stres, testiküler mikrosirkülasyon bozukluğu ve spermatogenezde meydana gelen bozulmanın semen parametrelerindeki kötüleşmenin temel mekanizmaları arasında yer alabileceğini düşündürmektedir.

Varikosel Patogenezinde Ubikitin-Proteazom Sistemi ve NEDL2'nin Olası Rolü

Literatürde Abdel-Meguid ve ark., (2011), varikosel varlığında varikoselektomi uygulamasının medikal tedaviye kıyasla sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisini anlamlı derecede düzelttiği ve spontan gebelik oranlarını 3 katın üzerinde artırdığı net bir şekilde ortaya konulmuştur (Abdel-Meguid vd., 2011). Varikoselektominin bu klinik ve histolojik geri döndürülebilirlik başarısı, varikoselin testiküler mikroçevrede yarattığı hasarın moleküler düzeyde dinamik bir düzenlemeye tabi olduğunu düşündürmektedir. Bu doğrultuda, tez çalışmamızda varikosel grubunda ubikitin-proteazom sisteminin (UPS) önemli bir E3 ligazı olan NEDL2 ekspresyonunda saptanan anlamlı azalışı, Abdel-Meguid ve ark., (2011) tarafından belirtilen varikosele bağlı semen kalitesindeki gerilemenin ve fonksiyonel kayıpların altında yatan hücresel süreçlerin, protein kalite kontrol mekanizmalarındaki yetersizliklerin özellikle NEDL2 eksikliği ile doğrudan ilişkili olabileceği yönündeki hipotezimiz desteklemektedir. Bu durum, gelecekte cerrahi başarının veya testiküler iyileşmenin takibinde NEDL2 gibi UPS bileşenlerinin tanıda prognostik biyobelirteç ve tedaviye yardımcı bir ajan olarak değerlendirilebilmesine zemin hazırlamaktadır.

Pallotti ve ark., (2018) varikosel patolojisinin sperm konsantrasyonu, toplam sayı ve ileri hareketlilik gibi temel semen parametrelerinin klinik olarak anlamlı derecede bozulduğu yönündeki literatür bulgularına ek olarak, bu çalışmada inceledikleri yüksek

sayıdaki varikosel vakalarının önemli bir kısmının spermiyogram parametrelerinin hala WHO referans sınırları içerisinde yer alması, varikoselin rutin sperm kalitesi üzerindeki klinik yansımasının önemli olduğunu fakat standart parametreleri etkilenmeyen olgularda semenin biyo-fonksiyonel düzeyde zarar görmüş olabileceği hipotezi, bu patolojinin rutin testlerin ötesinde daha derinlemesine özellikle moleküler odaklı incelenmesi gerektiğini göstermektedir (Pallotti vd., 2018). Bu çalışma ile uyumlu olarak tez çalışmamda kontrol ve varikosel grubuna ait sperm örnekleri karşılaştırıldığında varikosel grubunda kontrol grubuna göre semen parametlerinde istatistiksel bir azalma fakat bazı varikosel olgularında ise hala semen parametrelerinin normal sınırlar içerisinde seyrettiği belirlenmiştir. Tezimin hipotezi ile uyumlu olarak normal semen parametrelerine sahip, normal morfoloji gösteren varikosel olgularında moleküler mekanizmaların özelliklede UPS'nin disfonksiyonunun neden olabileceği varikosel patogenezini ortaya koyabilmek amacı ile araştırmayı hedeflediğimiz ubikitin-proteazom sisteminin bileşenlerinden biri olan NEDL2 ekspresyonunun varikosel grubunda saptanan belirgin azalışı ve morfolojik olarak anomalili bölgelerdeki yoğunlaşma eğilimi, varikoselin moleküler patogenezinde ve sperm kalite kontrol mekanizmalarında UPS proteinlerinin kritik ve potansiyel bir biyobelirteç rolü üstlenebileceği yönündeki hipotezimiz güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Afiyani ve ark., (2014) tarafından sıçan modelinde gerçekleştirilen bir çalışmada, testiküler ısı artışı ve oksidatif stresin Ubikitin-Proteazom Sistemini (UPS) doğrudan etkilediği gösterilmiştir. Varikoselin fertiliteyi olumsuz etkileyen en kabul görmüş mekanizmalarından biri olan testis içi sıcaklık artışı olduğunu destekleyen bu çalışma, sıcaklık artışına bağlı gelişen hücresel stres ortamında moleküler şaperon olan HSPA2 üretimi ile kusurlu sperm hücrelerinin testis ve epididimde ayıklanmasını sağlayan Ubikitin-Proteazom Sisteminin (UPS) nasıl etkilendiğini doğrudan hasarlı dokuda (testis ve epididimiste) incelemeyi amaçlamıştır. Varikoselli testis dokusunda hasarlı proteinlerin onarımına yönelik bir yanıt olarak HSPA2 şaperon protein ekspresyonunun 2,2 kat arttığı, buna karşın epididimiste hasarlı/kusurlu sperm hücrelerinin işaretlenerek eliminasyonunu sağlayan genel ubikitinasyon seviyelerinin ise anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (Afiyani vd., 2014). Literatürdeki bu deneysel bulgular, varikosel patogenezinde protein kalite kontrol sistemlerinin (UPS) işleyişinde bir yetersizlik veya çöküş meydana geldiğini açıkça ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda, tez çalışmamızda

varikosel tanısı almış bireylerin sperm hücrelerinde UPS kaskadının en kritik enzimlerinden biri olan E3 ubikitin ligaz NEDL2 ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığını (akım sitometri ve Western blot ile) saptamış olmamız, Afiyani ve ark.'nın doku düzeyinde bildirdiği hipo-ubikitinizasyon patofizyolojisini hücresel düzeyde tamamlamakta ve moleküler mekanizmayı doğrulamaktadır. NEDL2 ligaz aktivitesindeki bu spesifik düşüşün, varikosel ortamında hasarlı spermatozoa proteinlerinin ubikitin zincirleriyle işaretlenememesine ve dolayısıyla proteazomal yıkımdan kaçan kusurlu, DNA hasarlı spermlerin ejakülata geçmesine yol açan temel moleküler kusurlardan biri olduğunu düşündürmektedir.

