

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNFERTİL ERKEKLERDE OBEZİTEYE BAĞLI SPERM APOPİTOZUNUN
VE DNA HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

NAZLI GÖK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

KONYA-2017

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNFERTİL ERKEKLERDE OBEZİTEYE BAĞLI SPERM APOPİTOZUNUN
VE DNA HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

NAZLI GÖK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17202011 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Nazlı GÖK tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak oy birliği / oy çokluğu kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan (Danışman)

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN



Üye

Yrd. Doç. Dr. Gökhan Cüce

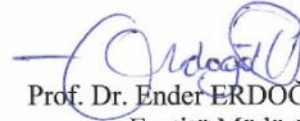


Üye

Yrd. Doç. Dr. Duygu Dursunoğlu

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu .../.../... vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda eğitimim süresince engin bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, her zaman sabır gösterip yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ender Erdoğan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında gerekli yardım ve tavsiyeleri ile her zaman destek olan Uzm. Dr. Nejat Ünlükal, Uzm. Dr. Duygu Dursunoğlu'na, Arş. Gör. Seda Atay'a, tezin istatistiksel çalışmalarına katkılarından dolayı S.Ü. Halk Sağlığı ABD Başkanı Yrd. Doç. Dr. Fatih Kara'ya, çalışmam süresince, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliniği'nde çalışan, örnek toplama sürecinde yardımlarını esirgemeyen Rukiye Erdoğan ve Özlem Şahin'e, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Konya Eğitim Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliniği çalışanlarına ve Uzm. Dr. Müşerref Sultan Mermer'e tez çalışmam süresince yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım; Ömer Ünal, Nilüfer Ünal'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her aşamada destek olan; annem, babam ve ağabeyime sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. İnfertilite	2
1.1.2. Erkek İnfertilitesi	3
1.2. Obezite.....	3
1.2.1. Erkek İnfertilitesi ve Obezite.....	4
1.3. Erkek Üreme Sistemi.....	4
1.3.1. Spermatogenez	6
1.3.2. Spermiyogenez	9
1.3.3. Olgun Sperm Yapısı ve Fizyolojisi	11
1.4. Semen Analizi	13
1.4.1. Mikroskopik İnceleme.....	16
1.4.2. Sperm Motilitesinin Değerlendirilmesi	17
1.4.3. Sperm Canlılığı	18
1.4.4. Sperm Sayısı.....	20
1.4.5. Sperm Morfolojisi	21
1.5. ROS, Antioksidanlar ve Oksidatif Stres.....	23
1.5.1. Erkek İnfertilitesinde Oksidatif Stresin Rolü	24
1.5.2. Erkek üreme sisteminde ROS kaynakları;.....	26
1.5.3. Spermatozoa tarafından reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ...	26
1.5.4. Lökosit tarafından reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi.....	28
1.5.5. ROS ve Sperm Fonksiyonu	28
1.6. Apoptozis	29
1.6.1. Apoptozis Sırasında Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler .	30

1.6.2.	Apoptoz Uyarımının Mekanizmaları	32
1.6.3.	Ekstrinsik ve Reseptör Bağlantılı Yol	33
1.6.4.	İntrinsik veya Mitokondri Aracılı Apoptotik Yol	34
1.6.5.	Apoptoz Düzenleyiciler	35
1.6.6.	Bcl-2	35
1.6.7.	P53.....	36
1.6.8.	Kaspazlar	36
1.6.9.	Spermatogenez ve Apoptoz.....	39
1.7.	Sperm DNA Yapısı	40
1.7.1.	Sperm DNA Hasarı	41
1.7.2.	Sperm DNA Hasarı Nedenleri.....	41
1.7.3.	Sperm DNA Hasar Testleri	42
1.8.	Oksitadif Stres ve DNA Hasarı	44
1.9.	Oksidatif Stres ve Apoptoz.....	45
2.	GEREÇ ve YÖNTEM	46
2.1.	Örnek toplama	46
2.2.	Semen Analizi	46
2.3.	Sperm Apoptozunun Kaspaz 9-8-3 Yöntemi İle Değerlendirilmesi	48
2.4.	Sperm Oksidatif DNA Hasarının 8-OhdG Yöntemi ile Belirlenmesi ..	49
2.5.	İstatiksel Yöntem	49
3.	BULGULAR.....	51
3.1.	Sperm Konsantrasyonu.....	51
3.2.	Motilite	52
3.3.	Normal Sperm Morfolojisi	53
3.4.	Teratozoospermi İndeksi	54
3.5.	Kaspaz 3	55
3.6.	Kaspaz 8	57

3.7. Kaspaz 9	59
3.8. 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG).....	61
4. TARTIŞMA	64
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
6. KAYNAKLAR.....	70
7. EKLER.....	75
8. ÖZGEÇMİŞ.....	77



SİMGELER VE KISALTMALAR

ARS:	Aşırı rezidüel sitoplazma
ATP:	Adenozin trifosfat
CASA:	Bilgisayar yardımlı sperm analizi
cm:	Santimetre
DNA:	Deoksiribonükleik asit
FSH:	Folikül stimüle hormonu
FSH:	Folikül stimüle hormonu
g:	Gram
HPG:	Hipotalamik-hipofizer-gonadal eksen
IM:	Hareketsizlik
IVF:	İn vitro fertilizasyon
kg:	Kilogram
LH:	Luteinleştirici hormon
LH:	Luteinleştirici hormon
LIN:	İleri doğrusallık
m ² :	Metrekare
ml:	Mililitre
NP:	Yerinde hareket
OS:	Oksidatif stres

PBS:	Phosphate-buffered Saline
pH :	Power of Hydrogen
PR:	İleri hareket
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
SHBG:	Seks hormonu bağlayıcı globulinin
VKİ:	Vücut Kitle İndeksi
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
µm:	Mikrometre

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İnfertil Erkeklerde Obeziteye Bağlı Sperm Apoptozunun ve DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Nazlı GÖK

Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA 2017

Bir takım tutarsızlıklarla birlikte, obezitenin sperm parametrelerini olumsuz yönde etkilediği birçok çalışma tarafından bildirilmiştir ancak vücut ağırlığının oksidatif DNA hasarı ve apoptoz üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir.

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliniği'ne ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Konya Eğitim Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliniği'ne infertilite şikayeti ile gelen, spermiogram testi yapılan, sigara ve alkol kullanmayan, operasyon (varikozel gibi) geçirmeyen, kemoterapi, radyoterapi gibi bir tedavi almayan, sperm parametrelerini değiştirdiği bilinen başka bir neden olmaksızın, 25-40 yaş aralığında bulunan, World Health Organization (WHO, Dünya Sağlık Örgütü) VKİ kriterlerine göre obez sınıfına giren 20 birey ile normal kilolu sınıfına giren 20 (kontrol grubu) bireyin onayı alınarak, erkek obezitesinin, sperm kalitesini, morfolojisini, apoptozu ve oksidatif DNA hasarını nasıl etkilediği değerlendirilmek için yapılmıştır.

Apoptozu belirlemek için; efektör kaspazlardan 3 ve başlatıcı kaspazlardan 8 ve 9 kullanılarak immünohistokimya boyama ile bakılmıştır. Oksidatif DNA hasarını belirlemek için; oksidatif DNA hasarına özgün, yan ürün olan 8-OHdG (8-hidroksideoksi guanozin) oranlarına immünohistokimya boyama ile bakılmıştır.

Yapılan bu çalışmada, obez bireylerde, motilitenin, sperm konsantrasyonunun, normal morfolojiye sahip sperm miktarının anlamlı ($p \leq 0,05$) düzeyde az olduğu, apoptozu belirten kaspaz 3-8-9 değerlerinin ve teratozoospermi indeksinin anlamlı ($p \leq 0,05$) düzeyde ve oksidatif DNA hasarını gösteren 8-OHdG değerinin anlamlı olmamakla ($p > 0,05$) birlikte daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Oksidatif DNA hasarı, Apoptoz, İnfertilite, Obezite

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Assessment of obesity-related sperm apoptosis and DNA damage in infertile men

Nazlı GÖK

Department of Histology and Embriology

MASTER THESIS / KONYA 2017

Along with some inconsistencies, It has been reported by several studies that obesity adversely effects sperm parameters, but little is known about the effects of body weight on oxidative DNA damage and apoptosis.

This study was done to determine the effects of male obesity on sperm quality, morphology, apoptosis and oxidative DNA damage by approval of 20 individuals in normal weight range and 20 individuals who are considered obese by BMI standards of World Health Organisation (WHO). The individuals were chosen among the ones who came to IVF Clinic of Selcuk University Medical Faculty Hospital and IVC Clinic, Health Sciences University, Konya Training and Research Hospital with complaints of infertility who had semen analysis test, who doesn't smoke or drink alcohol, who didn't have an operation (such as varicocele), who isn't undergoing chemotherapy or radiotherapy and without any known causes of change in sperm parameters, who is between the ages of 25-40.

To determine apoptosis, immunohistochemical staining was used with Efflux kaspazs 3 and initiator kaspazs 8 and 9. To determine oxidative DNA damage, immunohistochemical staining was used to check 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) which is a marker of oxidative DNA damage.

In this study, motility, sperm concentration, the number of sperm with normal morphology was significantly lower ($p \leq 0.05$), caspase 3-8-9 values indicating apoptosis and teratozoospermia indices were found to be significantly higher ($p \leq 0.05$) and 8-OHDG values showing oxidative DNA damage were found to be higher without statistically significant ($p > 0,05$) in obese individuals.

Keywords: Oxidative DNA damage, Apoptosis, Infertility, Obesity

1. GİRİŞ

Dünya genelinde farklı nedenlerden dolayı erkek infertilitesinde bir artış görülmektedir. Bu nedenlerden biri de obezitedir ancak, obezite ile erkek infertilitesi arasındaki ilişki son zamanlara kadar göz ardı edilmiştir. Obezitenin, son yıllarda hızlı bir artışta olması, şişmanlığın genel olarak sağlığa ve özellikle üreme işlevine olan olumsuz etkilerini ortaya çıkarmıştır (Hammoud ve ark).

Aktif üreme döneminde bulunan erkeklerde obezite, son 30 yılda neredeyse üç kat artmıştır. Obezitenin, erkek üreme potansiyelini olumsuz etkilediği, sadece sperm kalitesini düşürmekle kalmayıp, özellikle testislerde, sperm germ hücrelerinin fiziksel ve moleküler yapısını değiştirdiği ortaya çıkmaktadır. Obezitenin, bu zararlı etkilerinin tersine çevrilmesi için, spermatogenez sırasında gerçekleşen moleküler mekanizmanın daha iyi bilinmesi gerekmektedir. Vücut ağırlığının, apoptoz üzerindeki etkileri hakkında az şey bilinse de obez erkeklerde reproduktif performansın azalmasının ardındaki potansiyel patolojik mekanizmalardan biri sperm oksidatif stresidir (Palmer ve ark 2012).

Obez hastalarda geleneksel sperm parametreleri (semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, hareketli spermatozoa yüzdesi, normal morfolojili spermatozoa yüzdesi) normal kiloya sahip bireylere göre daha kötü bulunmuştur (Hofny ve ark 2010).

Obezite, sistemik oksidatif stresin klinik bir örneğidir ve büyük bir literatür, artmış oksidatif stresin, sperm membranı, kromatin ve DNA bütünlüğü üzerindeki zararlı etkilerini göstermiştir. Buna göre, normal ağırlıklı erkeklere kıyasla obez erkeklerde DNA parçalanma indeksinin belirgin olarak yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Birçok çalışma erkek vücut kütle indeksinde (VKI) meydana gelen artışın, seks hormonu bağlayıcı globulinin (SHBG) plazma konsantrasyonunun da azaldığı ve buna bağlı olduğu bilinen östrojenin plazma konsantrasyonunun da arttığı gözlenmiştir (Aggerholm ve ark 2008).

Düşük testosteron ve yüksek östrojen konsantrasyonları kısmen infertilite ile ilişkilidir ve hipotalamik-hipofizer-gonadal (HPG) eksen döngüsünün bozulması ile

hipogonadizm yoluyla sperm sayısını azaltmıştır ve bu nedenle obezite erkek fertilitésinin klinik belirteçleri arasındadır (Handelsman ve Swerdloff 1985).

Gelişmekte olan germ hücrelerinin sertoli hücrelerine yapışması, testosteron düzeylerine bağlıdır ve testosteron seviyelerinin azalması, olgun spermatidlerin fagositozuna ve sperm sayısının azalmasına neden olur (Kerr ve ark 1993). Follikül uyarıcı hormon (FSH)/lüteinizan hormon (LH) oranları, inhibin B ve SHBG düzeyleri gibi sertoli hücre fonksiyonunun ve spermatogenezisin düzenlenmesinde yer alan diğer hormonların hepsinin VKİ yüksek olan erkeklerde daha düşük olduğu gözlenmiştir (McPherson ve Lane 2015).

Obez bireylerde, sistemik inflamasyonun artması, reaktif oksijen türlerinin artmasına ve sperm DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca hareketsizlik nedeniyle artmış testis sıcaklıkları spermatogenezisi bozar (Kahn ve Brannigan 2017).

Bu nedenle, bu çalışma artan vücut ağırlığının konvansiyonel (konsantrasyon, motilite ve morfoloji) ve konvansiyonel olmayan sperm parametrelerine etkilerini değerlendirmek için yapılmıştır. Bunu yapmak için, 20 normal kilolu ve 20 obez erkekte sperm apoptozunun bulgularını ve oksidatif DNA hasarını immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirdik.

1.1. İnfertilite

İnfertilite, 1 yıl düzenli, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen başarısız gebelik olarak tanımlanır. İnfertilite, altı çiftten en az bir tanesini etkileyen, dünya çapında önemli bir sorundur. İnfertil çiftlerin %30-40'ını erkek faktör oluştururken, %40-50'sini kadın faktör oluşturmaktadır. Doğurganlığı her iki tarafın etkilediği çiftlerin oranı %20-25'dir. İnfertil çiftlerin %15'inde ise yapılan tetkiklere rağmen infertilite nedeni açıklanamamıştır (Tournaye ve Cohlen 2012).

Bir çiftin bir çocuk sahibi olmak için çabaları yaşam boyu deneyimleri dikkate alındığında oldukça farklı bir tablo ortaya çıkmaktadır: Oxford ve Kopenhag'daki çalışmalar, çiftlerin en azından dörtte birinin çocuk sahibi olmada beklenmedik gecikmeler yaşadıklarını ortaya koymaktadır (Balen 2014).

1.1.2. Erkek İnfertilitesi

Erkek faktörler tek başına tüm infertilite vakalarının %30-40'ını oluşturur. Erkek infertilitesinin bilinen etyolojileri arasında kriptorşidizm, obezite, testiküler torsiyon veya travma, varikosel, seminal kanal enfeksiyonları, anti-sperm antikorları, hipogonadotropik hipogonadizm, gonadal disgenezis, genetik nedenler ve üreme kanallarının tıkanması sayılabilir (Shayeb ve Bhattacharya 2009). Ayrıca erkek infertilitesinin birçok nedeni arasından oksidatif stres (OS), doğurganlık durumunu etkileyen faktörlerden biri olarak tanımlanmıştır (Makker ve ark 2009).

Erkek infertilitesi çocuk isteyen bireyler için önemli bir sorundur ve erkek infertilitesinin belirlenmesi için; hastanın öyküsünün alınması (geçirmiş olduğu hastalıklar, ameliyatlar, toksinlere maruziyet, kullanılan ilaçlar), semenin laboratuvarında değerlendirilmesi gerekir (WHO 2010).

1.2. Obezite

Obezite, 'iyiye dolgunlaşan' anlamına gelen Latince 'obezustan' türemiştir. İlk önce 1620'de Thomas Venner'in yazılarında bu terim görülebilir. Bununla birlikte, obezitenin bir bireyin sağlığı üzerindeki olumsuz etkisi daha uzun süredir bilinmektedir ve Hippocrates, Galen ve Avicenna'nın yazılarında bahsedilmiştir. İbni Sina, ansiklopedik tıbbi kitabında 'El kanun fit'tıp (Tıbbın kanunu)' obezite ile erkek infertilitesi arasındaki ilişkiyi tanımlayan ilk kişidir. İbni Sina, 'aşırı kilonun sağlık açısından dezavantajları' başlıklı bir bölümde, obez erkek bireylerin düşük sperm parametrelerine sahip olduğunu ve başarılı fertilizasyon sağlayamadığını söylemiştir (Hammoud ve ark 2008).

Obezite, beyaz yağ dokusunun aşırı bir şekilde vücutta birikmesi sonucu sağlığı olumsuz etkileyebileceği, potansiyel olarak ömrü azaltabileceği düşünülen tıbbi bir durumdur. Ayrıca, boy uzunluğuna göre vücut ağırlığının istenilmeyen şekilde artması olarak tanımlanmaktadır. Vücut kitle indeksi (VKİ) kilogram cinsinden kişinin ağırlığının, metre kare cinsinden boy uzunluğuna bölünmesiyle (kg/m^2) hesaplanmaktadır. VKİ, 18.5-24.9 kg/m^2 arasında olanlar normal kilolu bireyleri oluştururken, 25-29.9 kg/m^2 arasında olanlar fazla kilolu, 30-39.9 kg/m^2 arasında olanlar obez ve 40 kg/m^2 ve üzerinde olanlarda morbid obez olarak sınıflandırılmaktadır. Erkeklerde yağ dokusu vücut ağırlığının %15-%18'ini

oluşturur. Bununla birlikte, özellikle merkezi karın bölgesinde vücut yağlarının dağılımı da bir hastayı obez olarak teşhis etmek için kullanılmıştır (Katib 2015).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, 2014'te, 18 yaş ve üzeri 1,9 milyardan fazla yetişkinin aşırı kilolu, 600 milyondan fazla yetişkinin obez olduğu tespit edildi. Birçok iş biçiminin giderek yerleşik olması, kentleşmenin artması nedeniyle fiziksel hareketsizlikteki artış ve yüksek enerjili gıdaların alımının artması bu durumun sebepleri arasında sayılabilir (Organization 2016).

1.2.1. Erkek İnfertilesi ve Obezite

Birçok çalışmanın sonucuna göre, kilolu erkeklerde anormal semen parametrelerinin olma ihtimali ve erkek bireyin obez olduğu çiftler arasında infertilite riski artmaktadır. Bu nedenle, obezite erkek infertilitesiyle yüksek oranda ilişkilidir (Du Plessis ve ark 2010).

Erkek bireylerde artan yağ ile artmış östrojen seviyelerinin bağlantılı olduğu görülmektedir. Aromataz enzimi yağ dokusunda bulunan testosteronun östradiol ve östrona dönüşümünü sağladığından obez bireylerde yağ dokusunda bu enzimin artmasına bağlı olarak androjenlerin östrojene dönüşümünün arttığı ve testosteron seviyesinin azaldığı bildirilmektedir (Jarow ve ark 1993).

Erkek bireylerde yağ artışı skrotal sıcaklıklarda artışa neden olarak, erkek infertilitesi üzerine hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkisinin olabileceği, sonuç olarak erkek bireylerdeki sperm bozukluğunun ortaya çıktığı belirtilmektedir. Obezitenin yaygınlığı, doğurganlık üzerindeki etkilerinin, altta yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasının ve tedavi yollarının araştırılmasının klinik olarak daha iyi değerlendirilmesini gerektirmektedir (Du Plessis ve ark 2010).

1.3. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, testisler, genital kanallar, aksesuar bezleri ve eksternal genital organlardan oluşmaktadır (Şekil 1.1.A.). Testisler sperm üretmekle birlikte erkek üreme fizyolojisini yönlendiren testosteron gibi hormon salgılayan endokrin hücreler de içerir. Testosteron, spermatogenesis, embriyonik ve fetal gelişme sırasındaki cinsel farklılaşma ve hipofizdeki gonadotropin sekresyonunun kontrolü için önemlidir. Testosteron metabolitleri olan dihidrotestosteron, ergenlik

döneminde birçok dokuda (örn, erkek yardımcı bezleri ve kıl kökü) görülmektedir. Genital kanallar ve aksesuar bezleri sperm aktivitesi için gerekli salgıları üretir. Bu salgılar erkek üreme sistemi ile sınırlı iken spermatozoa için besin maddeleri sağlar. Spermiler ve aksesuar bezlerinin salgıları, semeni oluşturur (Ross 2006).

Testis 900'den fazla sarılı seminifer tüplerden oluşur ve bunların her biri ortalama yarım metre uzunluğunda olup spermilerin oluştuğu yerdedir. Sperm daha sonra epididime boşaltılır. Her testis, yoğun bağ dokusu olan tunika albuginea'nın kapsülüyle çevrilidir. Tunika albuginea, mediastinum testis (kan ve lenf damarlarının geçtiği bölge) oluşturmak için testisin arka tarafında kalınlaşır. Mediastinum testis, testisi yaklaşık 250 piramidal bölmeye veya testis lobülüne böler (Şekil 1.1.B.), ve lobüller arasında sıkça iletişim vardır. Her lobülde dört adet erkek üreme hücrelerinin (spermatozoon, sperm, spermiyum) üretim yeri olan seminifer tübül (Tubulus seminiferus) bulunur. Seminifer tübüller erkek üreme hücrelerini (spermatozoon, sperm, spermiyum) üretirken, interstisyel hücreler testosteron ve androjenleri salgırlar (Hall 2015).

Her seminifer tübül, germinal veya seminiferöz epitel olarak adlandırılan kompleks, özelleşmiş bir epitel ile astarlanmaktadır. Seminiferöz epitel iki hücre tipinden oluşur; besleyici ve aynı zamanda destekleyici sustentaküler hücreler (Sertoli hücreleri) ile germ ya da spermatogenik hücrelerdir (Hall 2015).