Normal fizyolojide epididimden geçiş esnasında hatalı/kusurlu spermler ubikititn ile işaretlenir (ubikitinizasyon) ve epididim epiteli tarafından fagositozla yok edilir. Ejakülattaki ubikitinizasyon yoğunluğunun varikosel ve stresli gruplarda düşmesi, epididimin ve testis mikroçevresinin hasar görerek kusurlu spermleri düzgün bir şekilde ubikitine edip eleyemediğini (UPS disfonksiyonu) gösterir. Araştırmacıların sperm ubikitinizasyonunun klinik laboratuvarlarda rutin analize ek olarak mükemmel bir moleküler biyobelirteç olduğunu belirten sonuçları, tezimde NEDL2'nin varikosel patogenezinde bir biyobelirteç olabileceği hipotezimizi güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Literatürde varikoselektominin sağladığı klinik ve histolojik geri döndürülebilirlik başarısı (Abdel-Meguid ve ark., 2011); varikosel patolojisinin rutin semen parametrelerini bozabileceği ancak semen parametreleri normal sınırlar içerisindeki olgularda bile biyo-fonksiyonel hasara yol açabileceği (Pallotti ve ark.); varikosel indüksiyonu sonrası testis içi sıcaklık artışına bağlı gelişen hücresel stresin protein kalite kontrol sisteminde (UPS) yarattığı çöküşü deneysel olarak gösteren literatür verileriyle doku düzeyinde gösterilen genel ubikitinizasyon azalışı (Afiyani ve ark., 2014), varikosel patolojisinin moleküler mekanizmalar odaklı incelenmesini zorunlu kılmaktadır. Bu bilgilere uyumlu bir şekilde; tez çalışmamızda insan sperm hücrelerinde saptadığımız E3 ubikitin ligaz NEDL2 ekspresyonundaki belirgin azalış, doku düzeyindeki hipo-ubikitinizasyon patofizyolojisini hücresel düzeyde tamamlamaktadır. Bu spesifik enzim eksikliği, kusurlu spermlerin epididimal eliminasyon mekanizmasından kaçarak ejakülata geçmesine yol açan temel bir moleküler kusur olarak öne çıkmakta ve NEDL2'nin

varikosel patogenezinde tanısal, prognostik ve cerrahi takibe yardımcı güçlü bir biyobelirteç adayı olduğunu ortaya koymaktadır.

Sperm Hücresinde Protein Kalite Kontrolü ve Mitokondriyal Fonksiyonlarda NEDL2'nin Olası Rolü

Selvam ve ark., (2020) tarafından yapılan çalışmada 20S proteazom alt birimlerinin fertilizasyon olayında hücresel süreçlerde ve protein dengesinde kritik bir rol oynadığı, özellikle bilateral varikosel hastalarında hücresel stres altında denatüre veya yanlış katlanmış proteinlerin disfonksiyonel olan proteazom kompleksine taşınmak üzere ubikitinize edilememesine ve bu alt birimlerin ekspresyonunun azalmasının yanlış katlanmış proteinlerin kümülasyonu, sperm DNA hasarının artması ve apoptozun artmasına neden olarak fertilizasyon şansını düşürdüğü bildirilmiştir. Selvam ve ark. (2020) ayrıca tek taraflı ve çift taraflı varikoseli olan erkeklerde protein asetilasyon sürecini düzenleyebilen sperm DEP'lerini (diferansiyel olarak eksprese edilen proteinleri) tanımlamış ve bu proteinlerin artmış anormal ekspresyonunun oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon üzerinden varikosel hastalarında spermin fertilizasyon potansiyelini etkilediğini, proteazomun disfonksiyonuna ve dolayısıyla sperm morfolojik bütünlüğünün kaybına zemin hazırladığını proteomik düzeyde rapor etmiştir (Panner Selvam vd., 2020). Bu tez çalışmasında varikosel grubunda UPS'nin önemli bir E3 ligaz bileşeni olan NEDL2 ekspresyonunda saptadığımız anlamlı düşüşün ve mitokondriyal bölgedeki reaktivite değişikliklerinin, varikosel patogenezindeki proteazomal kalite kontrol yetersizliğini ve buna bağlı gelişen fonksiyonel kayıpları moleküler düzeyde desteklediğini göstermektedir. NEDL2 ligaz aktivitesinin baskılanması yani ubikitin kaskadının bu özgül ligaz düzeyindeki blokajı; hasarlı akrozomal, nükleer ve flagellar proteinlerin spermatozoa içinde birikmesine neden olarak, Kruger strict analizlerimizde varikosel grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek saptadığımız çift baş, amorf baş, kıvrık boyun ve kısa kuyruk gibi ağır morfolojik anomalilerin gelişimini moleküler seviyede doğrudan tetikleyen temel patojenik mekanizmalardan biri olarak öne çıkmaktadır. Bu bulgularla paralel olarak, çalışmamızda varikosel grubunda NEDL2 ubikitin ligaz ekspresyonunun anlamlı şekilde azalması ve morfolojik anomalili bölgelerde kümelenme eğilimi sergilemesi, varikoseldeki hücresel hasarın proteazomal

döngü ve ubikitinasyon yolağındaki aksaklıklarla doğrudan ilişkili olduğuna dair hipotezimizi güçlü bir şekilde doğrulamaktadır.

Varikoselin sperm kalitesi üzerindeki yıkıcı etkilerini kütle spektrofotometrisi ile inceleyen proteomik çalışmalarının öncüllerinden biri olan Agarwal ve ark., 2015 yaptıkları çalışmada varikosel patogenezinde rol oynayan en önemli mekanizmaların başında proteinlerin ubikitinasyonu ve mitokondriyal disfonksiyon yolakları olduğu ve bu mekanizmaların bozulduğunda varikosel olgularında protein ubikitinizasyonu ve protein degradasyonu süreçlerinin moleküler düzeyde majör bir disfonksiyona uğradığını rapor etmişlerdir (Agarwal vd., 2015). Bu literatür verisi, varikosel patofizyolojisinde hasarlı proteinlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan protein kalite kontrol sistemlerinin (UPS) merkezi bir rol oynadığına dair hipotezimizi klinik olarak doğrudan desteklemektedir. Bu doğrultuda, tez çalışmamızda varikosel grubundaki bireylerin sperm hücrelerinde ubikitin proteazom sisteminin anahtar enzimatik yürütücülerinden biri olan E3 ubikitin ligaz NEDL2 ekspresyonunda saptadığımız belirgin azalma, Agarwal ve ark.'nın (2015) işaret ettiği ubikitinizasyon disfonksiyonunun arkasındaki özgül moleküler kusurlardan birini temsil ediyor olabilir. NEDL2 gibi spesifik ubikitin ligazların ekspresyon seviyesindeki bu azalmaların, varikosel kaynaklı gelişen oksidatif ve termal stres altındaki sperm hücrelerinde translasyon sonrası modifikasyonların ve protein yıkım mekanizmalarının yetersiz kalmasına neden olarak anormal morfolojili ve fonksiyonel olarak kusurlu spermatozoa popülasyonunun ejakülata salınmasına zemin hazırlıyor olabilir.

Hosseinpour ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada, varikoselli infertil erkeklerin spermatozoa örneklerinde ubikitin proteazome sisteminin en önemli fonksiyonu olan ubikitinasyon sürecinin sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede azaldığı ve bu düşüşün özellikle ileri evre varikosel olgularında en belirgin seviyeye ulaştığı bildirilmiştir (Hosseinpour vd., 2014). Bu bulgu, varikosel patolojisinde Ubikitin-Proteazom Sisteminin (UPS) ve epididimal protein kalite kontrol mekanizmalarının disfonksiyona uğradığı yönündeki hipotezleri güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, bir E3 ubikitin ligaz ailesi üyesi olan NEDL2 ekspresyonunun varikosel grubunda kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığının akım sitometri ve Western blot yöntemleriyle gösterilmesi, literatürdeki genel hipo-

ubikitinizasyon verileriyle tam bir uyum sergilemekte ve NEDL2'nin varikosel ilişkili infertilitede hasarlı proteinlerin UPS aracılı eliminasyon süreçlerindeki yetersizliği yansıtan özgül bir moleküler biyobelirteç adayı olabileceğini güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır.

Seminal plazmadaki proteomik değişiklikleri inceleyen Fernandez-Encinas ve ark., (2020), seminal plazma proteomunun erkek infertilitesine ve sperm DNA hasarına yol açan moleküler mekanizmalarına olan etkisini anlamayı amaçlamışlardır. Bu çalışmada incelenen proteinlerin ifade faklılıkları ve bu proteinlerin büyük bir kısmının hücresel Ubikitinin C (Ubiquitin C- UbC) ile doğrudan etkileşim içinde olduğunun saptanması ile infertilite ve DNA hasarı sürecinde Ubikitinin C (UbC) merkezli yolaklar ile mitokondriyal disfonksiyon mekanizmalarının kritik birer regülatör rol üstlendiği bildirilmiştir. Bu mekanizmalarda önemli rol oynayan proteinlerin varikosel ve diğer süreçlerin yol açtığı infertilitenin patogenezinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Fernandez-Encinas vd., 2020). Tez çalışmamızda varikosel grubundaki bireylerin sperm hücrelerinde ubikitin-proteazom sisteminin (UPS) anahtar enzimatik yürütücülerinden olan E3 ubikitin ligaz NEDL2 ekspresyonunda saptadığımız belirgin azalış ve buna paralel olarak mitokondriyal kılıf bölgesindeki reaktivite değişiklikleri bu makale ile uyumlu olarak literatüre varikoselin tanı ve tedavisine yönelik yeni biyobelirteçler eklenebileceği yönündeki hipotezimizi güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Sutovsky (2003) tarafından yapılan derlemede ubikitin bağımlı proteolizin spermatogenezde özellikle spermatidlerin uzamasında ve sperm kuyruğunun oluşumu bittikten sonra, spermin sentrozom yapısının yeniden yapılanmasında; fertilizasyon sürecinde zona pellusidanın delinmesinde; epididimal sperm kontrol mekanizmalarında özellikle kusurlu spermlerin tanınmasında ve fagosite edilmesinde; sperm mitofajisinde çok önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (Sutovsky, 2003). Çalışmamızda varikosel grubunda genel NEDL2 ekspresyon düzeylerinde saptanan belirgin azalma, kusurlu spermatozoaların ubikitine bağlı proteolitik kaskadlar aracılığıyla tanınarak sistemden uzaklaştırılmasını öngören epididimal sperm kalite kontrol mekanizmasının varikosel patogenezinde yetersiz kalabileceğini ya da bu moleküler eliminasyon yolağının baskılandığını düşündürmektedir. Ayrıca spermatogenezde özellikle uzamış spermatidlerin gelişimi sürecinde NEDL2'ninde rol oynayabileceği, eksikliğinde spermatidlerin tam gelişiminin olmayacağı ve varikosele bağlı olarak yapısal ve

fonksiyonel olarak bozulmaya uğrayan testisin histolojik yapısını NEDL2 proteininin ekspresyon ve lokalizasyon yönünde yapılacak ileriki çalışmalar NEDL2'nin testis gelişimi ve varikoselden etkilenmiş testisteki rolünü aydınlatacaktır. Yine epididimal sperm kontrol mekanizmalarında NEDL2 reaktivitesinin varikosel patogenezindeki olası rolünü aydınlatabilmek içinde ileriki çalışmalarda normal ve varikoselli olguların epididimislerinde NEDL2 işlev ve mekanizmasının çalışılması literatüre önemli bilgiler kazandıracaktır.

Literatürde varikosel patofizyolojisinde genel ubikitinizasyon sürecindeki gerileme (Hosseinpour ve ark., 2014), proteomik düzeyde saptanan protein degradasyonu anomalileri (Agarwal ve ark., 2015), proteazom alt birimlerindeki yapısal hasar ile buna bağlı gelişen DNA kırıkları/apoptoz (Selvam ve ark., 2020) ve Sutovsky (2003)'nin UPS ele alınarak spermatogenez, fertilizasyon ve sperm kalite mekanizmalarını incelediği derleme birlikte değerlendirildiğinde; tez çalışmamızda saptadığımız E3 ubikitin ligaz N EDL2 ekspresyonundaki anlamlı azalış, morfolojik anomalili bölgelerdeki kümelenme eğilimi varikosel kaynaklı hücresel stres ortamında Ubikitin-Proteazom Sisteminin (UPS) hem yürütücü ligazlar hem de yıkıcı proteazom üniteleri düzeyinde total bir çöküş yaşadığını hücresel düzeyde doğrulamakta ve NEDL2'nin patogenezi aydınlatan, tanı ve tedaviye yardımcı özgül bir moleküler biyobelirteç olduğunu güçlü bir şekilde kanıtlamaktadır.