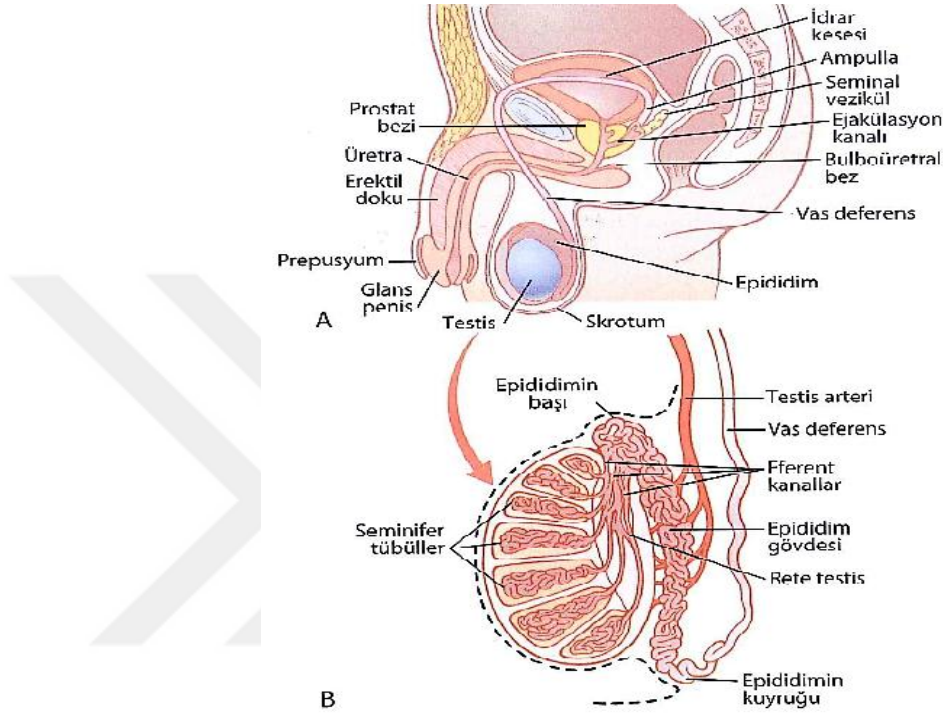
Testis, testis torbası (skrotum) içinde yer alır. Testis embriyonik karın boşluğunun dorsal duvarında periton zarın arkasında gelişir. Fetal gelişim sırasında hareket ettirilir ve sonunda skrotomik kordonların uçlarındaki skrotumun iki tarafında askıya alınırlar. Karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler, fetüs geliştikçe doğumdan önce skrotum'a inerler (Hall 2015).

Sıcaklık, spermatogenezin düzenlenmesinde önemlidir ve bu sıcaklık 37°C'nin altında olması gerekir. Çeşitli mekanizmalarla skrotal kesede yaklaşık 34°C'lik bir testiküler sıcaklık muhafaza edilir. Her testiküler arter, arteriyal kanından karşı akımlı bir ısı değişirme sistemi ile ısı çekebilen, testisten daha serin bir kanla zengin bir pampiniform venöz pleksus ile çevrilidir (Ross 2006).

Epididim, yaklaşık 6 metre uzunluğunda bir sargı tüpüdür. Epididim, prostat bezine bağlanan, spermatozoonların iletimini sağlayan vas deferens ile devam eder.

Epididime gelen spermatozoonlar burada depolanır, olgunlaşır ve hareket yeteneği kazanırlar. Epididim olgunlaşan spermatozoonları vas deferense iletir (Hall 2015).

Son olarak, testisten dışa geçen son bağlantı üretra hattıdır. Üretra, çok sayıdaki üretral bezlerden ve bulboüretral bezlerden (Cowper bezleri) üretilen mukus salgılanır (Hall 2015).



Şekil 1.1. Erkek genital sistemi ve testis ve epididim ayrıntılı yapısı (Hall 2015).

1.3.1. Spermatogenez

Ergenlikte ilkel bir germ hücresi olan spermatogonyumun ileri derecede farklılaşmış spermiyum oluşumuna kadar erkek germ hücrelerinin gösterdiği histolojik süreç spermatogenez olarak adlandırılır (Ross 2006).

Embriyon oluşumunda, primordiyal germ hücreleri testislere göç eder ve seminifer tübüllerin iç yüzeylerinin iki veya üç katmanında bulunan spermatogonyum denilen olgunlaşmamış germ hücreleri haline gelir. Spermatogonyum, ergenlik çağından (puberte) başlayarak, mitoz ve mayoz bölünme ile belirli gelişim evreleri boyunca sperm oluşturmak için sürekli olarak çoğalır (Gartner ve Hiatt 2007).

Spermatogenesis, ortalama 13 yaşında başlayan ve hayatın geri kalan bölümünün çoğunda devam eden ancak yaşlılık döneminde belirgin şekilde düşen ön hipofiz gonadotropik hormonların uyarılması sonucunda seminifer tübüllerde görülür (Ross 2006).

Spermatogenezi uyararak birkaç hormonun önemli rol oynadığına dikkat edelim. Bunlardan bazıları şunlardır:

1) Testosteron; interstisyumunda bulunan Leydig hücreleri tarafından salgılanır, sperm oluşumunda germinal hücrelerin büyümesi ve bölünmesi için gereklidir.

2) Lüteinizan hormon (LH); ön hipofiz bezi tarafından salgılanır, Leydig hücrelerini uyarak testosteron salgılanmasını sağlar.

3) Folikül stimüle edici hormon (FSH); ön hipofiz bezi tarafından salgılanır ve sertoli hücrelerini uyarır; bu uyarılma olmadan, spermatidlerin sperm haline dönüşümü (spermiyogenez süreci) meydana gelmez.

4) Östrojen; FSH tarafından uyarılan sertoli hücrelerinde testosteron ile birlikte yapılır, oluşan östrojenler spermiyogenez için gereklidir.

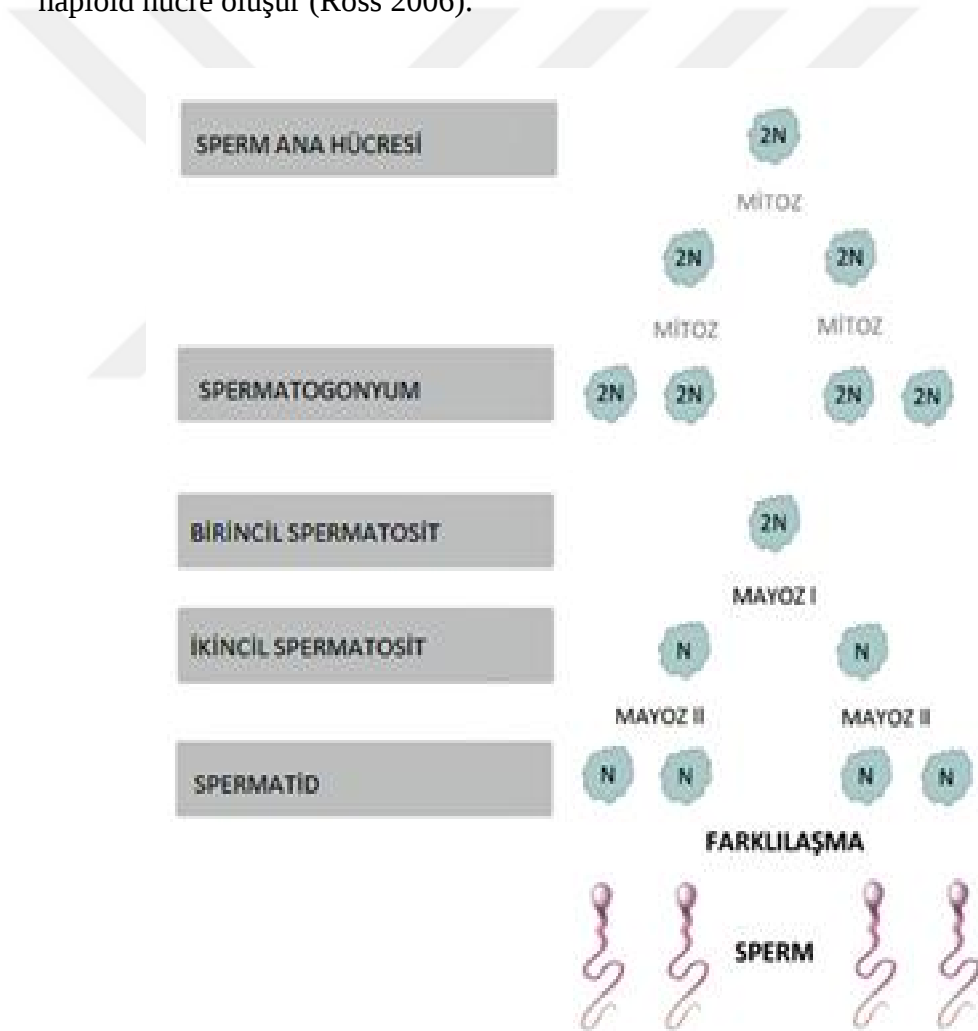
5) Büyüme hormonu; testislerin temel metabolik fonksiyonları için gereklidir. Büyüme hormonu spermatogonyumların erken bölünmesini teşvik eder (Hall 2015).

Spermatogenez 3 aşamada incelenir; spermatogenez, spermatogonial, spermatosit (mayoz) ve spermatid faz (Şekil 1.2.) (Gartner ve Hiatt 2007)

Hipofiz gonadotropik hormonların (FSH ve LH) etkisiyle spermatogonyum, mitozla bölünerek A tipi spermatogonyum hücrelerini oluşturur. A tipi spermatogonyumun bir kısmı seminifer tübüllerde kök (stem) hücre olarak depo edilirken, bir kısmı birkaç kez bölünmeye uğrar ve B tipi spermatogonyumu oluşturur (Gartner ve Hiatt 2007). Her bir B tipi spermatogonyum daha sonra, mitoz bölünmeye uğrayarak ökromatik çekirdekli küresel hücreler olan birincil (primer) spermatositi oluşturur (Gartner ve Hiatt 2007) (Ross 2006).

Primer spermatosit, DNA sentez basamağı S fazını tamamlayıp, yaklaşık 22 gün süren mayoz bölünmenin ilk fazı olan profaz evresine girer (Ross 2006). Profaz; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez olmak üzere beş evreden oluşur (de Kretser ve ark 1998).

Mayozun ilk evresinin sonunda 46 (44 + XY) kromozom (diploid) sayısına sahip olan primer spermatosit DNA replikasyonu geçirip, bölünerek kromozomları iki kromatidli, 23 kromozoma (22 + X veya 22 + Y) sahip sekonder spermatositi oluşturur. Sekonder spermatositler testis kesitlerinde nadirdir, çünkü bunlar kısa süre canlı kalmış hücrelerdir. Her sekonder spermatositin bölünmesi, her kromozomun kromatidlerini ayırır ve her biri 23 kromozom içeren spermatid adı verilen iki haploid hücre oluşur (Ross 2006).



Şekil 1.2. Spermatogenez aşamaları

1.3.2. Spermiyogenez

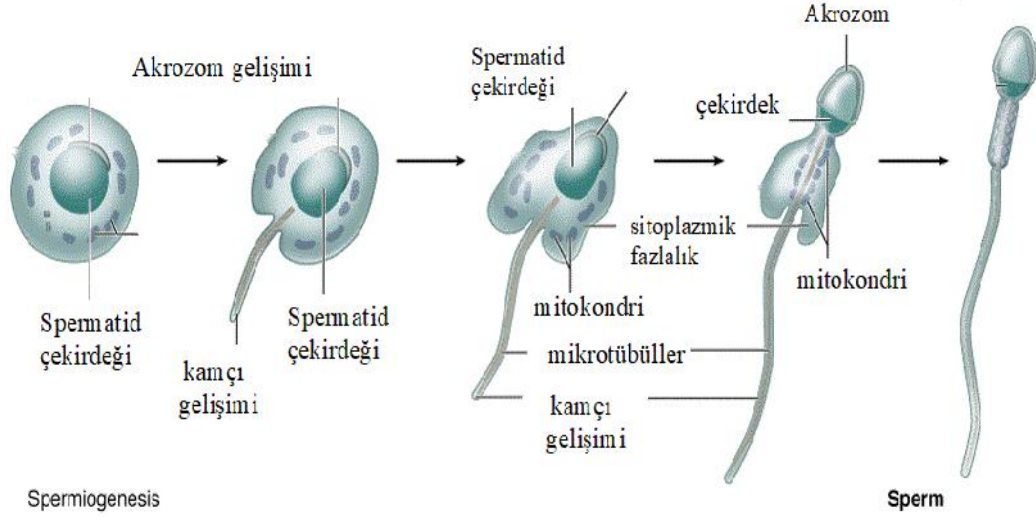
Spermiyogenezis, sperm üretiminin son aşamasıdır ve spermatidlerin, DNA'yı barındıran olgun erkek hücreler olan spermatozoa'ya (spermiyum) dönüşme sürecidir (Ross 2006).

Bu işlem sırasında hücre bölünmesi meydana gelmez. Spermatidler, küçük boyutları (7-8 m çapında), yüksek düzeyde yoğunlaşmış kromatin ile haploid çekirdekler ve seminifer tübüllerin lümenine yakın konumları ile ayrılabilir. Spermiyogenez, akrozomun oluşumunu, çekirdeğin yoğunlaşması ve uzamasını, kamçı gelişimini ve sitoplazmasının işe yaramayan kısmını kaybetmesini içerir. Sonuçta, daha sonra seminifer tüpün lümenine salınan olgun spermatozoon bulunur (Ross 2006).

Spermiyogenez dört aşamaya ayrılır; golgi evresi, kep evresi, akrozomal evre ve maturasyon evresi (Ross 2006) (Şekil 1.3.).

Golgi safhası, spermatidlerin sitoplazmasında çekirdeğin yakınında belirgin bir golgi aparatı bulunur. Golgi kompleksi; mitokondri, bir çift sentriyol, serbest ribozom ve agranüler ER ağına sahiptir. Küçük glikoproteinden zengin proakrozomal veziküller golgi aparatında birikir daha sonra, çekirdeğin bir ucuna yakın bir bölgede akrozomal vezikül oluşturacak şekilde birleşir.

Akrozomal vezikül genişleyerek nukleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve 2/3'nü kaplar. Akrozomal kep (akrozomal şapka) oluşturularak ön kutup belirlenmiş olur. Sentrioller, hücre yüzeyi yakınında, akrozomun karşısında bir yere göç eder ve aksonemi oluşturan parçalar bir araya gelir (Gartner ve Hiatt 2007).



Şekil 1.3. Spermiyogenez (Kahn ve Brannigan 2017).

Akrozoim aşamasında, akrozoim baş, yoğunlaşan çekirdeğin yaklaşık yarısını kaplayacak şekilde yayılır. Akrozoim, hiyalüronidaz, nöraminidazlar, asit fosfataz ve akrozin olarak adlandırılan bir tripsin benzeri proteaz da dahil olmak üzere birçok hidrolitik enzim içeren özel bir lizozom türüdür. Bu enzimler spermatozoa bir oositle karşılaştığında ve akrozoimanın dış zarıyla sperm plazma membranı ile kaynaştığında salınır, aktif hale gelir. Korona radiyata hücrelerini ayırırlar ve yumurta çevreleyen her iki yapıdaki zona pellusida'yı da sindirirler. Bu süreç, akrozoim reaksiyon, döllenmedeki ilk adımlardan biridir (Ross 2006).

Ayrıca spermiyogenezin bu safhasında spermatidler sertoli hücrelerinin tabanına yönlendirilir ve aksonemler tüpün lümenine doğru çıkıntı yapar. Buna ek olarak, çekirdekler daha uzundur ve kromatin yoğunlaşır, nükleozomların histonları, protaminler adı verilen küçük bazik peptidlerle değiştirilir. Flagella büyümesi devam eder ve mitokondri, kamçının proksimal kısmının etrafında toplanır ve orta parça olarak bilinen kalınlaşmış bir bölge oluşturur, burada sperm hücrelerinin hareketleri için ATP'nin üretildiği bölge bulunur. Flagellumun hareketi ATPaz aktivitesi olan bir protein olan ATP ve dynein'in mikrotübüllerinin etkileşimlerinden kaynaklanır (Ross 2006).

Somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizin zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma oluşur. Bu somatik histonların protaminlere

dönüşümünden sonra, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilir. Spermiyogenezin olgunlaşma aşamasından sonra belirgin bir RNA sentezi yoktur (Kierszenbaum 2006).

1.3.3. Olgun Sperm Yapısı ve Fizyolojisi

Sperm vücuttaki birçok hücreden daha küçüktür, aslında, bir sperm hücresinin hacmi kadın gametinkinden 85.000 kat daha azdır. Her gün yaklaşık 100 ila 300 milyon sperm üretilirken, kadınlarda yumurta üretimi ayda bir görülmektedir (Rogers 2010).

Spermatidler ilk kez oluştuğunda epiteloid hücrelerin olağan özelliklerine sahiptirler, fakat yakın zamanda farklılaşıp, uzayarak spermatozona dönüşmeye başlarlar (Hall 2015).

Sperm hücresinin uzunluğu yaklaşık 60 μm dir baş kısmının boyu 3-5 μm , eni 2-3 μm dir. Her spermatozonun ayırıcı bir baş, boyun, orta parça ve kuyruk bölgesi vardır (Şekil 1.4.) (Rogers 2010).

Sperm başı çok az sitoplazma ile son derece kompakt DNA materyalini taşıyan haploid çekirdeği içerir. Baş kısmını; yoğunlaşmış hücre çekirdeği, ince bir sitoplazmik kısım ve hücre zarı tabakası oluşturmaktadır (Gartner ve Hiatt 2007). Başın dış kısmının üçte ikisini golgi aygıtlarından oluşan akrozom adı verilen kalın bir tabaka oluşturur. Akrozom adı verilen bu yapı, hiyalüronidaz (dokuların proteoglikan liflerini sindirebilen) ve güçlü proteolitik enzimler (proteinleri sindirebilen) de dahil olmak üzere, tipik bir hücrenin lizozomlarında bulunan enzimlere benzer birçok enzim içerir. Bu enzimler, spermilerin yumurta içine girmesine ve döllemesine izin verirken önemli rol oynamaktadır (Hall 2015).

Flagellum denilen sperm kuyruğunun üç ana bileşeni vardır:

- 1) Aksonem olarak adlandırılan 11 mikrotübülden oluşturulmuş merkezi bir iskelet
- 2) Aksonemi kaplayan ince bir hücre zarı

3) Kuyruk proksimal kısmında (kuyruk gövdesi olarak adlandırılır) aksonemi çevreleyen mitokondri topluluğu vardır.

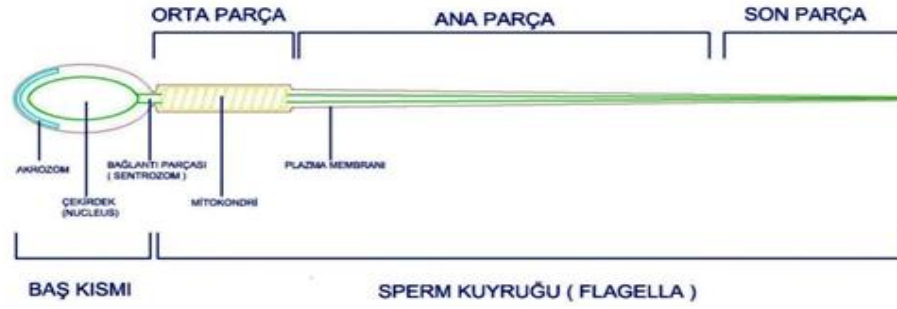
Kuyruğun ileri geri hareketi (flagella hareketi) sperm için hareketlilik sağlar. Bu hareket, aksonemi oluşturan, ön ve arka tübüller arasındaki ritmik kayma hareketi sonucu oluşur. Bu işlemin enerjisi, kuyruk gövdesindeki mitokondriyum tarafından sentezlenen adenosin trifosfat ile sağlanır. Normal sperm, akışkan bir ortamda 1-4 mm/dakika hızda hareket eder (Ross 2006).

Spermin seminifer tübüllerde oluşumdan sonra, altı metrelik epididimin tübüllerinden geçmesi birkaç gün alır. Seminifer tübüllerden ve epididimin ilk bölümlerinden çıkan sperm nonmotile (hareketsiz) olup yumurta dölleyemezler. Bununla birlikte, spermler 18-24 saat epididimde olduktan sonra, hareketlilik yeteneğini kazanırlar (Ross 2006).

Spermlerin testislerde depolanması; genç bireylerin testislerinde yaklaşık 120 milyon sperm oluşturulur. Bunların küçük bir kısmı epididimde depolanır. Depolanan spermler en az bir ay boyunca fertilizasyon (dölleme) yeteneğini korurlar.

Bu süre zarfında, kanalların sekresyon sıvılarına bulunan çok sayıda önleyici madde ile hareketsiz durumda tutulurlar. Sertoli hücreleri ve epididimis epitelleri, sperm ile birlikte özel bir besin sıvısı salgırlar. Bu sıvı, hormonları (testosteron ve östrojen), enzimleri ve sperm olgunlaştırması için gerekli özel besinleri içerir (Alberts B 2002).

Olgun Spermler, normal hareketli, fertil (üreme yeteneği olan) sperm, sıvı ortamda dakikada 1-4 mm hızda hareket edebilmektedir. Sperm aktivitesi, nötr ve hafif alkali bir ortamda büyük ölçüde gelişir, ancak hafif asitli ortamda büyük oranda baskılanır. Güçlü asidik bir madde, spermlerin hızlı ölüme neden olabilir. Sperm aktivitesi, sıcaklık arttıkça belirgin bir şekilde artmakta, aynı zamanda metabolizma hızını da arttırmakta ve sperm ömrünü önemli ölçüde kısaltmaktadır.



Şekil 1.4. Olgun sperm kısımları

1.4. Semen Analizi

Meni, vas deferensten gelen sıvı ve sperm (toplamın yaklaşık %10'u), seminal veziküllerden gelen sıvı (neredeyse %60), prostat bezinden gelen sıvı (yaklaşık %30) ve mukus bezlerinden, özellikle de bulboüretral bezlerden küçük miktarda gelen sıvıları içerir. Spermanın ortalama pH değeri yaklaşık 7.5'tir, bunu, alkali prostatik sıvı, hafif asidik olan semen sıvısını nötralize ederek sağlar (Hall 2015).

İnsan sperması, hücresel ve kimyasal bileşenleriyle bu sıvıyı üreten organların işlevsel özellikleri hakkında bilgi sağlar (Eliasson 2010).

Semen analizi, yeni atılmış spermanın laboratuvar testidir. Mikroskop altında, spermelerin sayısı, şekli ve hareketi ölçülür. Bir semen analizi, erkek infertilitesinin teşhis edilmesinin önemli bir parçasıdır. Semen analiz değerleri Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre (WHO) (Çizelge 1.1.) şu şekildedir:

Çizelge 1.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün alt referans değerleri (WHO 2010).