Sperm Mitokondriyal Kılıfında NEDL2'nin Olası Rolü

Finelli ve ark., (2021) tarafından yapılan çalışmada varikosel patogenezinde bozulan sperm kalitesi ve DNA bütünlüğünün arkasında, protein kalite kontrol ve DNA onarım mekanizmalarındaki yetersizlikler moleküler düzeyde kanıtlanmaktadır. Normalde Krebs döngüsü enzimi olan ve mitokondriyal DNA'yı oksidatif hasardan koruyup apoptozu azaltan ACO2'nin varikoselde baskılanması, NF-κB yolağı ile ilişkili olarak varikoselli spermlerde serbest radikallere karşı hücresel savunmanın çökmesine ve DNA kırıklarının artmasına yol açmaktadır. ACO2 yetersizliği ve oksidatif stres, varikosel patogenezinde DNA onarım eksikliğini ve hastalık şiddetini artırmaktadır. Varikosel patolojisinde skrotal sıcaklık artışı ve venöz staz, sperm mitokondrilerinde çok yoğun bir oksidatif strese yol açar. Finelli ve ark. (2021)'nın çalışmasında gösterildiği

üzere, varikosel hastalarında ACO2 seviyelerinin ciddi oranda azalması (~%62), spermin hem hareket enerjisini (ATP) kaybetmesine hem de koruyucu kalkanı çöktüğü için sperm DNA hasarının kontrolsüzce artmasına neden olur (Finelli vd., 2021). Araştırmacıların varikosel ortamındaki oksidatif strese bağlı DNA hasarından sorumlu tuttuğu ACO2 ekspresyon farklılığına benzer şekilde, tez çalışmamızda saptanan NEDL2 ligaz aktivitesindeki yetersizliğin de varikoselli bireylerde spermatozoa protein kalite kontrolünün bozulmasına ve dolayısıyla kusurlu hücrelerin ejakülata salınmasına yol açan temel post-translasyonel mekanizmalardan birini temsil ettiği değerlendirilmektedir.

Spermatozoonun kuyruk orta parçasında yer alan mitokondriyal kılıf, hücrenin motilitesi ve redoks homeostazı için kritik bir organel organizasyonudur. Kerns ve ark., (2020) tarafından yapılan görüntü tabanlı akım sitometrisi (IBFC) ve agresom belirleme çalışmalarında, mitokondriyal kılıf uzunluğundaki varyasyonların ve sperm yapısındaki yanlış katlanmış protein agregatlarının (agresomlar) ile sperm fonksiyonları ve ICSI pozitif korelasyon gösterdiği göz önüne alındığında sperm mitokondriyal bölgenin fertilizasyon sürecinde son derece önemli olduğunu göstermektedir (Kerns vd., 2020). Çalışmamızda varikosel grubundaki spermatozoa mitokondriyal kılıf bölgesinde saptadığımız NEDL2 lokalizasyonundaki değişimler, varikoselin tetiklediği oksidatif hasar ve skrotal hipertermi koşullarında mitokondriyal düzeydeki proteostasis dengesinin bozulduğunu ve hasarlı mitokondriyal proteinlerin ubikitinitasyon kaskadlarınca yoğun bir şekilde etiketlendiğini gösteren önemli bir hücresel bulgudur. UPS'nin oksidatif stres koşullarında hasarlı proteinlerin uzaklaştırılması ve hücresel homeostazın sürdürülmesindeki kritik fonksiyonu dikkate alındığında, NEDL2 ekspresyonundaki değişikliklerin sperm hücresinin oksidatif strese karşı geliştirdiği adaptif mekanizmalardan biri olabileceği değerlendirilebilir. Bununla birlikte, bu mekanizmanın moleküler düzeyde açıklığa kavuşturulabilmesi için farklı UPS bileşenlerinin birlikte değerlendirildiği ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Varikosel grubunda genel NEDL2 ekspresyonunun düşmesine rağmen, morfolojik anomalili bölgelerde kümülasyonu ve özellikle mitokondriyal kılıfta bu proteinin gruplar arasında değişken lokalizasyon ve reaktivite göstermesi; Thompson ve ark., (2003) tarafından iç mitokondriyal membranda tetraubikitin zincirleriyle poliubikitinizasyona uğradığı ve böylece fertilizasyon sürecinde oositin UPS mekanizması ile paternal mitokondrinin proteolizinin gerçekleştiği kanıtlanan ve defektif

spermatozoonların epididimal eliminasyonunda anahtar bir kalite kontrol kalkanı olarak tanımlanan mitokondriyal prohibitin proteini verileriyle uyum göstermektedir (Thompson vd., 2003). Bu tez çalışmasında varikosel grubunda saptadığımız NEDL2 ligaz ekspresyonundaki belirgin azalış ve mitokondriyal kılıftaki reaktivite anomalileri, varikosel kaynaklı ısıya bağımlı ve oksidatif stres altındaki spermlerde protein kalite kontrol mekanizmalarının ve ubikitinasyon kaskadının bir işlev kaybına uğradığını moleküler seviyede doğrulamaktadır.

Sutovsky ve ark., (2024) yaptıkları çalışmada morfolojik olarak normal olan ancak moleküler düzeyde kusurlar barındıran "kötü" sperm popülasyonlarını tespit etmede yetersiz kalınan geleneksel yöntemlere ek olarak biyobelirteç tabanlı gelişmiş görüntüleme yöntemlerinin androloji ve tüp bebek alanında tanı ve tedavinin hassasiyetinin geliştirilmesinde oldukça yararlı olabileceğini bildirmişlerdir (Sutovsky vd., 2024). Kusurlu spermlerin yüzeyinde ubikitin moleküllerinin biriktiği (ekstrasellüler kalite kontrol mekanizması) ve de akrozomun bütünlüğünü belirleyebilmek adına kullanılan leketin boyalarının spermin kalitesinin belirlenmesinde belirleyici olduğunu bildiren bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak NEDL2'nin yeni nesil görüntüleme teknolojileri ve yapay zeka algoritmalarıyla birleştirilerek varikoselin tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği hipotezimizi güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Bu çalışmada oksidatif stresin akrozomal membranlar, mitokondri ve sperm mitokondriyal DNA'sı (mtDNA) gibi farklı sperm yapılarına zarar vererek hep birlikte anormal semen oluşumunun artmasına yol açtığı, buna bağlı olarak artan mitokondriyal ROS (reaktif oksijen türleri) üretiminin oksidatif strese maruz kalmış spermatozoada apoptoz benzeri değişimleri tetikleyebileceği bildirilmiştir. Sağlıklı bir mitokondriyal fonksiyonun ve membran potansiyelinin; sperm motilitesi, kapasitasyon, akrozomal reaksiyon, hiperaktivasyon ve DNA bütünlüğü için temel öneme sahip olduğu, sperm mitokondrisinin fizyolojik üreme mekanizması için gerekli olan ATP ve ROS'u ürettiği; ancak fizyolojik süreçler için gerekli düzeylerde ROS üretimi doğru bir şekilde dengelenemezse bu mekanizmalarda aksamalara yol açarak fertilite sorunlarına neden olabileceği bu çalışmada bildirilmiştir. Özet olarak bu çalışmada spermatozoa mitokondriyal homeostazı ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin önemine dikkat çekilerek, UPS ilişkili protein kalite kontrol sistemlerinin oksidatif stres koşullarında hasarlı mitokondriyal proteinleri uzaklaştırmak üzere bölgesel olarak