Parametre	Alt Referans Sınırı
Sperm morfolojisi (normal şekiller %)	4 (3,0-4,0)
Sperm konsantrasyonu (10^6 ml başına)	15 (12-16)
Toplam sperm sayısı (10^6 ejakülat başına)	39 (33-46)
Toplam motilite (PR+NP %)	40 (38-42)
Hızlı motilite (PR %)	32 (31-34)
Semen volümü (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Vitalite (canlı spermatozoa)	58 (55-63)
Semen pH	≥ 7.2

İnfertil şikayetiyle gelen çiftlerin tıbbi araştırmaları yapılırken, erkek bireye semen analizi testi uygulanır. Semen analizi; WHO tarafından onaylanmış yöntemleri kullanan özel bir laboratuvar da yapılmalıdır, doğru bir semen analizi yapmak için özel ekipman ve uzmanlığa ihtiyaç duyulmaktadır (McLachlan 2014).

Düzenli sperma analizi, sperm üretimi, sperm motilitesi ve canlılığı, erkek genital sisteminin açıklığı, aksesuar organların salgıları hakkında yararlı bilgiler sağlar. Bu tahlil, infertil erkeğı ilk değerlendirmede kullanışlı bilgiler ortaya koysa da, spermatozoon'un fertilizasyon potansiyeline dair bilgi sağlamaz. Sonuçlar doğurganlık ile ilişkili olabilir fakat doğrudan doğurganlık ölçüsü değildir (Vasan 2011).

Semenin iki ölçülebilir özelliğı vardır;

Toplam sperm sayısı: bu, testislerde sperm üretimini ve testiküler kanal sisteminin açıklığını yansıtır

Çeşitli aksesuar bezlerinin katkıda bulunduğı toplam sıvı hacmi: bezlerin salgı aktivitesini yansıtır.

Spermatozoa'nın canlılıkları, motilitesi ve morfolojisi ve seminal sıvı bileşimi, sperm fonksiyonu için önemlidir (WHO 2010).

Semen kalitesinin laboratuvar ölçümlerinin sonuçları şu maddelere bağı olacaktır; tam bir numunenin toplanıp toplamadığı, epididimal spermatozayı seyrelten sıvıları olan aksesuar cinsiyet bezlerinin aktivitesi, bir önceki cinsel perhiz süresi, sperm sayısını etkileyen testisin büyüklüğüdür. Değışen ve büyük ölçüde kontrol edilemeyen bu faktörler, spermanın bireyler arasındaki farklılığı açıklamaktadır.

Semenin bulunduğı numune kabı İlk 5 dakika içinde, likefaksiyon (sıvılaştırma) için (37°C) inkübatöre yerleştirilmelidir. 30 ila 60 dakika arasında, semenin görünüşünün değerlendirilmesi, semen hacminin ve pH'sının ölçümü yapılmalıdır.

Spermin bulunduğı sıcaklığın değışimemesi için, sperm örneğinin toplanması ve analiz arasındaki süreyi kısa tutmak gerekir, bu nedenle sperm örneğı

laboratuvarın yakınındaki özel bir odada alınmalıdır. Örnek, en az iki gün ve en çok yedi günlük cinsel perhiz süresi sonunda toplanmalıdır. Erkek bireye, semen örneğinin toplanması ile ilgili net yazılı ve sözlü talimatlar verilmelidir (Jeyendran 2003).

Semen analizi yapılacak erkek bireyin, adı, doğum tarihi ve kişisel kod numarası, perhiz süresi, toplanma tarihi ve saati, sperm analizinin başlaması ve toplanması arasındaki süre kaydedilmelidir. Numune (semen) örneği, spermatozoa için toksik olmadığı teyit edilen cam veya plastikten yapılmış temiz, geniş ağızlı bir kap içine alınmalıdır. Spermatozoa alındıktan sonra spermleri etkileyebilecek büyük sıcaklıktak değişimlerden kaçınmak için, numune kabının ortam sıcaklığı 20°C ile 37°C arasında tutulmalıdır. Erkek bireyin adı ve kimlik numarası ile toplanma tarihi ve saati ile etiketlenmelidir. Semen likefiye olurken, numune kabı laboratuvar sehpası üzerine veya inkübatöre (37°C) yerleştirilir (Jeyendran 2003).

Semen dışı gelen kaynaklardan kaçınılmalı, kontaminasyon önlenmelidir. Numune kapları, pipet uçları ve karıştırma için kullanılan pipetlerin steril olması gereklidir (McLachlan 2014).

Semenin makroskopik değerlendirilmesi; semenin likefaksiyonu sonrası ilk değerlendirme gözle muayene ile başlar. Dehidratasyon veya sıcaklığın semen kalitesini etkilemesini önlemek için yaklaşık 30 dakika sonra başlanmalıdır.

Likefaksiyon; semen örneği alındıktan hemen sonra, tipik olarak yarı katı koagülasyonlu bir yapıdadır. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde, sıvılaşmaya başlar, sıvılaşma devam ederken meni daha homojen ve oldukça sulu hale gelir ve son safhalarda sadece küçük koagülasyon (pıhtılaşma) alanları kalır. Numune genellikle oda sıcaklığında 15 dakika içinde sıvılaşır, ancak nadiren 60 dakika veya daha fazla sürebilir (McLachlan 2014).

Semen vizkositesi; viskozite, seminal sıvının likefaksiyonunu ölçer. Semen örneği, tek kullanımlık plastik pipet içinden aspire edilerek, damlamaya bırakıldığında oluşan iplikçığı gözlemleyerek, numunenin viskozitesi tahmin edilebilir. Viskozite normal ise; pipetten belirgin küçük damlalar şeklinde düşer. Viskozite anormal ise; damla 2 cm'den uzun iplikçik oluşturur. Yüksek viskozite, sperm hareketliliğinin, konsantrasyonunun saptanmasına yardımcı olur. likefaksiyon

başarısızlığı genellikle, proteolitik enzimler olan fibrinolizin, fibrinojenaz ve aminopeptidaz'ın prostat tarafından yetersiz salınımının bir işaretidir. Öte yandan, pıhtılaşma yokluğu, ejakulatuar kanal tıkanıklığını veya konjenital seminal veziküllerin yokluğunu gösterebilir (Vasan 2011).

Semenin görünümü; likefiye olmuş normal semen örneğinde homojen, gri opak bir görünüm bulunur. Sperm konsantrasyonu çok düşük ise daha az opak görünebilir, kırmızı kan hücreleri mevcut olduğunda (hemospermi) kırmızı-kahverengi renkte görülür veya vitamin, ilaç alan bir erkek bireyin örneği sarı renkli olabilir (WHO 2010).

Semen hacmi; ejakülatta bulunan toplam spermatozoa ve sperm dışı hücre sayısının hesaplanması ve değerlendirilmesi için, semen hacminin ölçümü gerekir, hacim, numunenin toplandığı kabın tartılmasıyla ölçülür. Numuneyi önceden tartılmış, temiz, tek kullanımlık bir kapta toplayın. Kabın ağırlığını çıkartın. Spermanın yoğunluğunun 1 g/ml olduğu varsayılarak örnek ağırlığındaki hacim hesaplanır veya dereceli cam kaplar kullanarak doğrudan yapılabilir. Semen hacim değerleri cinsel perhiz süresi ardından verilen semen örneğinin normal hacmi 2-6 ml civarındadır, alt sınır değeri 1,5 ml'dir (Vasan 2011).

Semen pH'ı; Normal sperma pH'ı 7.2-8.2 aralığında yer alır ve boşalmadan sonra zamanla artma eğilimi gösterir, pH kağıdı numuneye batırılarak renk değişimi gözlenir ve pH değeri yazılır (Vasan 2011).

1.4.1. Mikroskopik İnceleme

Mikroskopik incelemede 100 kat (100X) büyültmeli faz kontrast mikroskobu kullanılır. Boyanmamış semen preparatları başlangıçta faz kontrast mikroskobu ile incelenir, mukus iplikçik oluşumu, sperm agregasyonu ve aglütinasyonu, spermillerden başka hücrelerin varlığı, ör. Epitel hücreleri, "yuvarlak hücreler" (lökositler ve olgunlaşmamış germ hücreleri) ve izole edilmiş sperm başları veya kuyrukları görülür (WHO 2010).

Daha sonra, mikroskop büyütmesi 200X veya 400X'e (20X veya 40X objektifli 10X okülerin kombinasyonu) çıkarıldığında, sperm motilitesinin, sperm sayısının doğru olarak değerlendirilmesi yapılır (WHO 2010).

Sperm agregasyonu; spermelerin birbirlerine veya hareketli spermere, mukus iplikçiklerine, sperm olmayan hücrelere veya çöplere yapışması, spesifik olmayan toplanma olarak kabul edilir (WHO 2010).

Sperm aglütinasyonu; hareketli spermelerin, birbirine baş başa, kuyruk kuyruğa veya karışık bir şekilde yapışması olarak belirtilir. Sperm antijenlerine immünolojik koruma, kan testis bariyerini oluşturan sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarıyla sağlanır. Spermatozoon, bu bariyerin bozulduğu koşullarda sistemik bağışıklık savunma sistemine maruz bırakıldığında bağışıklık tepkisini uyandırır ve antisperm antikorlarının (ASA) oluşumuna neden olur. Bazı ASA'lar sperm hücresi üzerinde sitotoksik bir etkiye sahiptir ve hücre ölümüne ve sperm hücrelerinin immobilizasyonuna neden olabilir. ASA'ların diğer etkileri, spermelerin servikal mukusta geçişini engelleyen, bölgenin bağlanması ve geçişini engelleyen, hareketli spermelerin aglütinasyonlu kümelerinin oluşturulmasını içerir (Vasan 2011).

1.4.2. Sperm Motilitesinin Değerlendirilmesi

Progresif sperm hareketliliğinin derecesi, gebelik oranları ile ilişkilidir.

Manuel sperma analizi, sperm hareketini ölçme yeteneğinden yoksundur. Bilgisayar yardımlı sperm analizini içeren (CASA) yöntem, sperm hareketini (sperm baş ve kamçı hareketi) analiz etme kapasitesinden dolayı yararlıdır; sonuçların İn vitro fertilizasyon (IVF) sonucuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Vasan 2011).

Bazı önemli parametreler şöyledir:

Eğrisel hız (VCL): belirli bir süre boyunca sperm başının hareket hızının ölçüsüdür.

Ortalama yol hızı (VAP): spermatozoonunun ortalama yolu boyunca olan hızdır.

Düz hat hızı (VSL): hücrenin doğrusal veya ileri hızıdır.

Doğrusallık: ileri ilerlemenin doğrusallığı (LIN), VSL'nin VCL'ye oranıdır ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

Genişliği: sperm başının yanal kafa yer değiştirmesinin (ALH) genişliği, hücresinin ilerleme eksenini veya ortalama yolu etrafındaki yan sapmasından hesaplanır (Vasan 2011).

Sperm motilitesinin, dehidrasyonun, pH değerinin veya sıcaklığının sperm üzerindeki olumsuz etkilerini sınırlamak için, sıvılaştıktan sonra tercihen 30 dakika veya bir saat içinde değerlendirilmelidir. Semen örneği iyice karıştıktan hemen sonra sperm preparat üzerine yayılır ve faz kontrastlı optik ile 200X veya 400X büyütmede incelenir. Farklı motil kategorilerinin yüzdesi için lam başına en az beş alanda yaklaşık 200 sperm oranını değerlendirilir. İleri hareket (PR), yerinde hareket (NP), hareketsizlik (IM) değerleri, kabul edilebilir derecede yakın olup olmadığını kontrol etmek için karşılaştırılır (WHO 2010).

WHO kılavuzuna göre, sperm motilitesinin değerlendirilmesi ve sınıflandırılması yapılmıştır. Spermatozonun ileri hareketli, yerinde hareket, hareketsiz olarak sınıflandırılması önerilmektedir. Her sperm spermatozonunun motilitesi aşağıdaki gibi derecelendirilir (WHO 2010).

İleri hareket (Progresif Motilite; PR): hızdan bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir çevrede aktif sperm hareketleridir.

Yerinde hareket (Nonprogresif Motilite; NP): ilerlemenin yokluğu ile motilitenin diğer tüm desenleridir, yani küçük dairelerde yüzme, başı zorla yerinden oynatan kamçısal kuyruk hareketi veya sadece kuyruğun kamçı hareketi gözlemlenebilir.

Hareketsizlik (İmmotilite; IM): hareketin olmamasıdır.

Sperm motilitesini bildirirken toplam hareketlilik (PR + NP) veya ilerleyici hareketlilik (PR) belirtilmesi önerilir. Kademeli olarak hareketli spermin yüzdesinin gebelik oranı ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir ve doğru ölçümleri sağlamak için büyük özen gösterilmelidir (Franken ve Oehninger 2012).

1.4.3. Sperm Canlılığı

Hücrelerin membran bütünlüğünü değerlendirerek, tüm numunelerde rutin olarak belirlenebilir, yaklaşık %40'tan az ilerleyen motil spermelere sahip örnekler için vitalite özellikle önemlidir. Ölü hücrelerin yüzdesi, immotil spermatozoa oranını

aşmaması gerektiği için, motilite değerlendirmesinde bir kontrol sağlar. Canlı hücrelerin yüzdesi normalde hareketli hücrelerin yüzdesini aşar. Canlı spermilerin yüzdesi bozulmamış hücre zarı olanları, boya tutmaması veya hipotonik şişme testi ile belirlenerek değerlendirilir. Boya tutma yöntemi, canlı olmayan (ölü) hücrelerde hasar görmüş plazma zarlarının geçirgen olmasından boyanın hücre içine girmesine izin vermesi ilkesine dayanır. Hipoozmotik şişme testi, bozulmamış membranı olan hücrelerin hipotonik solüsyonlarda şişeceğini varsaymaktadır (WHO 2010).

Sperm canlılığı, dehidrasyonun veya sıcaklığın canlılık üzerindeki olumsuz etkilerinin gözlenmesini önlemek için semen örneğinin likefiye (sıvılaşma) olduktan sonra, tercihen 30 dakikada veya bir saat içinde, değerlendirilmelidir (WHO 2010).

Eozin-nigrozin kullanarak sperm canlılığı testi; eozin nigrozin sperm boyamasının temeli, ölü spermilerin zar yapısı bozulduğundan, boyayı içeri alması ve boyanmış görünmesi esasına dayanır (Björndahl ve ark 2003). Bu tek aşamalı boyama tekniği, arka plan ile sperm kafaları arasındaki kontrastı artırmak için nigrozin kullanır; bu da onları ayırt etmeyi kolaylaştırır. Aynı zamanda, lamaların yeniden değerlendirme ve kalite kontrol amacıyla depolanmasına izin verir (WHO 2010).

Aydınlık alan optiklerinde, canlı spermilerin başları beyaz şeffaftır ve ölü spermilerin başları kırmızı veya koyu pembe renktedir. Soluk pembe kafalı spermatozoa canlı olarak değerlendirilir.

Tek başına eozin kullanılarak yapılan sperm canlılığı testi; bu yöntem basit ve hızlıdır, ancak ıslak preparatlar kalite kontrol amacıyla depolanamaz (WHO 2010).

Canlı spermilerin beyaz veya açık pembe, ölü spermilerin kırmızı veya koyu pembe renkte başları vardır. Boyanma, boyun bölgesinin sadece bir kısmı ile sınırlıysa ve baş bölgesinin geri kalan kısmı boyanmamışsa, bu hücreler canlı olarak değerlendirilmelidir. Soluk pembe renkteki boyanmayı ayırt etmek zor ise, arka planın kontrastını artırmak için nigrozin kullanılmalıdır (WHO 2010).

Hipoozmotik şişme ile sperm canlılığı testi; Spermilerin boyanmasından kaçınıldığı durumlarda, canlılığı değerlendirmek için hipoozmotik şişme (HOS) testi kullanılabilir. Sağlam membranlı spermeler hipoozmotik ortamda beş dakikada şişer

ve kamçısall (flagellar) şekillerin tümü 30 dakika içinde stabilize olur. HOS testinde, canlı hücreler hipoozmotik ortam içersine yerleştirildiğinde, su, sitoplazmaya girer ve hücrenin şişmesine neden olur, bu test spermlere zarar vermez. HOS, sperm fertilitesi konusunda sınırlı bir kabiliyete sahiptir (Vasan 2011).

Şişmiş spermler, kuyruğun sarmal şekli alması gibi hücrenin şeklindeki değişikliklerle tanımlanır. Canlı hücreler sperm kuyruğunun şişmesi ile ayırt edilir.

1.4.4. Sperm Sayısı

Ejakulat başına toplam sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu gebelik için bir göstergedir. Toplam 'sperm sayısı' ve 'sperm konsantrasyonu' terimleri farklı kavramları tanımlamaktadır. Sperm konsantrasyonu, spermanın birim hacim başına sperm sayısını ifade eder ve salınan spermatozoa sperm sayısının, seyrelten sıvı hacminin bir fonksiyonudur. Toplam sperm sayısı, ejakulatın tamamındaki sperm sayısının toplamına karşılık gelir ve sperm konsantrasyonunu semen hacmiyle çarparak elde edilir. Sperm konsantrasyonu (birim hacim başına düşen sperm sayısı) kastedildiğinde, "sperm yoğunluğu" (birim hacim başına kitle) terimi kullanılmamalıdır (Franken ve Oehninger 2012).

Ejakülattaki sperm sayısı, semen değerlendirmesinde ölçülen spermatozoanın konsantrasyonundan hesaplanır. Normal ejakulat için, erkek ürme kanallarında tıkanıklık yoksa ve pehriz süresi kısaltıldığında, verilen örnekteki toplam spermatozoa sayısı testis hacmi ile korelasyon gösterir. Buda, üreme kanallarının açık ve testislerin spermatozoa üretme kabiliyetinin olduğunu gösterir. Spermatozoa konsantrasyonu, fertilizasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir (WHO 2010).

Likefiye olmuş, iyi karıştırılmış, seyreltilmemiş bir semem örneği cam bir lama koyulup üzeri lamelle kapatılarak, uygun dilüsyon ve sayım için uygun kameralar belirlenir. Sayım kamerası için; 100 µm (mikrometre) derinlikte hemositometre kameraları kullanılması önerilir. Sperm olarak tanımlanamayan numuneler santrifüje tabi tutulmalı ve pelet sperm varlığı açısından incelemelidir. Hemositometre kamerası ile sayım yaparken hatanın kabul edilebilir bir düşüklükte olması gerekir, çok az sperm sayılması tanı ve tedavide yanlışlığa yo açacaktır, bu yüzden alınan iki örnekte ikişer kez 200 spermlik iki alan, en azından toplam 400 sperm sayılması gerekir. Sayım hatası kabul edilemez düzeyde ise, dilüsyon hatası,

spermilerin eşit dağılması olabilir, bu durumda yeni preparat hazırlamak gerekir. Bazı durumlarda iki incelemede de sperm görülmezse santrifüj yapılır ve incelenir, buna rağmen hiç sperm görülüyor ise azospermiden şüphelenilebilir. Aşağıda sperm durumlarına göre yapılmış sınıflandırmalar verilmiştir (Vasan 2011).

Azoospermi	ejakülatta hiç sperm olmamasıdır.
Kriptoospermi	taze preparatlarda sperm olmamasına rağmen santrifüjlenmiş pellette gözlenir.
Hemospermi (hematospermi)	ejakülatta eritrositlerin varlığıdır.
Lökospermi (lökosit-spermi, piyospermi)	ejakülatta eşik değeri üstünde lökosit varlığıdır.
Nekrozoospermi	ejakülatta düşük yüzdede canlı ve yüksek yüzdede cansız spermelerdir.
Normozoospermi	alt referans limitlerine eşit veya yüksek toplam sperm sayısı, PR ve morfolojik olarak normal spermatozoa yüzdeleridir.
Oligozoospermi	alt referans limitinden düşük toplam sperm sayısıdır.
Astenoospermi	PR yüzdesi alt referans limitin altındadır.
Teratoospermi	alt referans limitinden düşük yüzdede morfolojik olarak normal spermelerdir.
Oligoastenoospermi	alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı ve ileri hareketli spermatozoa yüzdesidir.
Oligoteratoospermi	alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı ve morfolojik olarak normal spermelerin yüzdesidir.
Astenoteratoospermi	PR ve morfolojik olarak normal spermelerin yüzdesi alt referans limitlerinden düşüktür.
Oligoastenoteratoospermi	alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı, PR ve morfolojik olarak normal spermelerin yüzdesidir.
Aspermi	semenin yokluğudur.

1.4.5. Sperm Morfolojisi

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi, fertilizasyon yeteneğine sahip, morfolojik görünümü normal spermelerin tanımlanmasını sağlar. Bazı sperm morfolojisi kriterlerinin uygulanmasıyla, normal formların yüzdesi ve fertilité arasında ilişki kurulmuştur. Klinik etkileri belirlenirken morfoloji, diğer parametrelerle birlikte kullanılmalıdır. Dünya sağlık örgütü (WHO) kriterlerine göre

toplam sperm morfolojisinin en az %30'unun normal olması gerekir. (Aggerholm ve ark 2008).

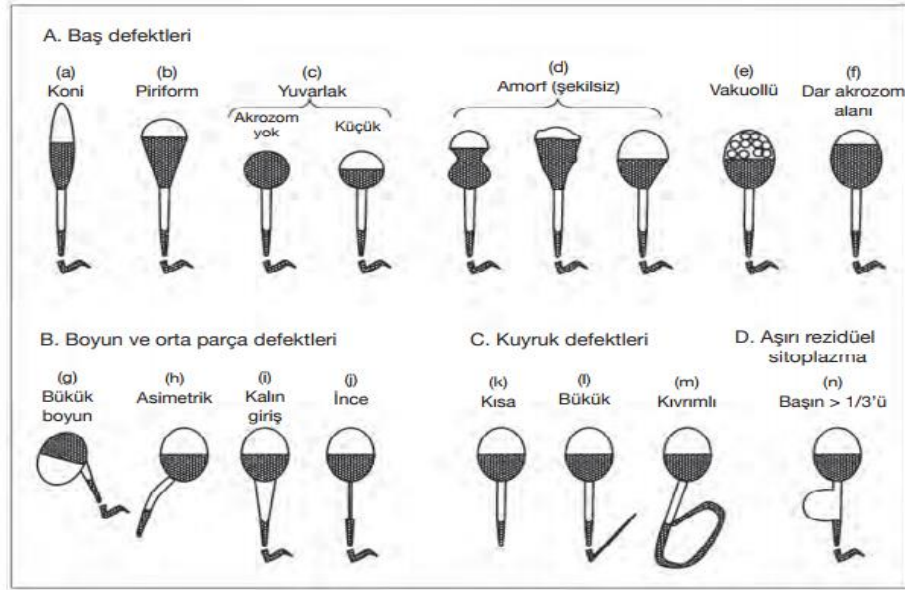
Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan Kruger kriterlerine göre normal sperm morfolojisi için sınır değeri %4 olarak kabul edilmektedir.

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi; baş, boyun, orta parça ve kuyruk kısmından oluşan sperm morfolojisinin normal kabul edilmesi için; baş bölgesinin, düzenli, sınırlı ve oval olması, akrozom bölgesinin bulunması ve akrozom dışı bölgenin vakuol içermemesi gerekir, boyun ve orta parçanın, eksenine sperm başının ana eksenine ile aynı hizada ve yaklaşık sperm başı uzunluğunda olmalıdır (WHO 2010).

Anormal sperm morfolojisi; İnsan semen örnekleri, farklı morfolojilere sahip sperm içerir. Defektif spermatogenezis, anormal şekillerdeki sperm yüzdesinin artmasıyla ilişkilidir. Anormal sperm genellikle, anomalilerin tipine bağlı olarak döllenme potansiyelinin daha düşük olup anormal bir DNA'ya da sahip olabilir. Morfolojik kusurlar genellikle karışıktır. Morfolojik kusurlara, DNA parçalanması, artmış yapısal kromozomal bozukluk, olgunlaşmamış kromatin ve anöploidi neden olabilir (WHO 2010).

Sperm morfolojisinin anormal kabul edilebilmesi için; baş bölgesinin, büyük, küçük, sivri, akrozom içermeyen bölgede vakuol olması, çift başlılık gibi kombinasyonların olması gerekir, boyun ve orta parçanın, eksenine sperm başı eksenine asimetrik bağlanması, kıvrılmış, kalın, düzensiz gibi kombinasyonları görülür (Şekil1.5.) (WHO 2010).

Aşırı rezidüel sitoplazma (ARS); bu durum, hatalı spermatogenik süreçten üretilen anormal spermatozayla ilişkilidir. Düzensiz boyanmış sitoplazma, sperm başı, boyutunun üçte biri veya daha fazlası, genellikle bozuk orta parçalar ile ilişkilidir ve anormal sperm olarak değerlendirilmelidir (WHO 2010).



Şekil 1.5. Sperm anormal morfolojiye sahip formları (WHO 2010).

1.5. ROS, Antioksidanlar ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS), bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran serbest radikal grubuna ait, oldukça reaktif oksitleyici ajanlardır. Bunlar oksijen metabolizmasından gelen yan ürünler olarak üretilen oksitleyici ajanlardır. Dış kabuktaki eşleşmeyen elektron nedeniyle, oldukça reaktif moleküller oluştururlar. ROS geniş bir radikal ve radikal olmayan moleküller [örneğin hidroksil iyonu (OH⁻), süperoksit iyonu (O₂⁻), nitrik oksit (NO), peroksil (RO₂), lipid peroksil (LOO) ve thiyil (RS⁻), singlet oksijen (¹O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂), hipoklorik asit (HOCl), lipid peroksit (LOOH) ve ozon (O₃)] toplamını temsil eder (Agarwal ve ark 2014).

ROS' un, normal hücre fonksiyonunu sürdürmek için az miktarda bulunması gerekir. Seminal plazma, oksidanlara karşı spermatozoayı korumak için bir dizi antioksidan içerir (Agarwal ve Said 2005).

Antioksidanlar, seminal plazmada ROS'un sabit halini korur. Antioksidanlar, spermatozoa'yı ROS'dan korumak için serbest radikal temizleyici olarak hareket eder. Sitoplazmik enzimlerin yetersizliği nedeniyle spermatozoa oksidatif hasarı tamir edememektedir. Çalışmalar antioksidanların androlojide yaygın bir etkisi olduğunu göstermiştir. Bunlar spermatozoa'yı ROS'dan korur, lökositler tarafından üretilen ROS'u temizler, DNA parçalanmasını önler, sigara içenlerde sperm kalitesini

iyileştirir, erken sperm olgunlaşmasını önler. Bilinen biyolojik antioksidanlar arasında, süperoksidin hidrojen peroksitle dönüşmesini katalize eden antioksidan bir enzim olan, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz (GPX, GRD) ve katalaz (CAT) önemli bir role sahiptir. Buna ek olarak, sperma, C vitamini, E vitamini, piruvat, glutatyon ve karnitin gibi enzimatik olmayan antioksidan molekülleri içerir. Bu antioksidanlar, sperm sitoplazmik enzimlerin kaybını telafi eder. SOD, kendiliğinden O_2 ve H_2O_2 oluşturmak üzere (O_2^-) anyonunu parçalarken, katalaz H_2O_2 'yi O_2 ve H_2O 'ya çevirir. SOD spontan O_2 toksisitesi ve lipid peroksidasyonu (LPO) karşısında spermatozayı korur (Agarwal ve ark 2014).

Oksidatif stres (OS), yaygın olarak ROS olarak bilinen oksijen ve oksijen türevi oksidanlardan kaynaklanan artmış hücre hasar oranı ile ilişkili bir durumdur. OS, ROS üretimi ile vücudun antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. OS erkek infertilitesinin dışında, ateroskleroz, kanser, diyabet, karaciğer hasarı, romatoid artrit, katarakt, AIDS, enflamatuvar barsak hastalığı, merkezi sinir sistemi bozuklukları, parkinson hastalığı, motor nöron hastalığı gibi birçok diğer insan hastalığının patogenezinde rol oynar (Makker ve ark 2009).

Lipidler, proteinler, nükleik asitler ve şekerler de dahil olmak üzere tüm hücresel bileşenler OS'nin potansiyel hedefleridir. OS ile oluşturulan hasarın kapsamı yalnızca ilgili ROS'un doğasına ve miktarına değil, aynı zamanda ROS maruziyeti süresine ve sıcaklık, oksijen basıncı ve çevredeki ortamın bileşimi gibi hücre dışı faktörlere de bağlıdır (örn. iyonlar, proteinler ve antioksidanlar) (Makker ve ark 2009).

1.5.1. Erkek İnfertilitesinde Oksidatif Stresin Rolü

Çiftlerin %15 ila %25'i infertilite ile mücadele etmekte ve tıbbi yardım almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kılavuzlarına göre, bu vakaların yaklaşık yarısına erkek faktör neden olmaktadır (Agarwal ve ark 2014).

Erkek infertilitesinin nedenleri arasında, patofizyolojik nedenler, hormonal ve gonadal hastalıklar, böbrek rahatsızlıkları, varikosel, kriptorşidizm, enfeksiyonlar, üreme sistemindeki obstrüksiyonlar (tıkanıklıklar), kistik fibroz gibi erkek

infertilitesinin nedenleri ile birlikte, önemli bir neden, oksidatif stres (OS) olarak kabul edilmiştir. Bu faktörler ve bozukluklar geçici veya kalıcı olarak bozulmuş spermatogenezise neden olabilir, sperm hareket yetersizliği nedeniyle kötü morfolojiye neden olur ve bunların hepsi fertilizasyon için gerekli olan sperm fonksiyonunu etkiler (Cocuzza ve ark 2007).

Oksidatif stres (OS) doğurganlık durumunu etkilemektedir ve bu nedenle son yıllarda kapsamlı olarak incelenmiştir. Spermier diğer aerobik hücreler gibi sürekli 'oksijen kullanımı' ile karşı karşıyadır. Oksijen, normal hücre fonksiyonlarının sürdürülmesi ve hayat devamlılığı için şarttır. Tersine, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi ürünler, hücre fonksiyonu ve sağkalım için zararlı olabileceği kanıtlanmıştır (Cocuzza ve ark 2007).

Oksidatif stres, vücuttaki reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar arasındaki dengesizliğin sonucudur. Sperm hasarına, deformasyonuna ve sonuçta erkek infertilitesine neden olabilecek güçlü bir mekanizmadır. Aşırı ROS üretimi veya bozulmuş antioksidan savunma mekanizmaları olduğunda, oksidatif stres (OS) oluşur ve bu da spermatozoal işlev bozukluğu ve infertiliteye yol açar (Cocuzza ve ark 2007).

Memeli spermatozoa membranı, doymamış yağ asitleri bakımından zengin olduğu için ROS saldırısına karşı çok hassastır. ROS'un küçük fizyolojik seviyeleri, sperm kapasitasyonu, akrozom tepki ve sperm-oosit füzyonu gibi normal sperm fonksiyonlarının düzenlenmesi için gereklidir, ancak ROS fazlalığı patolojik bir reaksiyona neden olarak hücre ve dokulara zarar verir. Spermatozoalar özellikle ROS'un zararlı etkilerine karşı savunmasızdır. Oksidatif stres aktivitelerini etkiler, mitokondriye ve DNA yapısına zarar verir, apoptozu hızlandırır, bu nedenle sayıları düşürür, motiliteyi ve normal morfolojinin gelişimini engeller ve fonksiyonu bozar. Bu da infertiliteye neden olur. Spermdeki ROS'un ana hücresel kaynağı olgunlaşmamış sperm hücreleri ve beyaz kan (lökosit) hücreleridir (Walczak–Jedrzejska ve ark 2013).

Spermatozoa, bozulmuş metabolizma, morfoloji ve motilite ile birlikte lipid peroksidasyonu ve değiştirilmiş membran fonksiyonuyla disfonksiyona uğrar. Lipid peroksidasyonu, hücre bütünlüğünün bozulmasına, enzimin inaktivasyonuna,

Seminal plazmada bulunan ROS, çeşitli endojen ve eksojen kaynaklardan kaynaklanmaktadır. Aşırı miktarda sigara içimi ve alkol tüketimi gibi çeşitli yaşam tarzı faktörleri, radyasyon, toksinler gibi çevresel faktörler, eksojen ROS'a katkıda bulunurken, lökositler, başta nötrofiller, makrofajlar ve olgunlaşmamış spermiler, ROS'un ana endojen kaynağı olarak kabul edilmektedir.

1.5.2. Erkek üreme sisteminde ROS kaynakları;

3. ROS üretimi, sigara içme ve kirlilik gibi yaşam tarzı faktörlerine bağlı olarak da artmaktadır. Sigara, ROS üretimini artırır, sperm DNA hasarına neden olur ve hem semende hem de serumda antioksidanları bastırır (Samant 2011).

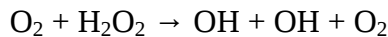
26

korelasyon gösterir. Zayıf sperm kalitesi ve artmış ROS üretimi arasındaki bağlantı, anormal sperm hücrelerinde aşırı sitoplazmik kalıntı (sitoplazmik damlacıkların) olması gösterir. Rezidüel sitoplazmayı taşıyan germinal epitelden salınan spermatozoaların olgunlaşmamış ve işlevsel olarak kusurlu olduğu düşünülmektedir. Rezidüel stoplazmanın spermatozoa'da birikimi, sitosolik enzim glikoz-6-fosfat-dehidrogenaz (G6PD) aracılı olabilecek mekanizmalar yoluyla ROS oluşumu ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bu enzim, heksoz monofosfat yan yoluyla glikoz akış hızını kontrol eder; bu da, nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) hücre içi mevcudiyetini kontrol eder, İkincisi, NADPH oksidaz olarak bilinen bir enzim sistemi ile ROS üretimini hızlandırmak için sperm hücreleri tarafından elektron kaynağı olarak kullanılır (Samant 2011).

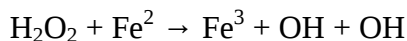
Spermatozoa iki şekilde ROS oluşturabilir:

1. Sperm plazma membran seviyesinde NADPH-oksidaz sisteminin bir sonucu olarak.
2. Mitokondriyum seviyesinde NADH-bağımlı oksidoredüktaz (difosferaz) sonucu olarak (Aitken ve ark 1992).

İnfertil erkeklerdeki spermatozoa'daki ROS'un ana kaynağı mitokondriyal sistemdir. İnsan spermatozasında üretilen primer ROS, süperoksit anyonudur (O_2^-). O_2^- 'nin bu bir elektron indirgeme ürünü, süperoksit dismutaz ile büyük ölçüde hızlandırılan bir hidrojen peroksit (H_2O_2) üretmek için kendisiyle ikili olarak reaksiyona girer. Demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığında, H_2O_2 ve O_2^- aşağıdaki denklemde gösterildiği gibi son derece tehlikeli hidroksil radikali ($OH^\bullet$) üretmek için etkileşime (Haber-Weiss reaksiyonu) girebilir.



Alternatif olarak, hidroksil radikali, eşitlikte gösterildiği gibi, askorbat veya demirli iyonlar gibi bir indirgeyici ajan gerektiren hidrojen peroksitten (Fenton reaksiyonu) üretilir:



Hidroksil radikalının lipit peroksidasyon kaskadının son derece güçlü bir başlatıcı olduğu düşünülmekte ve sperm fonksiyonlarının kaybedilmesine neden olabilmektedir (Samant 2011).

1.5.4. Lökosit tarafından reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi

Peroksidaz pozitif lökositler, semende ROS'un ana kaynağıdır, tüm seminal lökositlerin %50 ila %60'ını temsil eden polimorfonükleer lökositler (PMN) (granülosit) ve tüm seminal lökositlerin %20 ila %30'unu temsil eden makrofajları içerir. Semende peroksidaz pozitif lökositler, büyük oranda prostat ve seminal veziküller tarafından oluşturulur. Lökositlerin ROS üretme kapasiteleri, iltihaplanma ve enfeksiyon da dahil çeşitli uyaranlara yanıt olarak ortaya çıkabilecek aktivasyonlarına bağlıdır. Aktivasyon sırasında, NADPH üretimi artar ve lökositlerin miyeloperoksidaz sistemi aktive olur ve oksidatif patlamaya yol açar ve daha sonra yüksek ROS seviyeleri serbest bırakılır. Böyle bir oksidatif patlamanın, enfeksiyon vakalarında mikropları öldüren savunma olduğu düşünülmektedir (Samant 2011).

1.5.5. ROS ve Sperm Fonksiyonu

ROS, insan spermlerine karşı toksik olarak kabul edilir. Bununla birlikte, spermelerin fertilizasyon kabiliyeti kazanması için az miktarı gereklidir. Spermatozoa'nın nihai hedefi, yumurtanın başarılı döllemesidir. Bunu sağlamak için, spermatozoa erkek genital bölgede olgunlaşmalı, kadın üreme sisteminden geçmeli, kapasitasyon ve akrozom tepkime altına girmeli, yumurtalık zona pellucida zarını geçmeli ve oolemma'ya bağlanmalıdır. Düşük ROS seviyeleri insan spermlerinin zona pellucida bağlanma kabiliyetini artırabilir. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda hidrojen peroksit, sperm kapasitasyonunu, hiper aktivasyonu, akrozom tepkisini ve oosit füzyonunu uyardığını bulmuştur. Nitrik oksit ve süperoksit anyonu gibi hidrojen peroksitten başka reaktif oksijen türleri de sperm kapasitasyonu ve akrozom tepkimesini desteklediği gösterilmiştir. Teorik olarak semende hücresel hasar, aşırı ROS veya azalmış antioksidan nedeniyle prooksidanlara doğru bir kayma olan ROS üretimi ve atma aktiviteleri, yani pozitif oksidatif stres durumu (OS) arasındaki uygun denge olmamasının sonucudur (Samant 2011).

İnfertil erkeklerdeki seminal plazmada antioksidan seviyeleri önemli derecede düşüktür. Bununla birlikte, infertil erkeklerden alınan spermelerde saptanan ROS patolojik düzeyleri, muhtemelen, seminal plazmanın antioksidan kapasitesinde azalma olmaktan ziyade, artmış ROS üretiminin bir sonucudur. Memeli spermeleri, çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir ve bu nedenle, muhtemelen, aksonemal hasara yol açan hücre içi ATP'nin hızlı bir şekilde kaybedilmesi, sperm canlılığının azalması ve morfoloji defektlerinin artmasıyla, sperm motilitesinin azalmasına neden olan ROS saldırısına karşı oldukça duyarlıdır. İnfertiliteye yol açan bu ROS ile indüklenen sperm hasarının anahtar mekanizması sperm membranının lipid peroksidasyonu olarak düşünülür (Samant 2011).

1.6. Apoptozis

Klasik Yunanca'daki apoptoz terimi, ağaçlardan çiçek veya taç yapraklarından "düşme" "bırakma" ya da intihar anlamlarıyla "apoptoz" kavramların çoğunu kapsar (Weng ve ark 2002).

Apoptoz, hücrelerin gelişimi ve homeostazında merkezi bir rol oynayan geri dönüşümsüz bir olaydır. Son yirmi yılda yapılan araştırmalar, apoptozun başlatılması, uygulanması ve düzenlenmesini kontrol eden yüzlerce genin tanımlanmasına yol açtı (Yan ve Shi 2005).

Apoptoz, potansiyel olarak zararlı, sitotoksik hücre içi maddelerin artmasıyla hücre ölümüne giden yolda bir dizi aşamalı durumdan oluşur. Apoptoz sırasında olayların sırası, farklılıkları, hücre türüne ve ölüme yol açan nedene veya duruma bağlı olarak değişir. Bununla birlikte, morfolojik ve biyokimyasal benzerlikler mevcuttur ve bunlar, hücre popülasyonlarının boyutunu kontrol etmek için tasarlanan aynı biyolojik işlemin farklılıklarıdır(Weng ve ark 2002).

Apoptoz gelişme ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak gerçekleşir. Apoptoz immün reaksiyonlarda olduğu gibi hücreler hastalık veya zararlı ajanlar tarafından hasar gördüğünde de savunma mekanizması olarak görülür. Hem fizyolojik, hem de patolojik olarak apoptozu tetikleyebilecek çok çeşitli uyarı ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücrelerin aynı uyarıya tepki olarak ölmesi zorunlu değildir. Radyasyon veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarıyla

sonuçlanır ve bu da p53'e bağılı bir yol izleyerek apoptotik ölümle sonuçlanabilir (Elmore 2007).

Bazı hücreler, ligand bağlama ve protein çapraz bağlama yoluyla apoptoza yol açabilen Fas veya TNF reseptörlerini ifade eder. Ayrıca apoptozu nekrozdan ayıran, bağımsız olarak, aynı anda ortaya çıkabilen iki süreç arasında bir ayrım vardır. Bazı durumlarda, hücrelerin apoptoz veya nekrozla ölüm görülmeyeceğini belirleyen uyarı türü ve derecesi belirler. Düşük dozlarda, ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik anti kanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar apoptozu indükleyebilir, ancak aynı uyaranlar daha yüksek dozlarda nekroza neden olabilir. Apoptoz ile hücre ölümü morfolojik temelde nekrozdan farklıdır; Bununla birlikte, apoptoz, nekrotik hücre ölümü ile bazı ortak mekanizmaları paylaşmaktadır. Bir hücrenin nekroz veya apoptoz ile ölüm olmemesi kısmen hücre ölüm sinyali, doku türü, doku gelişim evresi ve fizyolojik ortamın doğasına bağlıdır. Konvansiyonel histolojiyi kullanarak, apoptozu nekrozdan ayırmak her zaman kolay değildir, uyarıcının yoğunluğu ve süresi, ATP tüketilmesinin derecesi ve kaspazların mevcudiyeti gibi faktörlere bağılı olarak aynı anda ortaya çıkabilir. Nekroz kontrolsüz ve pasif bir süreç olup genellikle geniş hücrelerin alanlarını etkilerken, apoptoz kontrollü ve enerjiye bağımlıdır, bireysel veya hücre kümelerini etkileyebilir (Elmore 2007).

1.6.1. Apoptozis Sırasında Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptozun ayırıcı morfolojik sürecini ve temel bir biyolojik süreç olarak önemi gözden geçirildi. Apoptozis sırasında nükleer değişiklikler (nükleer yoğunlaşma ve bozulma), organellerde şişme meydana gelmez, lizozomlar açığa çıkmaz ve apoptotik cisimler meydana gelir. sitoplazmik ve hücre zarı seviyelerinde hücresel değişiklik meydana gelir. Hücrenin büzülmesi ile hücrelerin boyutları küçülür, sitoplazma yoğun hale gelir. Çekirdek zarı yer yer erir, çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır. Nükleer yoğunlaşma kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve bu apoptozun en karakteristik özelliğidir (Cohen 1993).

Apoptozda nükleer değişiklikler; Apoptoz sırasında kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma meydana gelir, laminin ve aktin, iç nükleer kılıf ile ilişkili ara filamentlerdir ve çekirdek iskeletini, kromatin ile nükleer kılıfın birleştirilmesi için bir çerçeve oluşturmak üzere organize eder. Laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucu sitoplazma çekilmeye ve küçülmeye başlar, çekirdek küçülür,

kromatin yoğunlaşır. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte yoğunlaşma başlar. Apoptoz sırasında lamin ve aktin filamentlerinin ayrılması, proteoliz ile oluşur; bu da, endonükleazlara erişim sağlamak için matris bağlanma bölgelerinin serbest bırakılmasına izin vererek DNA fragmanlarının oluşumunu teşvik edebilir. Kromatinin çekirdek zarı yüzeylerine kitlelere yerleşir ve hilal şeklini alır. Hücre büzüşüp küçülmeye devam ederek içinde organların olduğu, membranla çevrili apoptotik cisimler meydana gelir (Trump ve ark 1997).

Apoptozun bu önemli özelliği, DNA parçalanması, endonükleazların aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu endonükleazlar kromatin yapısını 300 kb oligonükleozom boyutlu fragmanlarına, daha sonra 50 kb uzunluğunda daha küçük DNA parçalarına indirgemektedir (Rogalinska 2002) (Weng ve ark 2002).

Apoptozda sitoplazmik değişiklikler; Erken nükleer değişikliklerle birlikte, sitoplazma yoğunlaşma belirtileri gösterir. Sitoplazmik yoğunlaşma, yarı saydam sitoplazmik vakuoller oluşur. Toplam hücre hacminde azalma, hücre yoğunluğunda bir artış, bazı sitoplazmik organellerin sıkışması ve endoplazmik retikulumun genişlemesi, apoptoz sırasında morfolojik değişikliklere eşlik eder. Bununla birlikte, mitokondrinin apoptotik süreç boyunca bütünlüğünü sürdürdüğü gösterilmiştir. Çekirdeğin ve sitoplazmanın, 'kabarcık' olarak da adlandırılan çok sayıda, küçük membran ile çevrili apoptotik cisimlere ayrılması hücre yüzeyi üzerindeki çıkıntılar olarak görülür. Çeşitli boyut ve sayıdaki küresel veya ovoid şekillerdeki bu zarla kaplı apoptotik cisimler ya epitelyal yüzeylerden lümene ekstrüzyon (dışarı atım) yapılırlar ya da çevreleyen makrofajlar tarafından fagositize edilir. Hücrelerde apoptoz sırasında hücresel modifikasyonlardan biri, mikrotübüllerin ve mikrofilamentlerin bulunduğu hücre iskeletinde meydana gelir. Protein kinaz C tarafından aktive edilen aktin filamentlerinin ayrılması apoptotik cisim bulunan küçük parçalara ayrılma işlemi için gerekli olduğu görülmüştür. Apoptoz, gelişmiş transglutaminaz (TG) Enzimi aktivitesi ile de ilişkilidir ve Ca^{+2} varlığında bu enzim, bu apoptotik cisimlerde proteinlerin çapraz bağlanmış iskeletini üreten reaksiyonu katalize eder (Brooks 2005).