modüle edildiğini bildirmektedir. Tez çalışmamda olguların mitokondriyal kılıfında görülen değişken NEDL2 reaktivitesi, Sutovsky ve arkadaşlarının çalışmalarını destekler şekilde tezimde kullandığımız varikosel hastalığına bağlı gelişen oksidatif stres sonucunda olarak mitokondriyal bölgede burada oluşan moleküler strese yanıt olarak NEDL2'nin bu bölgede lokalize olma çabası UPS'in bu önemli ligazının varikosele bağlı oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyona bir cevap olarak artmaya çalışması olarak varikoselin patogenezinde NEDL2'nin rol oynadığına dair hipotezimizi desteklemektedir.

Tez çalışmamızda, varikoselli bireylerin sperm hücrelerinin tüm bölgelerini kapsamak üzere NEDL2 proteini sağlıklı bireylerin sperm hücrelerinin tüm bölgelerindeki NEDL2 boyanmasına göre şiddetli bir azalma göstermektedir. Sperm hücresinin diğer hücrelerden oldukça farklı olan morfolojik yapısı; baş, bağlantı parçası ve kuyruk olmak üzere her bir bölgesinin fizyolojik ve moleküler olarak oldukça farklılık göstermesi özellikle de mitokondriyal kuyruk bölgesinin kuyruğun esas ve son parçalarına göre çok farklı bir yapı sergilemesinin sonuçlarından biri olarak tez çalışmamızda NEDL2 lokalizasyonu bölgesel farklılıklar göstermiştir. Varikoselli spermlerin mitokondriyal bölgelerinde, sadece lokalizasyon baz alınarak yapılan immünofloresan incelemelerinde bu bölgede varikosel grubunda daha fazla NEDL2 lokalizasyonu gösteren hücre olduğu belirlenmiştir. Akım sitometri sonuçlarımızın sağlıklı bireylere göre varikoselli bireylerde azalmış NEDL2 ekspresyonunu göstermesine rağmen, görüntülü akım sitometri cihazı olanağımızın olmaması nedeni ile NEDL2 proteininin sperm hücrelerinde bölgesel ekspresyonu akım sitometrik olarak ifade edilememiştir. Yöntemsel olarak sperm hücresini bölgelerine ayırabilmemiz mümkün olmadığı için, sperm hücresinde NEDL2 bölgesel farklılıkları western blot yöntemiyle de ifade edilememiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgular, varikosel grubunda NEDL2 ekspresyonunun özellikle mitokondriyal kılıf bölgesinde değişimler göstermesi ile birlikte değerlendirildiğinde, bu proteinin sperm hücresinde bölgesel stres yanıtı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde varikoselin spermatojenik hücrelerde artmış reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve mitokondriyal disfonksiyon ile karakterize olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, mitokondriyal kılıfta gözlenen NEDL2 değişiminin oksidatif strese bağlı protein hasarının UPS aracılığıyla elimine edilmesine yönelik bir hücresel adaptasyon mekanizmasını yansıtabileceği değerlendirilmektedir.

Tüm bu bilgiler birlikte değerlendirildiğinde, tez çalışmamızda varikosel grubunda spermatozoaların mitokondriyal kılıf bölgesinde gözlenen NEDL2 lokalizasyonundaki değişiklikler, literatürde bildirilen bulgularla uyumlu olarak, NEDL2'nin oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili protein kalite kontrol mekanizmalarında rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Erkek Üreme Sisteminde NEDL2'nin Olası Rolü

Literatürde, Mao ve ark., (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada NEDL2'nin ubikitin-proteazom sisteminin (UPS) HECT tipi E3 ubikitin ligazlarından biri olduğu ve ubikitinasyon sürecinin son basamağında substrat özgüllüğünü sağlayarak hedef proteinlerin ubikitinlenmesini düzenlediği bildirilmektedir. Ayrıca NEDL2'nin spermatozoalarda, oositlerde ve erken preimplantasyon embriyolarında eksprese olduğu, spermatozoalarda ise özellikle postakrozomal bölge ile kuyrukta lokalize olduğu gösterilmiştir. Fonksiyonel analizlerde, oositlere anti-NEDL2 antikoru mikroenjeksiyonu uygulanmasının sperm DNA dekondensasyonunu baskıladığı, erkek pronükleus oluşumunu engellediği ve pronükleer gelişim sürecini etkilediği bildirilmiştir (Mao vd., 2020). Bu bulgular, NEDL2'nin erkek üreme sistemindeki rolünün yalnızca protein yıkımı ile sınırlı olmadığını; aynı zamanda sperm kromatin yeniden yapılanması, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişimin düzenlenmesinde kritik görevler üstlendiğini düşündürmektedir. Tez çalışmamızda, varikoselli bireylere ait sperm hücrelerinde NEDL2 lokalizasyonun mitokondriyal kılıf bölgesinde gözlenen farklı dağılımı, NEDL2'nin yalnızca fertilizasyon sürecinde değil, varikosel ile ilişkili hücresel değişikliklerde de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Varikoselin oksidatif stres düzeyini artırdığı ve ubikitin-proteazom sisteminin işleyişini etkileyebildiği göz önünde bulundurulduğunda, NEDL2 lokalizasyonunda saptanan bu değişikliklerin sperm hücresinin stres koşullarına verdiği adaptif bir yanıtın göstergesi olabileceği gibi, hastalığa bağlı gelişen fonksiyonel değişikliklerle de ilişkili olabileceği ve bu E3 ubikitin ligazın primer bir kontrol noktası olarak işlev gördüğü hipotezini moleküler düzeyde desteklemektedir.