Apoptozda hücre membranındaki değişiklikler; apoptoz sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında bir dizi biyokimyasal değişimler olur. Bu

değişikliklerden biri, makrofajların apoptotik hücelere bağlanmasında rol oynayabilen apoptotik hücrenin plazma membranında karbonhidratların değiştirilmesidir. Apoptotik hücrelerin indirgenmiş anyonik yükleri vardır, bu da terminal sialik asit kalıntılarının kaybedilmesi anlamına gelir, böylece glikoprotein yan zincir şekerler ortaya çıkar. Bu hücreler, fagositik hücrelerin hızla tanınmasını ve çıkarılmasını sağlayan hücre yüzeyi belirteçlerini gösterir. En belirgin değişim normalde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfatidilserin (PS) birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucunda kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır. Ayrıca normalde hücre zarında gizlenmiş olan N-asetil glikozamin molekülleri apoptozda açığa çıkarlar ve makrofajlar tarafından tanınırlar. Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik membran değişimlerinden biri de hücre içeriklerini içine alan ve membranla çevrili veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu küçük veziküller apoptotik cisim olarak da adlandırılırlar. Bu değişimler apoptotik sürecin sonlarına doğru görülür. Başka bir mekanizma makrofajlar tarafından trombospondin (TSP) trombositler (birleştirici özellik gösteren glikoproteindir) sekresyonunu, apoptotik plazma membranı ve makrofaj membranı arasında bir moleküler köprü oluşturmayı içerir. Bu oluşumlar, apoptotiklerin tanınması ve ortadan kaldırılmasında önemli rol oynar (Yan ve Shi 2005).

1.6.2. Apoptoz Uyarımının Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları, enerjiye bağlı oldukça karmaşık moleküler olay dizisinden oluşur. Apoptozu aktive etmek için hücre tipine göre çeşitli yollar vardır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar, iki ana apoptotik yol olduğuna işaret ediyor: ekstrinsik veya ölüm reseptörü yolu ve intrinsik veya mitokondriyal yol. Bununla birlikte, iki yolun birbirine bağlı olduğunu ve bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Igney ve Krammer 2002).

T lenfosit hücresinin aracılık ettiği perforin-granzim'e bağlı olarak hücrenin öldürülmesini içeren ek bir yol vardır. perforin-granzim yolu, ya granzim B ya da granzim A aracılığıyla apoptozu indükleyebilir. Ekstrinsik, intrinsik ve granzyme B yolları aynı yürütme yolunda birleşir. Bu yol, kaspaz 3'ün bölünmesi ile başlar ve DNA parçalanması, nükleer proteinlerin bozunması, proteinlerin çapraz bağlanması,

apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından alınması ile sonuçlanır (Elmore 2007).

1.6.3. Ekstrinsik ve Reseptör Bağlantılı Yol

Apoptozun dış yolu, spesifik ligandlar tarafından başlatılan apoptoz sinyallerini ileten ölüm reseptörleri (hücre yüzeyi reseptörleri) vasıtasıyla oluşur. Apoptozu başlatan ekstraksiyon sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesinin üyesi ölüm reseptörleri içerir (Locksley ve ark 2001).

TNF reseptör ailesinin üyeleri yaklaşık 80 aminoasit içeren alana sahiptir. Bu ölüm alanı, sinyalin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. TNF ailesi reseptörleri TNF-R1/CD120a, TNF-R2, DR3/Wsl1/Tramp, DR4/Trail-R1, DR5/Trail-R2, CAR-1 ve Fas (CD95/APO1) reseptörüdür. TNF ailesi reseptörlerinin dış kısımları ligant bağlanması için önemlidir (Elmore 2007).

Apoptozun ekstrinsik fazını tanımlayan olayların dizilimi, FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleriyle en iyi şekilde karakterize edilir. Bu modellerde reseptörlerin ligand ile bağlanması vardır. Ligand üzerindeki alıcılara karşılık gelen ölüm alanlarına sahip olan sitoplazmik adaptör proteinleri ile ligant bağlanma gerçekleşir. Ligand fas reseptörüne bağlanması, tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleksi oluşturur. Bu kompleks, TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD) denen adaptör proteinlere bağlanır. Fas ligandı (FasL) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi bazı hücre yüzeyi moleküllerinin uyarılması, genellikle apoptoz ile hücre ölümünü indükleyerek hücreleri birkaç saat içinde öldürebilir. FADD, ölüm efektör alanının dimerizasyonu yoluyla prokaspaz 8 ile ilişkilidir. Bu reseptör-ligand kompleksi, daha sonra proteaz alanının kendiliğinden aktivasyonunu indükleyebilen bir öncü enzim olan kaspaz 8 (FLICE/MACH) için tanıma molekülü haline gelir. Kaspaz 8'in alınması proteolitik aktivitenin kendiliğinden aktifleşmesine ve interlökin-1 β -dönüştürücü enzim (ICE) proteaz kaskadının tetiklenmesine neden olabilir. Daha sonra kaspaz 8'i aktive etmek ve apoptozu indüklemek üzere bir yolda FADD kaspaz 8, ölüm reseptörleri sinyalinde tanımlanan başlıca başlatıcı kaspazdır (Elmore 2007).

1.6.4. İnterinsik veya Mitokondri Aracılı Apopitotik Yol

Mitokondriyum, sitokrom c salınımıyla apopitozun teşvik edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İçsel yol, büyüme faktörü yoksunluğu ve DNA hasarını içeren stres uyarımları tarafından tetiklenir. Bu yol, apopitoz sırasında mitokondriden gelen iç mitokondriyal zarın dış yüzeyi üzerindeki bir proteinin (sitokrom c) salınmasını içerir. Apopitoz sırasında mitokondriyal intermembrandan salınan diğer mitokondriyal proteinler Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi'dir. Bu proteinler kaspaza bağımlı mitokondriyal yolu aktive eder (Elmore 2007).

Sitokrom c, iç mitokondrial transmembran potansiyelinde bir düşüş nedeniyle serbest bırakılır. Kaspaz 2, hücre sitoplazmasında sitokrom c ve diğer apopitojenik faktörlerin salınımını indükleyerek mitokondriye bağlı apopitotik yola girer. Bcl-2 ailesine ait proteinler, membranın geçirgenliğini ve sitokrom c'yi düzenlediği görülmektedir. Serbest bırakıldıktan sonra sitokrom c, diğer sitozolik protein faktörleri, apopitotik proteaz aktivasyon faktörü-1 (Apaf-1), prokaspaz 9 ve kaspaz 3'ü aktive etmek için ATP veya dATP'den oluşan bir altbirim oluşturur. Sitokrom c ve dATP'nin etkisi, apopitozom oluşturmak için Apaf-1 proteininin yapısal olarak bir değişimine neden olur. Kaspaz 9, mitokondriye bağlı apopitoz için başlatıcı kaspazdır. Apaf-1, ATP/dATP'ye bağlanır ve onu sırasıyla ADP'ye veya dADP'ye hidroliz eder, sonuçta Apaf-1/sitokrom c kompleksinin oluşumuyla sonuçlanır. Apaf-1 ve bir bölgede konformasyonel bir değişiklik meydana gelir; kaspaz istihdam alanı (CARD), kaspaz 9'un homofilik bağlanmasına izin vererek bırakılır. Böylece, bu kompleks prokaspaz 9'u görevlendirir ve etkinleştirir ve aktive edilmiş kaspaz 9 kompleksden serbest bırakılarak aşağı doğru kaspazlar olan kaspaz 3,6 ve 7'yi açar ve etkinleştirir (Joza ve ark 2001).

İnterinsik veya dışsal apopitotik yollar yoluyla apopitozun indüklenmesi, gözlenen tipik morfolojik değişikliklere yol açan anahtar hücre proteinlerinin bölünmesinden sorumlu efektör kaspazlarının aktivasyonuna yol açan olayların bir kaskatını aktive eden bir başlatıcı kaspazın aktivasyonu ile sonuçlanır. Kaspaz 8 ve kaspaz 10 ölü reseptör aracılı apopitozda başlatıcı kaspazlarken, kaspaz 9 mitokondriye bağlı apopitozda başlatıcı kaspazdır. Bu yollar bir temel açıdan farklıdır: tanımlanmış zar alıcıları yoluyla çalışan bir dizi ligand tarafından desteklendiğinden dışsal bir yol, diğeri, efektör enzimlerin aktivasyonunun hücre içi

değişiklikler tarafından indüklendiği, mitokondriyi içeren bir iç sistemdir (Brooks 2005).

1.6.5. Apoptoz Düzenleyiciler

Apoptoz sinyal yolağının aktivasyonu çeşitli düzenleyici faktörlere tepki olarak gerçekleşir. Hücre ölümünde bir dizi düzenleyici vardır ve etkileri, hücre türüne ve apoptoz uyarısına bağlı görünmektedir. Proteinlerin bcl-2 ailesi, apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve bu düzenleyicilerin bazılarını kısaca genel bir bakış sunulacaktır. Dahası, intrinsek apoptoz yolu boyunca p53'ün düzenleyici rolü gözden geçirilecektir

1.6.6. Bcl-2

Apoptozun aktifleştirilmesinde önemli bir bileşen olan bir dizi olaya katılan kaspazların aktivasyonunu içerir. Kaspazlar proteolitik kaskadın başlangıcı, Bcl-2 ailesinin apoptozun kontrolünde önemli bir rol oynadığı proteinler tarafından düzenlenir (Brooks 2005).

Bcl-2 proteini, dış mitokondriya, endoplazmik retikulum zarına ve nükleer zarfa lokalize olan bir membran proteazdır. Bcl-2 ailesi için on sekiz üye belirlendi ve (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1, Bcl-W) gibi anti-apoptotik üyeleri bir alt gruba bölündü (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim, Blk, BNIP and egl-1). Anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeler arasındaki denge, bir hücrenin apoptoze uğramış olup olmadığını belirlemede kritik önem taşır. Bu proteinler kısmen sitokrom c'nin mitokondriyal bölünmesini etkileyerek apoptozu düzenler (Elmore 2007).

Apoptozun en belirleyici regülatörleri olan Bcl-2 ailesi, apoptoz düzenleyici etkilerini esas olarak kaspazların ve nükleazların aktivasyonundan önce gelen mitokondriyal değişiklikleri düzenleyerek uygularlar. Pro-apoptotik bcl-2 proteinleri, genellikle hücre hasar veya stres sensörleri olan sitoplazmada bulunur. Hücre hasar sonrasında, antiapoptotik proteinler bulunduğu mitokondriyanın yüzeyine yerleştirilir. Proapoptik ve antiapoptotik proteinler arasındaki bu etkileşim, anti-apoptotik bcl-2 proteinlerinin normal fonksiyonunu bozmakta ve mitokondriyumda gözeneklerin oluşmasına ve intermembran boşluğundan sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin salınmasına neden olabilmektedir. Bu mediatörler Apaf-1'e bağlandığında, kaspaz 9'u aktive eder, bu da efektör

kaspazlarının kaskadını tetikleyerek nihayetinde geri dönüşsüz hücre ölümüne neden olur (Aitken ve Baker 2013).

1.6.7. P53

Onkoproteinler, DNA hasarı, hipoksi ve hayatta kalma faktörü yoksunluğu gibi içsel stresler intrensek apoptotik yolu aktive edebilir. P53, bir tümör süpresör protein olarak mitokondride bulunur ve apoptoz sürecine katkı sağlar. P53, hücrel stresin bir sensörüdür ve iç yolun kritik bir etkinleştiricisidir. P53, apoptozu, pro-apoptotik Bcl-2 aile üyelerini (bax ve bak) aktive ederek ve antiapoptotik proteinleri (bcl-XL ve bcl-2) bastırarak başlatır. Proto-apotik faktörlerin mitokondriyumdan salınması, mitokondriden sitokrom c'nin salınmasını başlatır. Bax'ın sitoplazmadan mitokondriye translokasyonu p53 aracılı apoptozda kritik bir adım olduğu için, Bax proteininin subselüler lokalizasyonunun hücrenin kaderini belirlemede önemli bir rol oynadığını bulmuşlardır. Bax konformasyonel değişikliği, mitokondriye translokasyon, sitokrom c salınımı ve mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir. Mitokondriyumdan sitokrom c'nin salınması, mitokondriyal zar üzerindeki p53 birikiminden kısa süre sonra ortaya çıkar ve apoptozomun oluşumunu indükler. Prokaspaz 9 aktive olur, bu da apoptozoma bağlanır ve ayrıca efektör kaspazlarının aktivasyonuna aracılık eder. P53 aracılı apoptozun uygulanması efektör kaspazları boyunca ilerlemektedir, bunların etki mekanizmaları deneysel içeriğe bağlıdır. Bu nedenle intrinsik yolun hem strese bağlı hem de p53'e bağlı kaspaz aktivasyonu için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Agarwal ve ark 2014).

P53 geni, testiste yüksek oranda aktif olmayan formu görüldü ve apoptoz ile ilişkili olduğu bilinmekte ve testisteki germ hücresi kaybının ana nedenlerinden biri olduğunu düşündürmektedir.

1.6.8. Kaspazlar

Kaspazlar, birbiriyle homolog olan sistein proteaz grubunun bir üyesidir. Aktivasyon sırasında, kaspazlar spesifik substratları parçalamakta ve böylece hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu ve plazma-membran bütünlüğünün bozulması gibi apoptotik hücrelerdeki tipik biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere aracılık etmektedir. Bu nedenle aktive edilmiş kaspazların

saptanması, birçok hücrede çeşitli uyarılar tarafından uyarılan apoptoz için bir biyokimyasal belirteç olarak kullanılabilir (Zhivotovsky 2003).

Kaspazlar, hem büyük (p20) hem de küçük (p10) alt birimleri içeren, preolitik yıkımla aktifleşen, aktif olmayan pro-enzimler olarak sentezlenir. Kaspazlar (32-56 kDa) birkaç alan içerir: bir N-terminal pro-alanı, büyük bir alt birim (17-21 kDa) ve küçük bir alt birim (10-13 kDa); bazı proteinlerin büyük ve küçük alt birimler arasında kısa bir bağlayıcı bölgesi vardır. Kaspaz aktivasyonu, büyük ve küçük alt birimler arasındaki spesifik bir aspartik asit kalıntı bölgesinde pro-enzim enziminin proteolitik işlenmesini içerir ve birçok durumda, pro alanlar proteolitik olarak uzaklaştırılır. Aktif bölge bir büyük ve bir küçük alt birim içeren bir heterodimer ile oluşturulur ve aktif kaspaz ile heterodimerden oluşan yapı bir tetramerdir. Bazı kaspazlar sadece kısa prodomain içerir (kaspazlar 3, 6 ve 7), diğerleri (kaspazlar 1, 2, 4, 5, 8, 9 ve 10) uzun prodomainler içerir (Cohen 1997). Yapı ve fonksiyonlarına göre insanda bulunan 11 değişik kaspaz tarif edilmiştir; başlıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar: kaspaz 1 (ICE) , 4, 5, 11, 12, 13, 14, sonuçlandırıcı (effektör) kaspazlar: kaspaz 3 (CPP32/Yama), 6, 7, Başlatıcı (initiatör) kaspazlar: kaspaz 2, kaspaz 8 (FLICE/MACH), 9, 10 (Zhivotovsky 2003).

Apoptozda rol alan kaspazlar, etki mekanizmaları ile alt sınıflara ayrılmıştır. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve 9) veya yürütücü kaspazlardır (kaspaz 3, 6 ve 7). Kaspazlar, yalnızca apoptotik hücre ölümünde önemli bir rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda bir (inflamatuvar kaspazlar) mikrobik patojenlere karşı bağışık yanıtlarla ilişkilendirilir. Kaspaz 1 ve kaspaz 5 gibi inflamatuvar kaspazların aktivasyonu, inflamazom olarak adlandırılan bir hücre içi kompleksin kurulması üzerine oluşur (Martinon ve Tschopp).

Apoptotik süreç boyunca devamlı hücre içine kalsiyum (Ca) girişi olur.

Bcl2 ailesi; apoptozu indükleyen: Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs, mitokondriyi etkiler ve sitokrom-c sitoplazmaya salınır. apoptozu inhibe eden: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 Mitokondriyi etkiler ve sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınması baskılanır. Bcl-2 ailesinin arasındaki denge apoptozu belirler. Bcl-2 geni, ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bcl-2, özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bcl-2 ailesinden

Bax sitozolde bulunur. Apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır. Burada küçük delikçikler (pore) oluşumunu indükler. Böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur. Sonuçta sitokrom c ve apoptozis indükleyici faktör (AIF)'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Bax ekspresyonunu arttırınca Bcl-2/Bax oranı değişir ve p53 apoptozisi indükler.

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan, bir elektron transport zinciri proteindir. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi, apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geriye dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder.

Sitokrom c, Apaf-1 (Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör -1:sitoplazmik bir proteindir)'i aktive eder ve sitokrom c ve Apaf-1, prokaspaz 9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürür, oluşan bu komplekse apoptozom adı verilir. Aktif kaspaz-9 efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder,

Aktifleşen kaspaz 3, normal hücrelerde bulunan ve kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir ve ICAD'ünün bağlı olduğu kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir. Bu da kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olur (Imawati Budihardjo ve ark 1999).

Hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması FasL (fas ligand)'nin Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik süreç başlar. Bu mekanizma tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. Fas'ın ölüm alanını içeren sitoplazmik uzantısı (FADD) ve reseptör protein (RIP) ile etkileşime girer. Ölüm alanlarını içeren bu proteinler prokaskaz 8'i aktif kaspaz 8'e dönüştürür, aktifleşen kaspaz 8 ya doğrudan prokaspaz 3'ü aktifleştirir veya sitokrom-c salınmasını sağlayarak prokaspaz-9'u aktifleştirerek apoptozu başlatır (Li ve ark 1998).

Kaspaz aktivasyonu her hücreye özgü bir oluşumdur. Kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir.

1.6.9. Spermatogenez ve Apopitoz

Spermatogenez, testise ait seminifer tübüllerde gerçekleşen kök spermatozoonun olgun spermatozoaya dönüşmesi için dinamik ve senkronize bir süreçtir. Bu süreç spermatogonya'nın mitotik gelişimini ve bunların spermatoositlere diferansiyasyonunu, ardından spermatidlerin ve olgun spermatozoa'nın oluşmasını içerir (Shaha ve ark 2010). Germ hücreleri ile sıkı temasta bulunan Sertoli hücreleri, germ hücreleri için yapısai, besleyici ve destek sağlayarak spermatogenezii kolaylaştırır. Germ hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması,  n hipofiz bezi, yani folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormonun (LH) salınmasına bağlıdır. Bu hormonların çıkarılması dolaylı yolla germ hücreli apopitozu uyarır (Russell ve ark 2002).

V c ttaki birçok dokuda olduğu gibi, testisin seminifer t b l ndeki hücrelerin sayısı, hücre proliferasyonu ve apopitotik hücre ölümü arasındaki dinamik dengeye göre belirlenir. Uyarıcılar (intratestiküler testosteron ve gonadotropinlerin yoksunluğu, sertoli hücre toksik maddeleri, kemoterapötik ilaç, vb.) nedeniyle spontan ve artan hücre ölümü, apopitoz yoluyla ortaya çıkar. Apopitoz, seminifer tübüllerden hasar gören germ hücrelerini gidermek için bir mekanizma olarak kullanılır, böylece spermlere ayrılmaya devam etmezler. Hasar görmüş germ hücrelerinin seçici olarak silinmesi belli bir türün genomunu korumak için kullanılan mekanizmaların kritik bir bileşenidir (Russell ve ark 2002).

Germ hücresi apopitozunun, anormal germ hücresini ortadan kaldırmak için, germ hücresi ile sertoli hücre oranını korumak için, kan testis bariyeri oluşumunun aşırı germ hücrelerinin yok edilmesini gerektirdiği için, germ hücresi apopitozunda apopitotik bir artış meydana geldiği açıklanmıştır. Testiküler germ hücre apopitozisi fizyolojik olarak hayat boyu meydana gelir. Spermatozoonun yaklaşık %75'i, olgunla madan önce programlanmış hücre ölümü sürecinde ölür (Aitken ve Baker 2013).

Apopitozun, spermatoositlerde sıklıkla, spermatogonia'da daha az görülürken, spermatidlerde nadiren gözlendiği gösterilmiştir. Özellikle spermatoositlerde testisteki insan germ hücrelerinde apopitoz varlığı Fujisawa ve ark. tarafından bildirilmiştir. Apopitoz sürecinin, inflamatuvar germ hücrelerinin yok edilmesi ile testiküler homeostazı sağladığı sonucuna varılmıştır. Olgun sperm gelişimi, germ hücresi

çoğalması, farklılaşma, kendini yenileme ve apoptozun kontrol edildiği kesin olarak düzenlenmiş bir olay sekansının ürünüdür (Brooks 2005).

Sperm ve apoptozis; sperm apoptozu ile ilgili tartışmalar, apoptotik spermlerin zayıf fonksiyonel aktiviteye sahip olup olmadığı veya aslında spermiyogenezis sırasında olgunlaşmayı tamamlamada başarısız olan sperm olup olmadığı konusunda belirsizlik olduğu için tartışmalı bir konu olmaya devam etmektedir. Birçok araştırmada, insan sperminde olası apoptozisin ortaya çıktığı gösterilmiştir (El-Melegy ve Ali 2011).

1.7. Sperm DNA Yapısı

Sperm genetik materyali, nükleer kromatini oldukça kararlı ve kompakt tutan özel bir tarzda yapılandırılmıştır. Somatik hücrelerde kromatinin (DNA ve nükleer proteinler) gevşek yapısının aksine, sperm kromatin DNA ile sperm çekirdeği arasındaki benzersiz ilişkiler nedeniyle yapısı sıkıdır. Spermatogenezin ileri aşamalarında, spermatid çekirdeği yeniden şekillendirilir ve yoğunlaştırılır, bu, histonların geçiş proteinleri ve daha sonra protaminler tarafından yer değiştirmesi ile ilişkilendirilir. DNA iplikçikleri sıkıca protamin moleküllerinin etrafına sarılır (protamin başına yaklaşık 50 kb DNA), sıkı ve yüksek oranda organize döngüler oluşturur. Sistein bakımından zengin protaminler arasındaki intramoleküler disülfid çapraz bağları, sperm çekirdeğinin kompaksiyonundan ve stabilizasyonundan sorumludur. Bu nükleer kompaksiyonun sperm genomunu oksidasyon veya sıcaklık yükselmesi gibi dış streslerden korumak için önemli olduğu düşünülmektedir (Zini ve Libman 2006).

Mevcut anlayış, sperm kromatininin protaminlerle sıkı bir şekilde paketlenildiği, ancak DNA'nın %15'ine kadarının histonlarla spesifik DNA sekanslarında paketlenildiğini (histonlar ve DNA dizileri arasında tesadüfi olmayan bir ilişki vardır) anlıyoruz. İnfertil erkekler, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, artmış bir sperm histonuna ve protamin oranına sahiptir. Nükleer histon fazlalığı (>%15) kötü kromatin sıkışmasına ve bunun ardından dış streslere karşı duyarlılığın artmasına neden olur (Agarwal ve Said 2003).

Sperm DNA'sının büyük bir kısmı çekirdekte olmasına rağmen, küçük bir kısmı mitokondriyal kökenlidir (sperm orta parçası içinde). Sperm mitokondriyal

DNA, proteinlere bağı olmayan küçük, dairesel bir DNA'dır. Mitokondriyal DNA yüksek bir mutasyon oranı sergilemektedir. Sperm motilitesi, sperm orta parçasındaki mitokondriyal hacim ile ilişkilidir ve mitokondriyal DNA'daki mutasyonlar veya delesyonlar azaltılmış sperm hareketliliği ile ilişkilendirilmiştir. Mitokondriyal DNA'nın kalıtımı esasen maternal olmasına rağmen, mitokondriyal DNA mutasyonlarının paternal yoluyla aktarımı bildirilmiştir (kalıtımın %1'den fazla olmadığı). Mitokondriyal DNA incelemesi, özellikle yardımcı üreme teknolojileri ile ilişkili olarak erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde bir miktar önem kazanabilir (Schulte ve ark 2010).

İnsan sperm DNA'sındaki hasarın üreme sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebileceğini ve infertil erkeklerin spermlerinin fertil erkeklerin spermlerine kıyasla DNA hasarının çok daha fazla olduğunu gösteren klinik bulgular vardır (Schulte ve ark 2010).

1.7.1. Sperm DNA Hasarı

Göz önüne alınması gereken birkaç farklı sperm kromatin anormalliği vardır; tek sarmallı veya çift sarmallı DNA iplikçik kırıkları şeklinde DNA fiziksel bütünlüğünün zarar görmesi, histonla protamin dönüşümünü ve ardından DNA sıkışmasını engelleyebilecek nükleer protein kusurları, değiştirilmiş üçüncül kromatin konfigürasyonuna neden olan kromatin yapısal anormallikleri, çevresel stres, gen mutasyonları ve kromozom anormallikleri, spermatogenez sırasında ortaya çıkan biyokimyasal olaylar, doğurganlıkla uyuşmayan anormal kromatin yapısına neden olabilir. Spermatozoan DNA hasarını belli bir noktaya kadar onarabilir, bununla birlikte, sperm DNA hasarı çok kapsamlı olduğunda, kapasitesi olmayabilir ve hasarlı olarak gelişebilir, spermatogenez duraksayabilir veya hücre ölümü gerçekleşir (Schulte ve ark 2010).

Ayrıca mitokondriyal DNA (mtDNA), delesyonlar, nokta mutasyonlar ve polimorfizm gibi anomaliler semen kalitesi, motilite'yi etkileyerek erkek infertilitesiyle ilişkilendirilir (Schulte ve ark 2010).

1.7.2. Sperm DNA Hasarı Nedenleri

İnfertil erkekler, sağlıklı erkeklere göre DNA hasarlı spermere sahiptir ve bu durum üreme sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebilir. Fertilizasyonun ve bunun

sonucunda ortaya çıkan gebelik sürecinin tamamlanması için DNA bütünlüğüne ihtiyaç vardır. Protamin eksikliği ve reaktif oksijen türlerinin etkisi, sperm DNA hasarının etiolojisinde rol oynar. Sperm DNA hasarı, erkek infertilitesi (anormal spermatogenez) ile açık bir şekilde ilişkilidir, erkek infertilisinde DNA hasarının birçok nedeni vardır, sigara ve çevresel toksinler, varikosel, yaş, radyasyon, ilaçlar, kemoterapi, alkol, kafein ve spermatozoonun saklanması, santrifüj, spermatozoonu semenden ayırma yöntemleri, ROS'a maruz kalması, hormonal faktörler, testiküler hipotermi nedenleri arasında sayılır (Zini ve Libman 2006).

1.7.3. Sperm DNA Hasar Testleri

Sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmek için geliştirilen testler artmaktadır. Bu deneylerde sperm DNA bütünlüğünün değerlendirildiği mekanizmalar analizler farklı ilkelere dayanır.

Asidik Anilin mavisi boyaması testi; anilin mavisi, proteinler için afiniteye sahip olan asidik bir boyadır. Bu boya lizinden zengin histonlar ile protaminlerin ayırımında kullanılır, lizinden yoksun protaminli nukleus anilin mavisi, lizinden zengin histon bulunduran nukleusu mavi renkte boyayacaktır. Teknik, basit, ucuzdur ve analiz için basit bir parlak alan mikroskobu gerektirir (Shamsi ve ark 2011).

Toluidine mavisi boyaması testi; toluidin mavisi (TB) sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan temel bir boya maddesidir. Gevşek biçimde paketlenmiş kromatin veya bozulmuş DNA'ya sahip sperm DNA hasarını gösterir. Böylece, ışık mikroskobu kullanarak, hasar görmüş sperm mavi renk olurken, normal sperm mavi renksiz kalır (Schulte ve ark 2010).

Sperm kromatin yapı tahlili (SCSA) testi; SCSA 25 yıl önce tanımlanmıştır. Anormal kromatin yapısına sahip sperm DNA'sı asit veya ısı denatürasyonuna daha yatkındır. Akridine orange (AO) metakromatik özellikleri ile flow sitometrik incelemesi esasına dayanır kullanarak, SCSA in situ asit kaynaklı denatürasyon sperm DNA duyarlılığını ölçer. SCSA tarafından tesbit edilen DNA hasarı DFI (DNA fragmentasyon indeksi) ile açıklanır (Schulte ve ark 2010).

Akridin oranj testi (AOT); DNA denatürasyonunun derecesini belirlemek için AO'nun yeşil renkten kırmızıya metakromatik kaymasının kullanıldığı SCSA'ya benzer ilkelere dayanır, floresan mikroskobunda görsel olarak

yorumlanabilir. Bununla birlikte, belirsiz renkler, hızlı solma ve heterojen boyama konuları görsel yorumlama sırasında zorluklara neden olabilir.

TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) testi; TdT (terminal deoksinnükleotidil transferaz) enziminin katalizlediği reaksiyonda tek ve çift zincirli DNA'da, kırılmaların doğrudan bir kantifikasyonudur. dUTP (deoksiuridin trifosfat), TdT enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyonda tek sarmallı ve çift sarmallı DNA kopmalarına dahil edilir. dUTP'ye dayanan DNA kopmaları etiketlenir ve parlak alan veya floresan mikroskop, akış sitometrisi kullanılarak ölçülebilir. Sperm TUNEL pozitif veya negatif olarak sınıflandırılır ve toplam sperm yüzdesi olarak ifade edilir (Shamsi ve ark 2011).

Yüksek performanslı likit kromatografi testi; oksidatif stres için bir biyolojik belirteç olan, oksidatif DNA hasarına özgün, yan ürün olan 8-OHdG (8-hidroksideoksi guanozin) seviyesini ölme prensibine dayanır (Shamsi ve ark 2011).

İn situ-nick translasyon (NT) testi; in situ nick translasyon (NT) tahlili, dUTP'nin DNA kırılmalarının incelendirmesi bakımından TUNEL tahliline benzerdir. Bununla birlikte, hem tek sarmallı hem de çift sarmallı DNA kopmalarını tanımlayan TUNEL'in tersine, in situ NT testi, şablona bağımlı enzim olan DNA polimeraz I tarafından katalize edilen bir reaksiyonda tek sarmallı DNA kopmalarını tanımlamaktadır. Gerçekleştirilmesi diğer testlerle karşılaştırıldığında nispeten basit bir testtir, duyarlılıktan yoksundur (Shamsi ve ark 2011).

COMET (Cluster Of Motifs E-value Tool) testi; tek hücreli jel elektroforezi (Comet) testi, sperm DNA kırılmalarının doğrudan değerlendirilmesi için bir başka testtir. Yoğunluğu azalmış sperm, bir agaroz jelinde süspansiyona alınmış, elektroforetik gradyansa tabi tutulur, floresan DNA bağlayıcı boya ile boyanmış ve yazılım ile görüntülenmiştir. Düşük molekül ağırlıklı DNA, hem tek sarmal hem de çift sarmallı DNA'nın kısa fragmanları, elektroforez esnasında kuyruklu yıldız şeklinde göç eder. DNA'nın yüksek molekül ağırlıklı bozulmamış bölümleri göç etmez. Görüntüleme yazılımı, kuyruklu yıldızın, kuyruk uzunluğunu ve kuyruk yoğunluğunu ölçmek için kullanılır; bunlar yüksek düzeyde DNA sarmal kırılmalarıyla spermde artar (Shamsi ve ark 2011).

Sperm kromatin dağılım yöntemi (SCD) testi; doğrudan sperm DNA parçalanmasıyla bağlantılı indüklenmiş yoğunlaşma üzerine kuruludur. Hasarsız sperm, bir slayt üzerinde bir agaroz jel içine daldırılır, denatüre etmek için bir asit çözeltisi ile muamele edilir, daha sonra proteinleri çıkarmak için bir liziz tamponuyla muamele edilir. Parçalanmamış DNA'lı sperm DNA halkalarını serbest bırakarak büyük halolar oluşturur. Bununla birlikte, çok küçük bir halo üreten veya hiç halo üretmeyen sperm DNA parçalanması içerir. Parlak alan mikroskopunda görselleştirme için Wright'ın boyası veya floresan mikroskobu altında görselleştirme için uygun bir floresan boya kullanılır (Schulte ve ark 2010).

Kromomisin A3 (CMA3) boyama testi; CMA3, GC bakımından zengin sekanslar için spesifik olan bir florokromdur ve protamin ile DNA'nın bağlandığı yerde DNA ile etkileşime girer. Boyamanın boyutu, olgun spermatozoa'nın protaminasyon derecesine bağlıdır. Bu nedenle CMA3 boyamasının daha yoğun olması protamin eksikliğini veya anormal kromatin paketlemeyi gösterir. Kromomisin A3 boyaması bir floresans mikroskobu gerektirir ve ucuz ve basittir. Bu talilin en önemli sınırlılığı, sınıflandırma gruplarının oluşturulmasında gözlemciler arası farklılıklar olabilir (Schulte ve ark 2010).

1.8. Oksitadif Stres ve DNA Hasarı

İki faktör sperm DNA'sını oksidatif strese karşı korur; sperm DNA'sının karakteristik sıkı paketlenmesi ve seminal plazmada bulunan antioksidanlardır.

Sperm çekirdeğindeki kromatin, baz değişikliklerine ve DNA parçalanmasına yol açan oksidatif hasara karşı savunmasız olduğu bildirilmiştir. İnsan spermlerinin kromatinleri oldukça yoğunlaşmış ve organize bir yapıya sahiptir. Spermilerin ROS'a maruz bırakılması, DNA hasarına, parça kaybına, çerçeve kaymalarına, DNA çapraz bağlarına ve baz tekrarına neden olur. Oksidatif stres aynı zamanda tek ve çift sarmal DNA kırılmalarının yüksek frekanslarıyla ilişkilidir. ROS, proteinler ve DNA'daki kritik SH gruplarının oksidasyonunu da uyarabilir. ROS aynı zamanda nokta mutasyonlar ve polimorfizm gibi çeşitli gen mutasyonlarına neden olabilir ve bu da spermin kalitesinin düşmesine neden olur. Denatürasyon ve DNA baz çiftli oksidasyon gibi diğer mekanizmalar da söz konusudur. DNA oksidasyonunun ortak bir yan ürünü olan 8-OHdG (8-hidroksideoksi guanozin), oksidatif DNA hasarının

önemli bir biyolojik belirteci olarak kabul edilmektedir (Maneesh ve Jayalekshmi 2006).

DNA hasarının derecesi küçük olduğunda, spermatozoa kendini tamir edebilir ayrıca, oosit, hasar görmüş DNA spermatozoa'sını da tamir edebilmektedir. Oosit tamir mekanizmalarının DNA hasarını onarmak için yeterli olmadığı durumlarda, embriyo gelişmez ya da implantasyon başarısız olabilir. Diğer durumlarda, oosit, ilk bölünmenin başlatılmasından önce sperm DNA-iplikçik kırıklarını başarıyla onarabilir ve böylece normal embriyo oluşur. Yapısal kromozomal sapmaların% 80'nin insanlarda erkek kökenli olduğu bildirilmiştir. Sperm örneklerinin yüksek hasar görmüş DNA içeren infertilite vakalarında, dölleme oranlarını, embriyo bölünmesini ve kalitesini düşürdüğü bildirilmiştir. Y kromozomundaki DNA hasarlarına ve gen delesyonuna neden olabilir (Agarwal ve ark 2014).

1.9. Oksidatif Stres ve Apoptoz

Apoptoz, bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilen doku hasarına karşı inflamatuvar olmayan bir cevaptır. Anormal spermatozoa'nın ortadan kaldırılmasına yardımcı olur ve böylece Sertoli hücrelerinin kapasitesini korur.

Yüksek ROS seviyeleri iç ve dış mitokondriyal membranları bozarak kaspazları aktive eden ve apoptozu indükleyen mitokondriden sitokrom-c proteininin salınmasına yol açar. Hücre kültürlerinde H₂O₂'nin apoptozu indüklediği bulgusuna dayanarak, apoptoz için ROS'a bağlı bir yol önerilmiştir. Spermdeki apoptoz, hücre yüzey proteini Fas'ı (Fas, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin bir üyesi) içeren ROS'dan bağımsız yollarla başlatılabilir (Maneesh ve Jayalekshmi 2006).

Mitokondrinin ROS'a karşı maruz kalması, DNA parçalanmasına yol açan apoptozu tetikleyen faktörün (Apaf-1) salınmasına neden olur. ROS ile artmış sperm hasarı, sitokrom c, kaspaz 9 ve 3 arasında, pozitif bir korelasyon bulunmuştur (Makker ve ark 2009).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Örnek toplama

Semen örneklerinin toplanması işlemi için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliniği'ne ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Konya Eğitim Araştırma Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliniği'ne infertilite şikayeti ile gelen, spermiogram testi yapılan, sigara ve alkol kullanmayan, operasyon geçirmeyen, kemoterapi, radyoterapi gibi bir tedavi almayan, sperm parametrelerini değiştirdiği bilinen başka bir neden olmaksızın, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) VKİ kriterlerine göre obez sınıfına giren 20 birey ile, normal kilolu sınıfına giren 20 (kontrol grubu) birey, çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul eden, 25-40 yaş aralığında bulunan erkek bireyler arasından seçilmiştir.

Azospermik bireyler mikroskopik inceleme ile tespit edildikten sonra çalışma dışında tutulmuştur.

2.2. Semen Analizi

Örnekler steril kaplara, 3-5 günlük cinsel perhiz süresi ardından mastürbasyon yolu ile alınmıştır. Semen örnekleri numune kabına alınarak ilk beş dakika içerisinde, likefaksiyon işlemi için, oda sıcaklığında veya inkübatörde (37°C) 30-60 dakika bekletilmiştir.

Semen örnekleri likefiye olduktan sonra; renk, koku, görünüm, vizkosite ve likefaksiyon süresi, hacmi ve pH değerleri kaydedildi, ardından 100X büyütme ile mikroskopik analizi yapıldı.

WHO standartlarına göre obez ve normal kilolu bireyler ayrıldı, her bir semen örneği için, Makler Chamber kullanılarak, 20X objektifte faz kontrast mikroskopunda (Olympus, CX31), üç farklı kare sayılıp, ortalaması alınarak konsantrasyon belirlendi ve motilite yönünden değerlendirildi.

Motilite değerlendirilmesi üç gruba ayrılarak yapıldı;

İleri hareket (progresif motilite; PR): hızdan bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir çevrede aktif sperm hareketleri.

Yerinde hareket (nonprogresif motilite; NP): ilerlemenin yokluğu, yani küçük dairelerde yüzme, başı zorla yerinden oynatan kamçısal kuyruk hareketi veya sadece kuyruğun kamçı hareketi gözlemlenebilir.

Hareketsizlik (immotilite; IM): hareketin olmaması.

Eozin-Y kullanarak sperm canlılığı (vitalite) testi yapıldı, likefiye olan örnekten ve eozin-Y'den lam üzerine damlatılıp, üzeri lamelle kapatıldıktan sonra, faz kontrast mikroskopunda (Olympus, CX31), en az 200 sperm hücresi, 40X objektif altında beş farklı bölgede sayılıp ortalamaları alındı ve plazma membran bütünlüğünü muhafaza eden canlı hücrelerin oranı hesaplandı.

Normal sperm morfoloji değerlendirilmesi yapıldı, sperm, çekirdeğini kırmızı renkte, akrozom, boyun ve kuyruğu ise yeşil renkte boyayan spermacTM boyaları ile boyanıp, WHO kriterlerine göre spermin morfolojik özellikleri incelenerek analizi yapıldı.

Morfolojik açıdan anormal spermatozoanın birden fazla defekti bulunabilir; baş, orta parça veya ana parça defektleri veya bu defektlerin kombinasyonları olabilir. Özellikle insan spermatogenezindeki hasarın derecesini inceleyen çalışmalarda, morfolojik anormalliklerin insidansının ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi, morfolojik olarak normal spermilerin yüzdesinin basit olarak değerlendirilmesinden daha yararlı olabilir. Çoklu anomali hesaplaması (TZI) morfolojik olarak normal ve baş, orta parça ve ana parça defektleri olan spermeleri gösterir yani değerlendirilen sperm başına anormalliklerin ortalama sayısını verir. TZI hesaplaması;

$$TZI = \frac{\text{baş defekti} + \text{boyun defekti} + \text{kuyruk defekti}}{\text{toplam defektli sperm sayısı}} \quad \text{ile elde edilir.}$$

Semen analizi sonrası, apoptozis ve oksidatif DNA hasarı yönünden değerlendirme için, her bireyden (20 erkek obez birey, 20 erkek normal kilolu birey), semen örneği dörder adet lam üzerine 15 µl kadar damlatılıp yayma işlemi yapılarak hazırlandı.

Sperm apoptozunu değerlendirmek için kaspaz 3 8 9 testi ve oksidatif DNA hasarını belirlemek için, özgün, yan ürün olan 8 OHdG (8-hidroksideoksi guanozin) testi yapıldı.

2.3. Sperm Apoptozunun Kaspaz 9-8-3 Yöntemi İle Değerlendirilmesi

Apoptoz yollarına önemli noktalarda bulunmakta olan başlatıcı kaspazlardan 8 ve 9 ile efektör kaspazlardan olan apoptozu indükleyen kaspaz 3'e immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak bakılmıştır. Bu işlem için öncelikle her hastadan üçer lam yayma preparat hazırlandı ve kurumaya bırakıldı. Absolu metanol ile 15 dakika fiksasyon yapıp, PBS (P4417-100TAB Sigma) ile 2x5 dakika yıkandı. Hücrelerin geçirgen hale gelmesi için, %1'lik triton X100 (sc-29112 Santa Cruz Biotechnology) ile 10 dakika muamele edildi ve 2x5 dakika PBS ile yıkandı. Kaspaz 3-8-9 kit protokolü basamakları uygulandı.

Primer antikor olarak Anti-Kaspaz 3 antikoru (ab13847), Anti-Kaspaz 8 antikoru (ab25901), kaspaz 9 antikoru (Santa Cruz sc-56076) kullanıldı.

Histostain-Plus IHC Kit, DAB, broad spectrum (Invitrogen, 859643) immünohistokimya boyamada kullanıldı.

Kaspaz 9 protokolüne göre; fiksasyon işleminden sonra blok solüsyon ile 15 dakika muamele edildi.

Blok solüsyon için; PBS (P4417-100TAB Sigma), goat serum (ab7481), BSA (Sigma A9418-50G), Sodyum Azid (cat no 26628-22-8), triton X100 (sc-29112 Santa Cruz Biotechnology) kullanıldı.

Nükleus boyanması ve canlı hücrelerin belli olması için mayer hematoksilen (MHS1 SIGMA) ile boyanması yapıp, entellan kapatma medyumunu ile kapatılmıştır.

Tüm örnekler, 100X büyütmede ışık mikroskopunda (Zeiss Axio Imager A1) beş farklı bölgede 200 sperm sayılıp, ortalaması alınarak, apoptotik indeks yüzdesi belirlenmiştir.

2.4. Sperm Oksidatif DNA Hasarının 8-OHdG Yöntemi ile Belirlenmesi

8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif DNA hasarının miktarını belirlemek için işaretleyiciler olarak yaygın olarak kullanıldığından, spermatozoadaki 8-OHdG oranlarına immünohistokimyasal boyama ile bakıldı.

Bu işlem için öncelikle Her hastadan lam üzerine yayma preparat hazırlandı ve kurumaya bırakıldı. Absolu metanol ile 15 dakika fiksasyon yapıp, PBS (P4417-100TAB Sigma) ile 2x5 dakika yıkandı. Hücrelerin geçirgen hale gelmesi için, %1'lik triton X100 (sc-29112 Santa Cruz Biotechnology) ile 10 dakika muamele edildi ve 2x5 dakika PBS ile yıkandı. 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) kit protokolü uygulandı.

Primer antikor olarak anti-8-Hidroksi Deoksiguanozin (8-OHdG)

Endojen nükleazları uzaklaştırmak ve DNA'ya ulaşmak için proteinaz K (IHC Select Proteinase K Millipore Lot2328325 cat no 21627 USA) kullanıldı. 500µl proteinaz K ve 5 ml PBS hazırlanarak oluşturulan stok solüsyonunda 37°C'de 40 dk örnekler bekletildi.

Histostain-Plus IHC Kit, DAB, broad spectrum (Invitrogen, 859643) immünohistokimya boyamada kullanıldı.