Benzer şekilde, Ocakli ve ark., (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada fertil ve infertil gruplarda NEDL2 ekspresyonu değerlendirilmiş ve gruplar arasında farklı

ekspresyon paternleri ortaya konulmuştur (Ocakli vd., 2020). Çalışmamızda elde edilen bulgular genel olarak bu çalışma ile uyumlu olmakla birlikte, NEDL2'nin lokalizasyonu ve boyanma paternlerinde bazı farklılıklar da gözlenmiştir. Bu farklılıkların, Dr. Seda Ocaklı'nın doktora tezinde NEDL2 proteininin varikosel hastalarını içermeyen infertilite vakalarında incelenmiş olması ve bu çalışmanın devamı olarak genel infertilite perspektifi baz alınarak daha önceki çalışmalarımızda hasta gruplarına dahil etmediğimiz varikosel tanılı hastaları incelediğimiz bu tezde NEDL2'nin infertilitenin moleküler mekanizmalarına özellikle UPS temelinde tanı ve tedavi eksenindeki etkilerini incelememiz genelden özele giden bir çalışma olarak önem arz etmektedir. Çalışmamızda infertilite grubunun yalnızca varikosel tanısı almış olgulardan oluşturulmuş olması, buna bağlı olarak varikoselin neden olduğu patofizyolojik değişikliklerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

O'Donnell ve ark., (2016), Hirschsprung hastalığına ait aganglionik kolon segmentlerinde NEDL2 ekspresyonunun sağlıklı kontrollere ve ganglionik bölgelere kıyasla belirgin düzeyde azaldığını western blot ve immünofloresan analizleriyle göstermiş, ayrıca NEDL2'nin insan kolon dokusunda nöronlar ve pacemaker hücrelerinde (Cajal hücreleri) lokalize olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, NEDL2 ekspresyonundaki azalmanın patolojik süreçlerle ilişkili olabileceğini ve bu proteinin doku homeostazının sürdürülmesinde önemli bir rol üstlenebileceğini öne sürmüştür (A. M. O'Donnell vd., 2016). Benzer şekilde, tez çalışmamızda da varikosel grubunda NEDL2 protein ekspresyonunun akım sitometri ve western blot analizleriyle kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmesi farklı patolojik dokularda gözlenen bu ortak ekspresyon azalması, NEDL2'nin hücresel protein kalite kontrolü, doku homeostazının korunması ve stres yanıtlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu doğrultuda, çalışmamızda saptanan NEDL2 ekspresyonundaki azalma, varikoselde UPS işlevindeki bozulmaya katkıda bulunan moleküler değişikliklerden biri olarak değerlendirilebilir.

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, NEDL2'nin insan spermatozoasında baş, akrozomal bölge ve özellikle mitokondriyal kılıfta lokalize olduğunu; varikoselli bireylerde ise hem protein ekspresyonunda hem de hücre içi lokalizasyon paternlerinde değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir. Özellikle varikosel grubunda gözlenen mitokondriyal kılıf ağırlıklı lokalizasyon değişikliği, NEDL2'nin oksidatif stres

koşullarında mitokondriyal protein kalite kontrolü, proteostazın sürdürülmesi ve ubikitin proteazom sistemi aracılı yıkım mekanizmalarında görev alabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, varikosel patogenezinde UPS ile ilişkili moleküler düzenleyici mekanizmaların önemini desteklemekte ve NEDL2'nin erkek infertilitesinde rol oynayabilecek yeni bir aday molekül olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde NEDL2'nin farklı patolojik dokularda ekspresyon kaybının hücresel fonksiyon bozuklukları ile ilişkili olduğu bildirilmiş olmakla birlikte, varikoselli infertil erkeklerin spermatozoalarında NEDL2 ekspresyonunu ve lokalizasyonunu birlikte değerlendiren çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu yönüyle çalışmamız, NEDL2'nin varikosel ile ilişkili moleküler değişikliklerde yer alabileceğini gösteren özgün veriler sunmakta ve ubikitin proteazom sistemi ekseninde sperm protein homeostazının korunmasına ilişkin mevcut bilgi birikimine katkı sağlamaktadır.

Bununla birlikte, çalışmamızın hasta sayısının sınırlı olması ve yalnızca protein ekspresyonu ile immünlokalizasyonun değerlendirilmiş olması önemli kısıtlılıklardır. Gelecekte daha geniş hasta serilerinde gerçekleştirilecek çalışmaların; NEDL2 ekspresyonunun varikosel derecesi, sperm DNA fragmantasyonu, mitokondriyal membran potansiyeli, oksidatif stres belirteçleri ve yardımcı üreme teknikleri (IVF/ICSI) sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi, bu proteinin erkek infertilitesindeki biyolojik işlevinin ve klinik kullanım potansiyelinin daha kapsamlı biçimde ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca NEDL2'nin ubikitinasyon, mitokondriyal kalite kontrolü ve mitofaji ile ilişkili moleküler mekanizmalarının fonksiyonel çalışmalarla desteklenmesi, varikosel patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tanısal ya da tedaviye yönelik hedeflerin belirlenmesine olanak sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma NEDL2'nin varikosel ilişkili erkek infertilitesindeki olası rolünü ortaya koyan ilk kapsamlı değerlendirmelerden biri olup, elde edilen bulgular NEDL2'nin ubikitin proteazom sistemi ile ilişkili protein kalite kontrol süreçlerinde görev alabileceğini ve erkek infertilitesinde tanısal ya da prognostik amaçlarla değerlendirilebilecek potansiyel bir biyobelirteç adayı olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu potansiyelin klinik uygulamaya aktarılabilmesi için daha geniş örneklemli, fonksiyonel ve mekanistik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Varikoselli bireylerde NEDL2 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır.
- NEDL2, insan spermatozoasında akrozomal bölge ve lokalize olmaktadır.
- Varikosel grubunda NEDL2'nin hücre içi lokalizasyon paternlerinde değişiklikler saptanmıştır.
- Mitokondriyal kılıfta gözlenen lokalizasyon değişikliği, NEDL2'nin mitokondriyal fonksiyonlar ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.
- Bulgular, NEDL2'nin ubikitin proteazom sistemi aracılı protein kalite kontrol mekanizmalarında rol oynayabileceğini desteklemektedir.
- NEDL2, varikosel ilişkili erkek infertilitesinde potansiyel bir moleküler biyobelirteç adayı olarak değerlendirilebilir.
- NEDL2'nin farklı infertilite etiyolojilerindeki ekspresyonunun daha geniş hasta gruplarında araştırılması önerilmektedir.
- Varikosel derecesi ile NEDL2 ekspresyonu arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi önerilmektedir.
- NEDL2'nin sperm DNA fragmantasyonu, mitokondriyal membran potansiyeli ve oksidatif stres belirteçleri ile birlikte incelenmesi önerilmektedir.
- NEDL2'nin ubikitin-proteazom sistemi ve mitofaji ile ilişkisini ortaya koyacak fonksiyonel çalışmalar yapılması önerilmektedir.
- NEDL2'nin testis dokusundaki ekspresyon ve lokalizasyonunun araştırılması, proteinin spermatogenezdeki rolünün aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.
- NEDL2'nin epididimis dokusundaki ekspresyon ve lokalizasyonunun değerlendirilmesi, sperm matürasyonu ve fonksiyon kazanmasındaki olası etkilerinin ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır.
- IVF ve ICSI uygulanan olgularda NEDL2 ekspresyonunun fertilizasyon ve gebelik sonuçları ile ilişkisinin araştırılması önerilmektedir.
- NEDL2'nin tanısal ve prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin klinik çalışmalarla doğrulanması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abdel-Meguid, T. A., Al-Sayyad, A., Tayib, A., & Farsi, H. M. (2011). Does varicocele repair improve male infertility? An evidence-based perspective from a randomized, controlled trial. *European Urology*, *59*(3), 455-461. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.12.008

Afiyani, A. A., Deemeh, M. R., Tavalaee, M., Razi, M., Bahadorani, M., Shokrollahi, B., & Nasr-Esfahani, M. H. (2014). Evaluation of heat-shock protein A2 (HSPA2) in male rats before and after varicocele induction. *Molecular Reproduction and Development*, *81*(8), 766-776. https://doi.org/10.1002/mrd.22345

Agarwal, A., Sharma, R., Durairajanayagam, D., Cui, Z., Ayaz, A., Gupta, S., Willard, B., Gopalan, B., & Sabanegh, E. (2015). Differential proteomic profiling of spermatozoal proteins of infertile men with unilateral or bilateral varicocele. *Urology*, *85*(3), 580-588. https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.11.030

Alsaikhan, B., Alrabeeah, K., Delouya, G., & Zini, A. (2016). Epidemiology of varicocele. *Asian Journal of Andrology*, *18*(2), 179-181. https://doi.org/10.4103/1008-682X.172640

Al-Yousef, D. R. (2025, Ocak 3). *Varikosel Nedenleri: Önleme ve Tedavi- Bimaristan*. https://bi-maristan.com/en/urology/andrology/varicocele-causes/

Arya, D., Balasinor, N., & Singh, D. (2022). Varicocoele-associated male infertility: Cellular and molecular perspectives of pathophysiology. *Andrology*, *10*(8), 1463-1483. https://doi.org/10.1111/andr.13278

Bao, J., & Bedford, M. T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction*, *151*(5), R55-70. https://doi.org/10.1530/REP-15-0562

Buffone, M. G., Hirohashi, N., & Gerton, G. L. (2014). Unresolved Questions Concerning Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. *Biology of Reproduction*, *90*(5), 112. https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.117911

Ciechanover, A., & Iwai, K. (2004). The Ubiquitin System: From Basic Mechanisms to the Patient Bed. *IUBMB Life*, *56*(4), 193-201. https://doi.org/10.1080/15216540420002236l6

de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, *13 Suppl 1*, 1-8. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.1

de Rooij, D. G. (2017). The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*, *144*(17), 3022-3030. https://doi.org/10.1242/dev.146571

Erdemir, F., & Kılıç, Ş. (2011). Varikosel. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, *3*(2), 1-11.

Fernandez-Encinas, A., García-Peiró, A., Del Rey, J., Ribas-Maynou, J., Abad, C., Amengual, M. J., Prada, E., Navarro, J., & Benet, J. (2020). Proteomic Analysis in Seminal Plasma of Fertile Donors and Infertile Patients with Sperm DNA Fragmentation. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(14), 5046. https://doi.org/10.3390/ijms21145046

Finelli, R., Darbandi, S., Pushparaj, P. N., Henkel, R., Ko, E., & Agarwal, A. (2021). In Silico Sperm Proteome Analysis to Investigate DNA Repair Mechanisms in Varicocele Patients. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 757592. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.757592

Galea, M., Brincat, M. R., & Calleja-Agius, J. (2023). A review of the pathophysiology and evidence-based management of varicoceles and pelvic congestion syndrome. *Human Fertility*, *26*(6), 1597-1608. https://doi.org/10.1080/14647273.2023.2212846

Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*, *82*(2), 373-428. https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001

Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, *96*(1), 1-17. https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015

Handel, M. A., & Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics*, *11*(2), 124-136. https://doi.org/10.1038/nrg2723

Hosseinpour, E., Shahverdi, A., Parivar, K., Sedighi Gilani, M. A., Nasr-Esfahani, M. H., Salman Yazdi, R., Sharbatoghli, M., Tavalaee, M., & Chehrazi, M. (2014). Sperm ubiquitination and DNA fragmentation in men with occupational exposure and varicocele. *Andrologia*, *46*(4), 423-429. https://doi.org/10.1111/and.12098

İlki, F. Y., Ozcan, C., Albayrak, A. M., Topçu, Y. K., Sarikaya, S., & Bedir, S. (2025). Comparative analysis of semen parameters in adolescent males with and without varicocele. *Journal of Pediatric Urology*, *21*(6), 1888-1892. https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2025.08.007

Johnson, D., & Sandlow, J. (2017). Treatment of varicoceles: Techniques and outcomes. *Fertility and Sterility*, *108*(3), 378-384. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.020

Karakeçi, A., & Orhan, İ. (2019). Varikosel patofizyolojisi 2019. *Androloji Bülteni*. https://doi.org/10.24898/tandro.2019.72621

Kerns, K., Jankovitz, J., Robinson, J., Minton, A., Kuster, C., & Sutovsky, P. (2020). Relationship between the Length of Sperm Tail Mitochondrial Sheath and Fertility Traits in Boars Used for Artificial Insemination. *Antioxidants*, *9*(11), 1033. https://doi.org/10.3390/antiox9111033

Lehti, M. S., & Sironen, A. (2017). Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of Reproduction*, *97*(4), 522-536. https://doi.org/10.1093/biolre/iox096

Leslie, S. W., Sajjad, H., & Siref, L. E. (2023). Varicocele. Içinde *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK448113/

Lu, L., Hu, S., Wei, R., Qiu, X., Lu, K., Fu, Y., Li, H., Xing, G., Li, D., Peng, R., He, F., & Zhang, L. (2013). The HECT type ubiquitin ligase NEDL2 is degraded by anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)-Cdh1, and its tight regulation maintains the metaphase to anaphase transition. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(50), 35637-35650. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472076

Mao, J., Zigo, M., Zuidema, D., Sutovsky, M., & Sutovsky, P. (2020). NEDD4-like ubiquitin ligase 2 protein (NEDL2) in porcine spermatozoa, oocytes, and preimplantation embryos and its role in oocyte fertilization†. *Biology of Reproduction*, *104*(1), 117-129. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa186