Nükleus boyanması ve canlı hücrelerin belli olması için mayer hematoksilin (MHS1 SIGMA) ile boyanması yapıp, kapatma medyumunu entellan ile kapatılmıştır.

Tüm örnekler, 100X büyütmede ışık mikroskopunda (Zeiss Axio Imager A1) beş farklı bölgede 200 sperm sayılıp, ortalaması alınarak, apoptotik indeks yüzdesi belirlenmiştir.

2.5. İstatiksel Yöntem

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS 21.0 paket programı ile değerlendirilmiştir.

Gruplar arasında puanlarının normalliği incelenirken $n < 30$ ise Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. $p < 0,05$ ise gruplar arasında değerlerin normal dağılım göstermediği, $p > 0,05$ olması durumunda ise gruplar arasında değerlerin normal dağılım gösterdiği belirtilmiştir.

Normallik testi sonucunda; normal ve obez birey grupları arasında farklılık incelenirken normal dağılan değişkenlerde bağımsız örneklem (Independent Samples) t testi, normal dağılmayan değişkenlerde ise Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Gruplar arası farklılık incelenirken; anlamlılık seviyesi olarak: 0,05 kullanılmış olup; $p < 0,05$ olması durumunda gruplar arası anlamlı farklılığın olduğu, $p > 0,05$ olması durumunda ise gruplar arası anlamlı farklılığın olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir.



3. BULGULAR

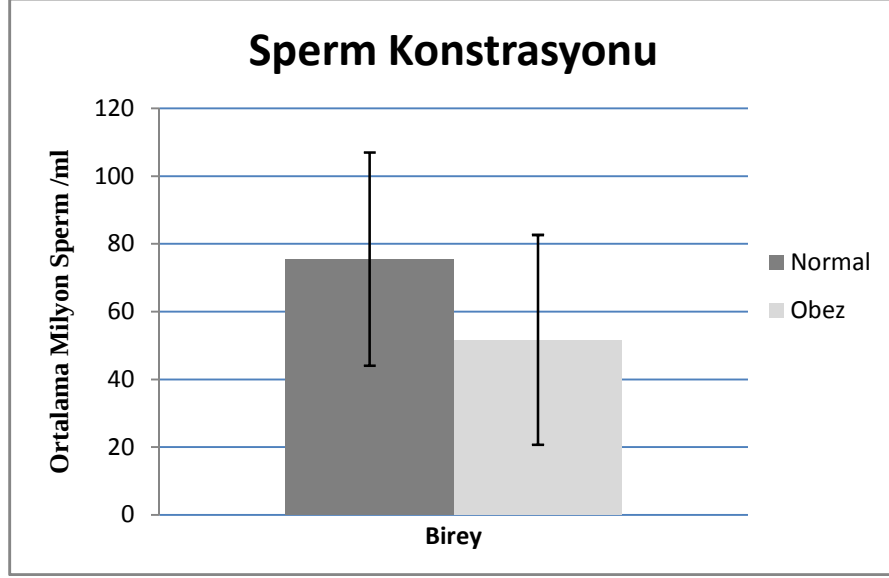
20 obez ve 20 kontrol (normal kilolu) gruplarından toplanan örneklerin likefakasyonu sonrası semen örnekleri her birey için dörder adet olacak şekilde lamlara yayılmıştır. Öncelikle renk, koku, görünüm, vizkosite ve likefaksiyon süresi, hacmi ve pH, konsantrasyon, motilite değerleri kaydedilmiştir, sonrasında normal sperm morfolojisi, teratozoospermi indeksi, kaspaz 3-8-9 ve 8 OHdG incelemesi yapıp sonuçlar aşağıdaki gibi bulunmuştur.

3.1. Sperm Konsantrasyonu

Kontrol ve obez birey grupları arasında sperm konsantrasyonu değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$). Sperm konsantrasyonu değerleri kontrol grubunda obez bireylere göre anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.1.) (Şekil 3.1.)

Çizelge 3.1. Obez ve kontrol birey grupları arasında, Mann Whitney U Testine göre; ortalamaları, en az ve en çok değerleri, standart sapmaları hesaplanarak, sperm konsantrasyonu yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p \leq 0,05$) bulunmuştur.

		Sperm Konsantrasyonu						Mann Whitney U Testi		
		n	Ortalama	Ortanca	En Az	En Çok	SS	Rank	U	p
Grup	Kontrol	20	75,55	68	30	130	31,48	24,70	116,0	0,023*
	Obez	20	51,7	43	10	100	31,00	16,30		
	Toplam	40	63,625	60	10	130	33,11			
*p<0,05										



Şekil 3.1. Obez ve kontrol grupları arasında milyon sperm/ml ortalaması hesaplanıp, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$).

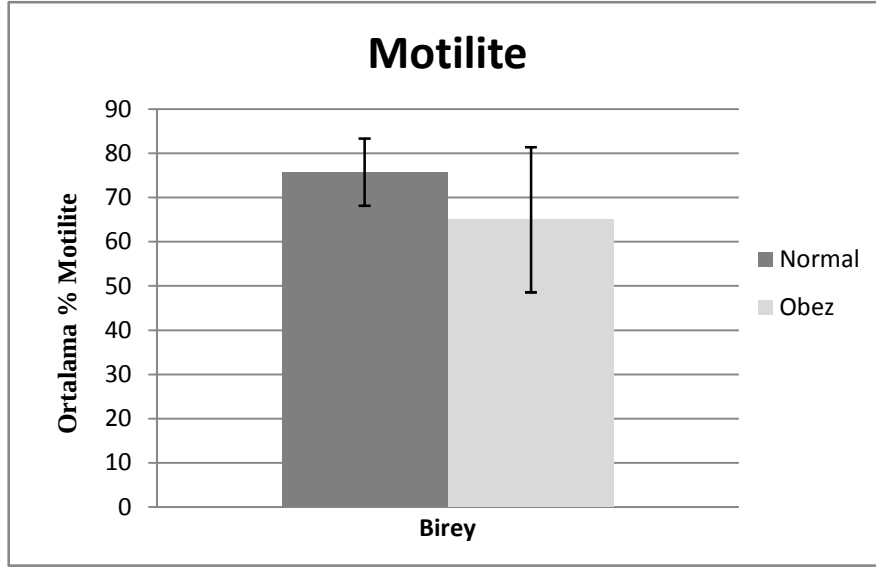
3.2. Motilite

Kontrol ve obez birey grupları arasında Motilite değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$). Motilite değerleri kontrol grubunda obez bireylere göre anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.2.) (Şekil 3.2)

Çizelge 3.2. Obez ve kontrol birey grupları arasında, Mann Whitney U Testine göre; ortalamaları, en az ve en çok değerleri, standart sapmaları hesaplanarak, motilite yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p \leq 0,05$) bulunmuştur.

		Motilite						Mann Whitney U Testi		
		n	Ortalama	Ortanca	En Az	En çok	SS	Rank	U	p
Grup	Kontrol	20	75,8	77,0	60,0	87,0	7,6	24,95	111,0	0,016*
	Obez	20	65,0	68,0	24,0	87,0	16,4	16,05		
	Toplam	40	70,4	72,0	24,0	87,0	13,8			

* $p < 0,05$



Şekil 3.2. Obez ve kontrol grupları arasında yüzde motilite ortalaması hesaplanıp, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$).

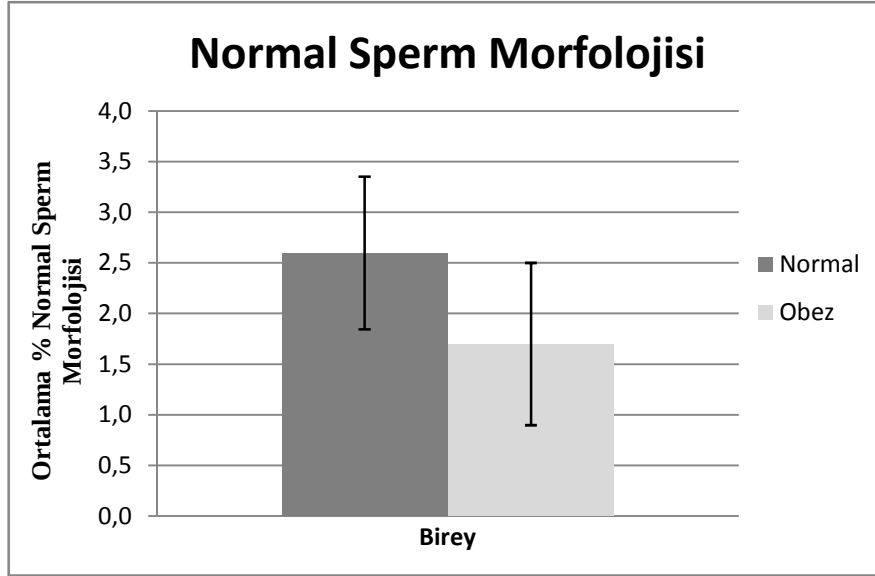
3.3. Normal Sperm Morfolojisi

Kontrol ve obez birey grupları arasında sperm morfolojisi değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$). Normal sperm morfolojisi yüzdesi obez bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktür. (Çizelge 3.3.) (Şekil 3. 3.)

Çizelge 3.3. Obez ve kontrol birey grupları arasında, Independent Sample t testie göre; ortalamaları, en az ve en çok değerleri, standart sapmaları hesaplanarak, normal sperm morfoloji yüzdesi yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p \leq 0,05$) bulunmuştur.

		Sperm Morfolojisi						Independent Sample t Test	
		n	Ortalama	Ortanca	En Az	En çok	SS	t	p
Grup	Kontrol	20	2,6	3,0	1,0	4,0	0,8	3,658	0,001*
	Obez	20	1,7	2,0	1,0	4,0	0,8		
	Toplam	40	2,2	2,0	1,0	4,0	0,9		

* $p < 0,05$



Şekil 3.3. Obez ve kontrol grupları arasında normal sperm morfoloji yüzde ortalaması hesaplanıp, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$).

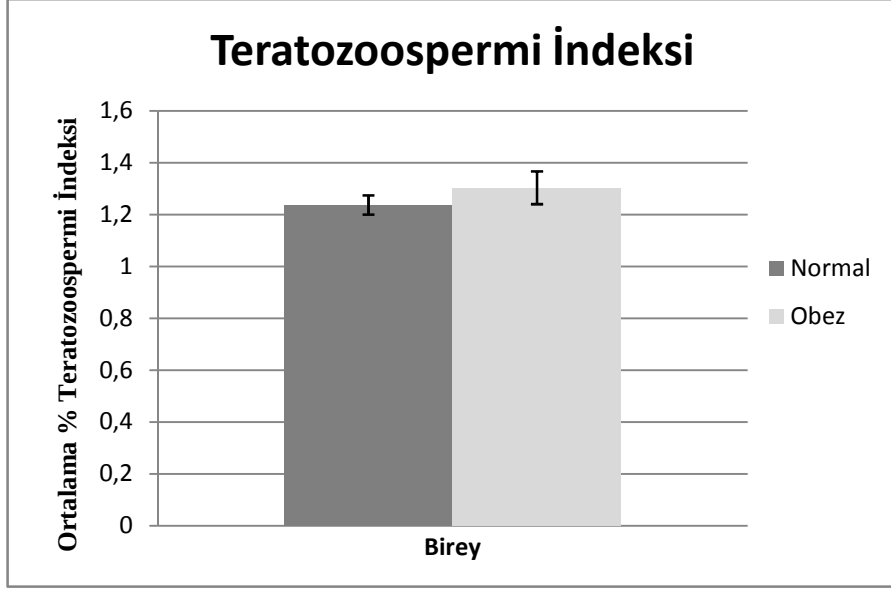
3.4. Teratozoospermi İndeksi

Normal ve kontrol grupları arasında Teratozoospermi İndeksi değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$). Teratozoospermi İndeksi değerleri obez bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.4.) (Şekil 3.4.)

Çizelge 3.4. Obez ve kontrol birey grupları arasında, Mann Whitney U testine göre; ortalamaları, en az ve en çok değerleri, standart sapmaları hesaplanarak, teratozoospermi indeksi yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p < 0,05$) bulunmuştur.

		Teratozoospermi İndeksi						Mann Whitney U Testi		
		n	Ortalama	Ortanca	En Az	En çok	SS	Rank	U	p
Grup	Kontrol	20	1,24	1,24	1,16	1,32	0,04	14,10	72,0	0,001*
	Obez	20	1,30	1,31	1,19	1,46	0,06	26,90		
	Toplam	40	1,27	1,27	1,16	1,46	0,06			

* $p < 0,05$



Şekil 3.4. Obez ve kontrol grupları arasında yüzde teratozoospermi indeksi ortalaması hesaplanıp, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p<0,05$).

3.5. Kaspaz 3

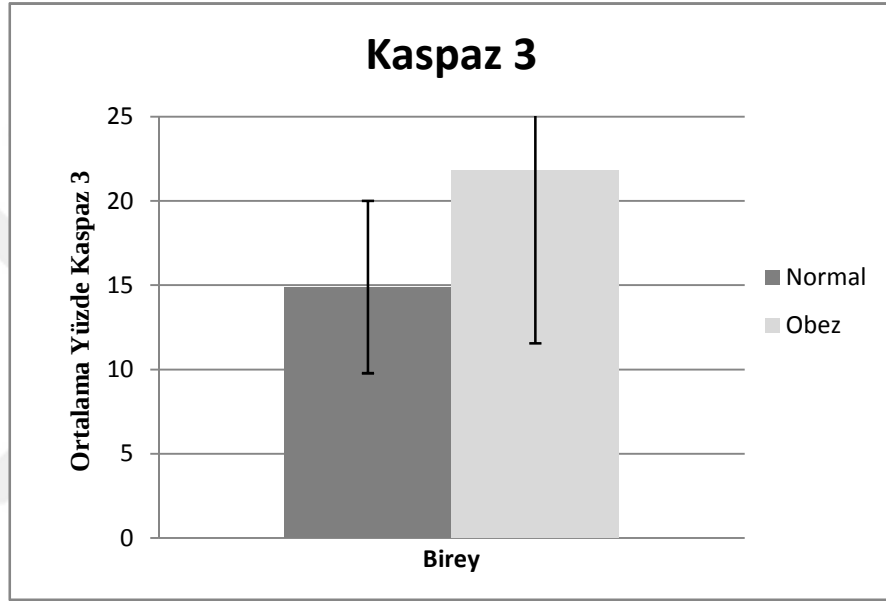
Kontrol ve obez grupları arasında apoptozis sürecinin tamamlanmasında önemli rol oynayan, efektör kaspaz olan kaspaz 3 değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p<0,05$). Kaspaz 3 değerleri obez bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.5.) (Şekil 3.5.).

Anti-Kaspaz 3 antikoru ile yapılan boyama ışık mikroskobu altında incelenmiştir. 100X objektif büyütmede alınan görüntülerde görüldüğü gibi kahverengi boyanmanın olduğu sperm hücreleri kaspaz 3 aktivasyonunun varlığını gösterirken, yalnızca mayer hematoksilen ile boyanmış sperm hücrelerinde apoptotik sürecin olmadığını göstermektedir (Şekil 3.6.).

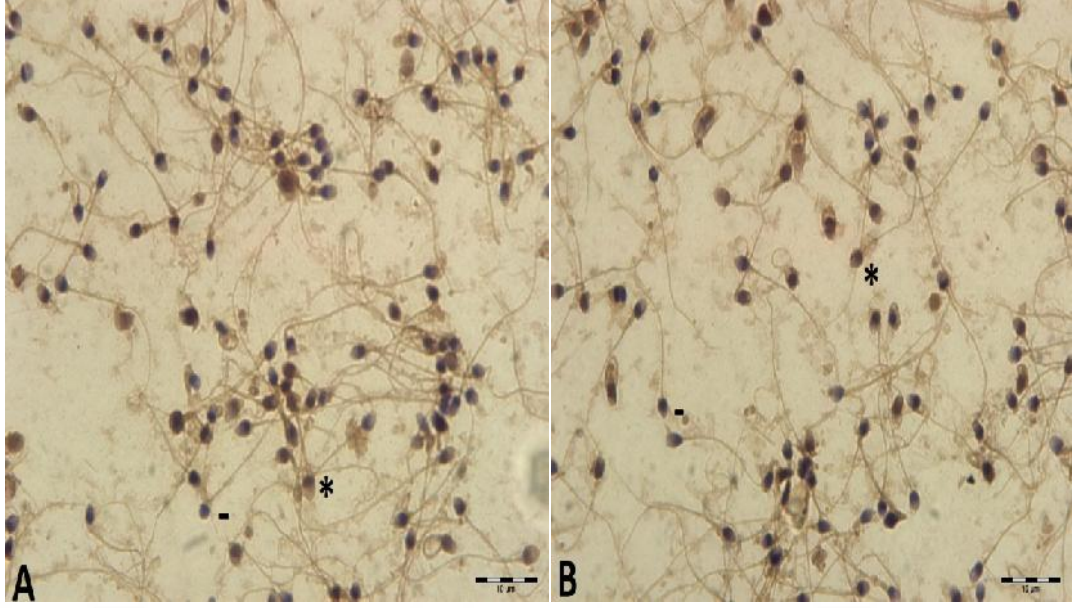
Çizelge 3.5. Obez ve kontrol birey grupları arasında, Mann Whitney U testine göre; ortalamaları, en az ve en çok değerleri, standart sapmaları hesaplanarak, Kaspaz 3 yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p \leq 0,05$) bulunmuştur.

		Kaspaz 3						Mann Whitney U Testi		
		n	Ortalama	Ortanca	En Az	En çok	SS	Rank	U	p
Grup	Kontrol	20	14,9	14,0	8,0	25,0	5,1	16,53	120,5	0,031*
	Obez	20	21,9	19,0	6,0	41,0	10,3	24,48		
	Toplam	40	18,4	17,0	6,0	41,0	8,8			

* $p < 0,05$



Şekil 3.5. Obez ve kontrol grupları arasında yüzde ortalama Kaspaz 3 yüzdesi hesaplanıp, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$).



Şekil 3.6. Kontrol (A) ve obez (B) bireylere ait İmmünohistokimyasal yöntem ile boyanmış sperm ışık mikroskop görüntüsü. (*) kaspaz 3 aktivasyonu görülen sperm, (-) aktivasyon görülmeyen sperm (ölçek çubuğu= 10 µm).

3.6. Kaspaz 8

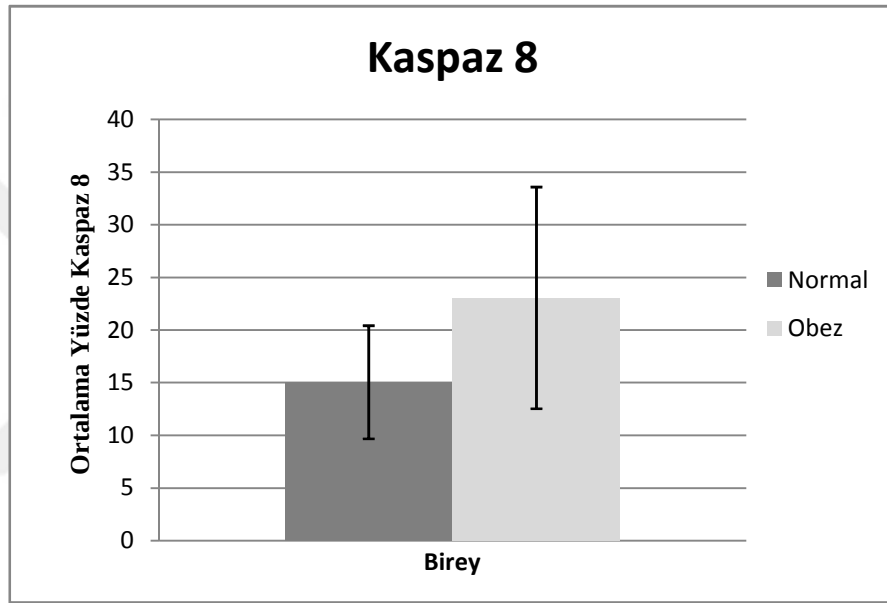
Kontrol ve obez grupları arasında apoptozis sürecinin başlamasında önemli rol oynayan, kaspaz 8 değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p<0,05$). Kaspaz 8 değerleri obez bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.6.) (Şekil 3.7.).

Anti-Kaspaz 8 antikoruna ile yapılan boyama ışık mikroskobu altında incelenmiştir. 100X objektif büyütmede alınan görüntülerde görüldüğü gibi kahverengi boyanmanın olduğu sperm hücreleri kaspaz 8 aktivasyonunun varlığını gösterirken, yalnızca mayer hematoxilen ile boyanmış sperm hücrelerinde apoptotik sürecin olmadığını göstermektedir (Şekil 3.8.).

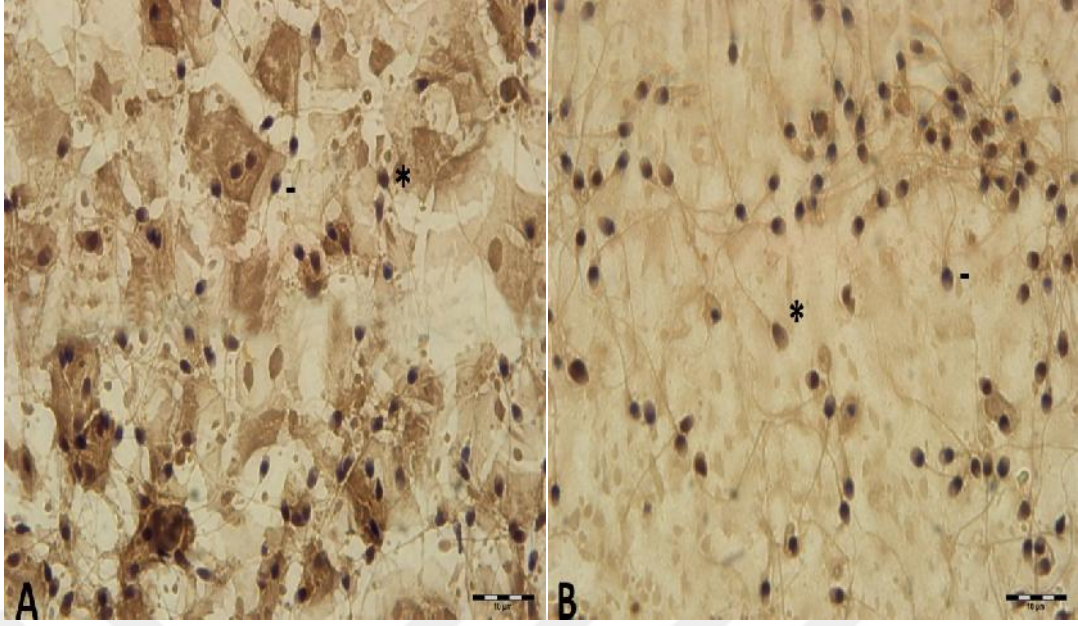
Çizelge 3.6. Obez ve kontrol birey grupları arasında, Mann Whitney U testine göre; ortalamaları, en az ve en çok değerleri, standart sapmaları hesaplanarak, Kaspaz 8 yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p \leq 0,05$) bulunmuştur.