Miyata, H., Shimada, K., Kaneda, Y., & Ikawa, M. (2024). Development of functional spermatozoa in mammalian spermiogenesis. *Development*, *151*(14), dev202838. https://doi.org/10.1242/dev.202838

Miyazaki, K., Ozaki, T., Kato, C., Hanamoto, T., Fujita, T., Irino, S., Watanabe, K., Nakagawa, T., & Nakagawara, A. (2003). A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *308*(1), 106-113. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01347-0

Munoz-Lopez, C., Wong, A., Lewis, K., Bole, R., Vij, S. C., & Lundy, S. D. (2024). The Evolving Landscape of Male Varicocele Pathophysiology in the Era of Multi-Omics: A

Narrative Review of the Current Literature. *Biology*, *13*(2), 80. https://doi.org/10.3390/biology13020080

Nasr-Esfahani, M. H., Abasi, H., Razavi, S., Ashrafi, S., & Tavalaee, M. (2009). Varicocelectomy: Semen parameters and protamine deficiency. *International Journal of Andrology*, *32*(2), 115-122. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00822.x

Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *59*, 10-26. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.009

Oakberg, E. F. (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *The American Journal of Anatomy*, *99*(3), 391-413. https://doi.org/10.1002/aja.1000990303

Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological Reviews*, *92*(2), 577-595. https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011

Ocakli, S., Gevrek, F., Erdemir, F., & Cayli, S. (2020). Expression of p97/Valosin Containing Protein in Human Sperm and Its Correlation with Semen Parameters. *International Journal of Scientific and Technological Research*, *6*(3), 311.

O'Donnell, A. M., Coyle, D., & Puri, P. (2016). Decreased expression of NEDL2 in Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, *51*(11), 1839-1842. https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.06.016

O'Donnell, L., Nicholls, P. K., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., & Stanton, P. G. (2011). Spermiation: Sperm salınımı süreci. *Spermatogenesis*, *1*(1), 14-35. https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525

Pallotti, F., Paoli, D., Carlini, T., Vestri, A. R., Martino, G., Lenzi, A., & Lombardo, F. (2018). Varicocele and semen quality: A retrospective case-control study of 4230 patients from a single centre. *Journal of Endocrinological Investigation*, *41*(2), 185-192. https://doi.org/10.1007/s40618-017-0713-z

Panner Selvam, M. K., Samanta, L., & Agarwal, A. (2020). Functional Analysis of Differentially Expressed Acetylated Spermatozoal Proteins in Infertile Men with Unilateral and Bilateral Varicocele. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9), 3155. https://doi.org/10.3390/ijms21093155

Richburg, J. H., Myers, J. L., & Bratton, S. B. (2014). THE ROLE OF E3 LIGASES IN THE UBIQUITIN-DEPENDENT REGULATION OF SPERMATOGENESIS. *Seminars in cell & developmental biology*, *0*, 27-35. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.001

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2011). *Histoloji: Konu anlatımı ve atlas: İlişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji ile* (6. baskı, B. Baykal, Çev. Ed.). Palme Yayıncılık.

Shen, H., Kou, Q., Shao, L., Zhang, J., & Li, F. (2024). E3 ubiquitin ligase HECW2: A promising target for tumour therapy. *Cancer Cell International*, *24*, 374. https://doi.org/10.1186/s12935-024-03563-3

Suede, S. H., Malik, A., & Sapra, A. (2023). Histology, Spermatogenesis. İçinde *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK553142/

Sutovsky, P. (2003). Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microscopy Research and Technique*, *61*(1), 88-102. https://doi.org/10.1002/jemt.10319

Sutovsky, P. (2011). Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction*, *142*(1), 1-14. https://doi.org/10.1530/REP-11-0041

Sutovsky, P. (2018). Review: Sperm–oocyte interactions and their implications for bull fertility, with emphasis on the ubiquitin–proteasome system. *Animal : an international journal of animal bioscience*, *12*(Suppl 1), s121-s132. https://doi.org/10.1017/S1751731118000253

Sutovsky, P., Hamilton, L. E., Zigo, M., Ortiz D'Avila Assumpção, M. E., Jones, A., Tirpak, F., Agca, Y., Kerns, K., & Sutovsky, M. (2024). Biomarker-based human and animal sperm phenotyping: The good, the bad and the ugly†. *Biology of Reproduction*, *110*(6), 1135-1156. https://doi.org/10.1093/biolre/ioae061

Szamatowicz, M., & Szamatowicz, J. (2020). Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility. *Advances in Medical Sciences*, *65*(1), 93-96. https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.12.008

Teves, M. E., & Roldan, E. R. S. (2022). Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological Reviews*, *102*(1), 7-60. https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2020

Thompson, W. E., Ramalho-Santos, J., & Sutovsky, P. (2003). Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: Possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biology of Reproduction*, *69*(1), 254-260. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010975

Varshavsky, A. (2005). Regulated protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, *30*(6), 283-286. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.04.005

Walker, W. H. (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*, *1*(2), 116-120. https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16956

Xiong, Y., Yu, C., & Zhang, Q. (2022). Ubiquitin-Proteasome System–Regulated Protein Degradation in Spermatogenesis. *Cells*, *11*(6), 1058. https://doi.org/10.3390/cells11061058

Yoshida, S. (2016). From cyst to tubule: İnnovations in vertebrate spermatogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *5*(1), 119-131. https://doi.org/10.1002/wdev.204

Zigo, M., Kerns, K., & Sutovsky, P. (2023). The Ubiquitin-Proteasome System Participates in Sperm Surface Subproteome Remodeling during Boar Sperm Capacitation. *Biomolecules*, *13*(6), 996. https://doi.org/10.3390/biom13060996

Zimmerman, S., & Sutovsky, P. (2009). The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology, Bio-immunoregulatory Mechanisms Associated with Reproductive Organs: Relevance in Fertility and in Sexually Transmitted Infections*, *83*(1), 19-25. https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.07.006

EKLER

EK1.

Evrak Tarih ve Sayısı: 27.12.2024-514942

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Mudahale Olmayan Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-15235480-050.04-514942 27.12.2024
Konu : 24-MOBAEK-021

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seda OCAKLI
Öğretim Üyesi

Etik Kurulumuzun 12.12.2024 tarihli toplantısında görüşülen **24-MOBAEK-021** kayıt numaralı **"UPS ile ilişkili NEDL2 ekspresyonunun varikosel patogenezi üzerindeki etkilerinin araştırılması"** başlıklı çalışmanız gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç. Dr. Muzaffer KATAR
Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Öğrenim Bilgileri

İş Deneyimi