		Kaspaz8						Mann Whitney U Testi		
		n	Ortalama	Ortanca	En Az	En Çok	SS	Rank	U	p
Grup	Kontrol	20	15,1	14,0	7,0	25,0	5,7	16,03	110,5	0,015*
	Obez	20	23,1	22,5	8,0	44,0	10,5	24,98		
	Toplam	40	19,1	17,5	7,0	44,0	9,3			

* $p < 0,05$



Şekil 3.7. Obez ve kontrol grupları arasında yüzde ortalama Kaspaz 8 yüzdesi hesaplanıp, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$).



Şekil 3.8. Kontrol (A) ve obez (B) bireylere ait İmmünohistokimyasal yöntem ile boyanmış spermin ışık mikroskop görüntüsü.(*) kaspaz 8 aktivasyonu görülen sperm, (-) aktivasyon görülmeyen sperm (ölçek çubuğu= 10 µm).

3.7. Kaspaz 9

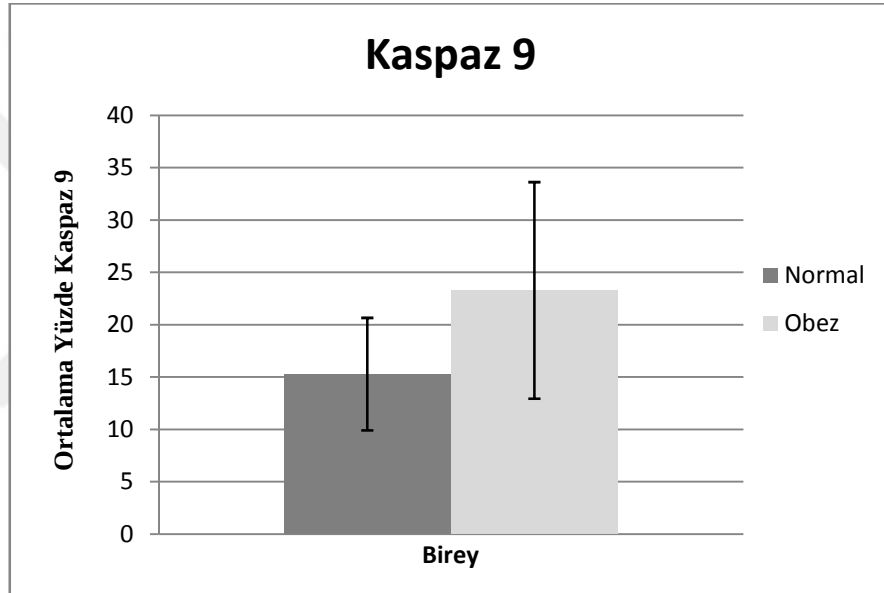
Kontrol ve obez birey grupları arasında apoptozis sürecinin başlamasında önemli rol oynayan, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9 değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p<0,05$). Kaspaz 9 değerleri obez bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.7.) (Şekil 3.9.).

Anti-Kaspaz 9 antikoruna ile yapılan boyama ışık mikroskobu altında incelenmiştir. 100X objektif büyütmesinde alınan görüntülerde görüldüğü gibi kahverengi boyanmanın olduğu sperm hücreleri kaspaz 9 aktivasyonunun varlığını gösterirken, yalnızca mayer hematoxilen ile boyanmış sperm hücrelerinde apoptotik sürecin olmadığını göstermektedir (Şekil 3.10.).

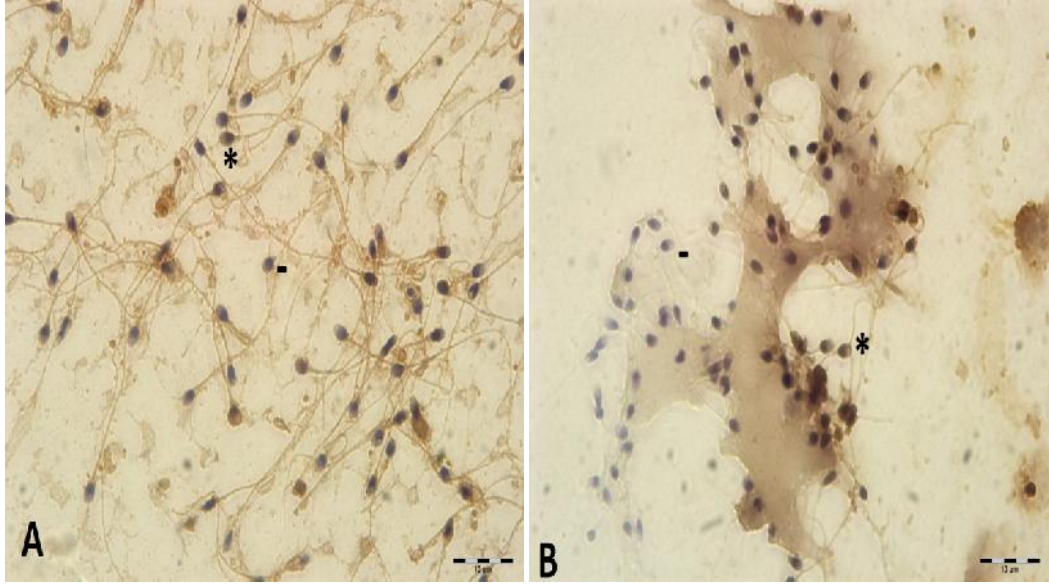
Çizelge 3.7. Obez ve kontrol birey grupları arasında, Mann Whitney U testine göre; ortalamaları, en az ve en çok değerleri, standart sapmaları hesaplanarak, kaspaz 9 yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p \leq 0,05$) bulunmuştur.

		Kaspaz 9						Mann Whitney U Testi		
		n	Ortalama	Ortanca	En Az	En Çok	SS	Rank	U	p
Grup	Kontrol	20	15,3	14,5	7,0	28,0	5,4	15,43	98,5	0,006*
	Obez	20	23,3	25,0	4,0	40,0	10,3	25,58		
	Toplam	40	19,3	18,5	4,0	40,0	9,1			

* $p < 0,05$



Şekil 3.9. Obez ve kontrol grupları arasında yüzde ortalama Kaspaz 9 yüzdesi hesaplanıp, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmektedir ($p < 0,05$).



Şekil 3.10. Kontrol (A) ve obez (B) bireylere ait İmmünohistokimyasal yöntem ile boyanmış sperm ışık mikroskop görüntüsü. (*) kaspaz 9 aktivasyonu görülen sperm, (-) aktivasyon görülmeyen sperm (ölçek çubuğu= 10 µm).

3.8. 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG)

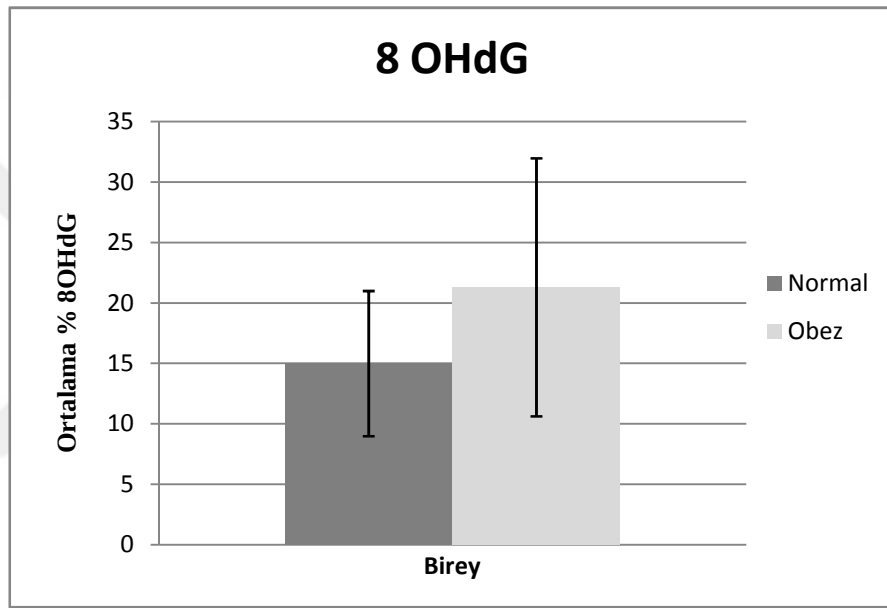
Kontrol ve obez birey grupları arasında oksidatif stres için biyolojik belirteç olan, oksidatif DNA hasarına özgün 8-OHdG değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmemektedir ($p>0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 8-OHdG değerleri obez bireylerde kontrol grubuna göre daha yüksektir (Çizelge 3.8.) (Şekil 3.11.).

8-OHdG (8-hidroksideoksi guanozin) ile yapılan boyama ışık mikroskobu altında incelenmiştir. 100X objektif büyütmede alınan görüntülerde görüldüğü gibi kahverengi boyanmanın olduğu sperm hücreleri 8-OHdG aktivasyonunun varlığını gösterirken, yalnızca mayer hematoksilen ile boyanmış sperm hücrelerinde oksidatif DNA hasarının olmadığını göstermektedir (Şekil 3.12.).

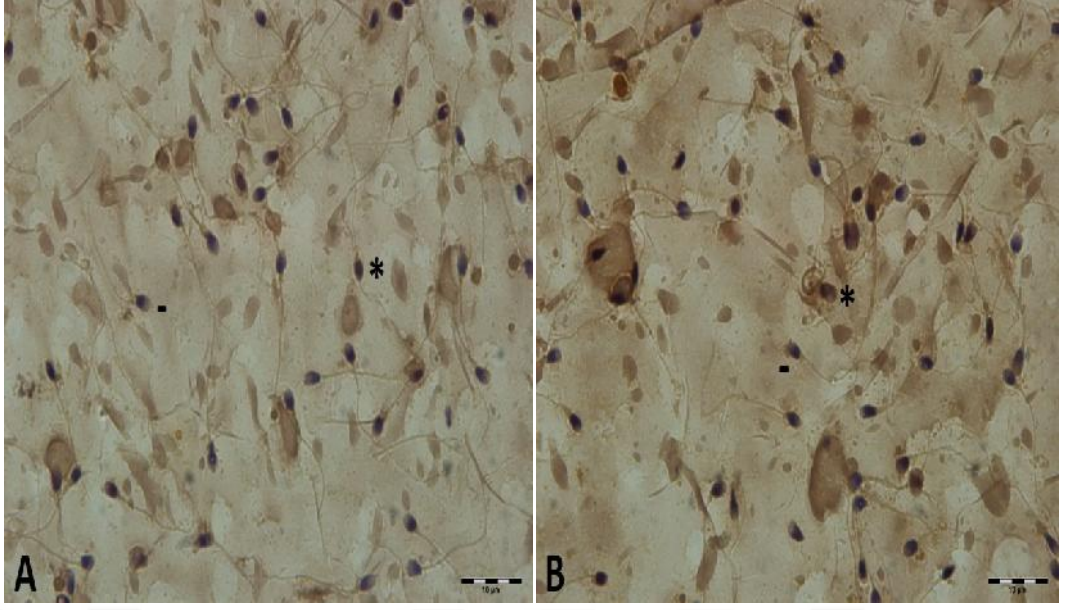
Çizelge 3.8. Obez ve kontrol birey grupları arasında, Mann Whitney U testine göre; ortalamaları, en az ve en çok değerleri, standart sapmaları hesaplanarak, 8-OHdG yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmemektedir ($p>0,05$).

		8OHdG						Mann Whitney U Testi		
		n	Ortalama	Ortanca	En Az	En Çok	SS	Rank	U	p
Grup	Kontrol	20	15,0	14,5	5,0	26,0	6,0	17,03	130,5	0,060*
	Obez	20	21,3	21,5	4,0	38,0	10,7	23,98		
	Toplam	40	18,2	17,0	4,0	38,0	9,1			

* $p>0,05$



Şekil 3.11. Obez ve kontrol grupları arasında ortalama 8-OHdG yüzdesi hesaplanıp, 8-OHdG yönünden bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık görülmemekle birlikte ($p>0,05$), 8-OHdG değerleri obez bireylerde kontrol grubuna göre daha yüksektir.



Şekil 3.12. Kontrol (A) ve obez (B) bireylere ait İmmünohistokimyasal yöntem ile boyanmış spermin ışık mikroskop görüntüsü. (*) 8-OHdG aktivasyonu görülen sperm, (-) aktivasyon görülmeyen sperm (ölçek çubuğu= 10 µm).

4. TARTIŞMA

Yapılan çalışma ile, WHO standartlarına göre obez sınıfına giren bireyler ile normal kiloya sahip bireylerden alınan semen örnekler; motilite, morfoloji, sperm defekti (TZI), konsantrasyon, kaspaz 3, 8, 9 ve 8-OhdG parametreleri değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda obezitenin sperm parametrelerini, apoptozu ve DNA hasarını etkilediği sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan çalışmanın amacı; infertilite şikâyeti ile gelen WHO kriterlerine göre obez sınıfına giren bireylerde, reaktif oksijen türlerine bağlı oksidatif stres ile artan apoptoz, oksidatif DNA hasarı ile sperm parametreleri arasında ilişki olup olmadığını belirlemektir.

İnfertil çiftlerin kabaca üçte birini oluşturan erkek infertilitesinin, birçok nedeni vardır. Bazı vakaların, kalıtsal genetik kusurlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, dünyada erkek obezitesinin (VKI>30 kg/m² olarak tanımlanmaktadır) yükselmeye devam ettiğini göstermektedir. Obezite ile infertilite arasındaki klinik araştırmalar, özellikle son yıllarda yoğun olarak incelenmeye başlanmıştır (Roth ve ark 2008).

Sperm parametreleri, WHO değerlerine göre obez erkeklerin, infertiliteye sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmada 1 ve 4 hafta arayla yapılan spermiogram testinde, sperm konsantrasyonunda, motilitede, morfolojide bir değişiklik olduğu görülmektedir. Bunların en önemlileri, düşük sperm konsantrasyonu, zayıf sperm motilitesi ve anormal sperm morfolojisi'dir. Kısırlık ile daha az ilişkili olan diğer faktörler arasında semen hacmi ve epididimal, prostatik ve seminal vezikül fonksiyonunun diğer seminal belirteçleri bulunur (Kumar ve Singh 2015).

Bildiği gibi, son yıllarda erkeklerin üreme fonksiyonlarının ana göstergelerinde önemli bir bozulma vardır. Erkek üreme sistemini etkileyen androlojik hastalıkların ve sperm morfolojik bozukluklarının sayısının artması, üreme çağındaki erkeklerdeki sperm üretimini yarıya indirdi. Bunun nedeni muhtemelen tıbbi bilgisizlik, kontrolsüz ve uygun olmayan ilaç kullanımı, metabolik bozukluklar, vitamin ve mineral eksikliği, endüstriyel kirleticilerin etkisi gibi stres faktörlerinin ardında yatmaktadır, bağımlılıkların (alkolizm, sigara içimi ve

uyuşturucu bağımlılığı) artması ile İnfertilite oranının arttığı gözlenmektedir (Kolesnikova ve ark 2015).

Obezitenin sperm canlılığı üzerindeki olumsuz etkileri için birkaç temel mekanizma açıklanmaktadır;

Öncelikle, gereksiz yağ dokusunda androjenlerin östrojenlere aşırı dönüştürölmesi cinsel hormonal dengesizliğe neden olmakta ve sonuçta hipogonadizm ile sonuçlanmaktadır.

İkinci olarak, yağ dokusu tarafından üretilen adipokinler erkek üreme sisteminde şiddetli iltihaplanma ve oksidatif stres oluşturarak doğrudan testis ve epididimal dokuları zayıflatmaktadır.

Üçüncüsü, artmış skrotal adipozite gonadal sıcaklığın yükselmesine yol açarak sürekli spermatogenezi baskılamaktadır. Isının zararlı etkisi azaltılmış sperm motilitesi, artmış sperm DNA parçalanması ve artmış sperm oksidatif stres ile ilişkilidir

Bu nedenle, obezite epididimdeki testiküler spermatogenezis, spermiyogenez için hayati önem taşıyan sistemik durumu değiştirir. Sperm motilitesi, anormal sperm morfolojisi, akrozom reaksiyonu, membran lipid kompozisyonundaki değişiklikler ve DNA hasarındaki artışlar gibi sperm kalitesinde düşüş gösterir (Liu ve Ding 2017).

Danimarka'da yapılan çalışmada infertilite oranının, obez erkek partnerin, normal ağırlıkta olan erkek partnerlerine göre 1.49 katı daha yüksek olduğu görölmüşür (Ramlau-Hansen ve ark 2007).

72 çift üzerinde yapılan bir çalışmanın ardından, 30 kg / m²'den yüksek VKİ'ye sahip erkek bireylerde infertilite riskinin yaklaşık 3 kat arttırdığını bulmuştur. Semen kalitesi parametreleri ile vücut kitle indeksi arasında, anlamlı bir korelasyon vardır (Magnusdottir ve ark 2005).

Klinik araştırmalarda obezite ve erkek inertilesi çok araştırılsa da bu konuda deneysel çalışmlar azdır. Fare ile yapılan deneyde obez farelerin sperm motilitesinin obez olmayanlara göre kötü olduğu görölmüşür (Ghanayem ve ark 2010).

Birçok çalışma VKİ'deki artış ile testosteron düzeyinde düşüş arasında doğrudan bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Aggerholm ve ark 2008). Diğer çalışmalar, testosteron düzeyindeki bu düşüşü, infertilite oranlarının yükselmesi ile ilişkilendirildi (Sallmen ve ark 2006). Başka bir çalışmada, artmış VKİ ile azaltılmış sperm konsantrasyonları, sperm hareketliliği ve doğurganlık oranları arasında bir ilişki olduğu bulundu (Nguyen ve ark 2007).

Başka yapılan bir çalışma ise, VKİ'nin seminal kaliteyi olumsuz etkilediği fakat motilite ile arasında negatif bir ilişki olduğu görülmüştür (Martini ve ark 2010).

Birçok yazar için, vücut kitle indeksinden ($VKI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) sperm hareketliliğinin etkilenmiş olduğunu düşündürmektedir. Obezite ile sperm kalitesini (hacim, konsantrasyon, toplam sperm sayısı ve motilitesi) inceleyen bir çalışmada Sperm sayısının, motilitesinin, konsantrasyonunun obez bireylerde düşük olduğu görülmüştür (Aggerholm ve ark 2008). Fakat 349 erkekte oluşan başka bir çalışmada, vücut kitle indeksi ile toplam sperm sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu nedenle, bazı çalışmalarda bildirilen vücut kitle indeksi ve sperm sayısı arasındaki ilişki doğrulanmamıştır (Nicopoulou ve ark 2009).

Bununla birlikte, Jensen'in çalışmasında 1.558 gönüllü vakası incelenmiş ve vücut kitle indeksi yüksek olanların, sperm konsantrasyonu ve sayısı normal kiloya sahip kişilerden düşük bulunmuştur. Buna karşın semen hacmi ve hareketli spermatozoa yüzdesi VKİ'dan etkilenmedi (Jensen ve ark 2004). Yapılan bu çalışmalara göre, birçok çalışma erkek obezitesi ile infertilite arasında ilişki olduğunu göstermektedir.

Obez erkeklerde, total testosteron düzeyleri düşüktür. Yapılan çalışmada erkek obezitesinin düşük testosteron seviyeleri ile ilişkili olduğunu görülmüştür (Hammoud ve ark 2009).

Obez erkeklerde östradiol seviyelerin fazla olduğu görülmüştür. Vücut ağırlığının testosteron ve östradiol seviyelerine etkisini araştıran bir çalışmada normal kilolu bireyler ile obez bireyler karşılaştırılmıştır. Östrojen fazlalığının, gonadotropin salınım hormonu (GnRH) sistemini etkileyerek sperm konsantrasyonunu ve motiliteyi düşürdüğünü bulmuşlardır (Fejes ve ark 2006).

DNA hasarı ile ilgili çalışmalarda obeziteyle birlikte arttığı görülmüştür (Pacey 2010). Yine başka bir çalışma artan vücut kitle indeksiyle beraber DNA hasarının arttığını ve sperm motilitesinin azaldığını göstermişlerdir. Obezitenin kötü geçirilmiş bir spermatogenez buna bağlı olarak gelişen azalmış sperm sayısı ve motilite ile ilişkili olacağı söylenmiştir (Sallmen ve ark 2006).

Obezitenin infertilite açısından DNA bütünlüğüne olan potansiyel etkisini değerlendirmek önemlidir. Farklı teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar içeren araştırmalar yayınlanmıştır. Obez hastalarda, sperm kromatin yapı testi (SCSA) ile belirlenen, sperm DNA parçalanma oranının VKİ ile orantılı artmış olduğu bildirmiştir (Kort ve ark 2006). Flow sitometri kullanılarak yapılan başka çalışmada, obezlerde daha yüksek sperm DNA hasarı olduğu görülmüştür (La Vignera ve ark 2012).

Ancak bazı araştırmacıların yaptığı çalışmalarda obezite ile DNA hasarı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Yapılan çalışmada 81 kişiye ulaşılmış ve TUNEL testi ile DNA hasarı belirlenmiştir (Tunc ve ark 2011). Başka bir çalışmada da flow sitometri kullanılarak DNA hasarı değerlendirilmiştir (Hammiche ve ark 2011).

Yapılan bazı araştırmalar, obezitenin oksidatif stresi artırdığını göstermişlerdir. Yapılan bir fare deneyinde obez ve normal kilolu bireyler ile çalışmış, sperm motilitesi, konsantrasyon, hücre içi reaktif oksijen türü (ROS) üretimi ve sperm DNA hasarı ölçülmüştür. Obez grubunda hareketli sperm oranının kontrollere kıyasla azaldığı, intrasellüler ROS, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında obez fare grubunda yükseldiği ve sperm DNA hasarının obez fare grubunda kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Bu rapor, obezitenin, oksidatif stres ve sperm DNA hasarına neden olabileceğine dair kanıtlar sunmaktadır. Oksidatif stres sonucunda spermde DNA hasarı zayıf üreme sonuçlarına bağlandığından bu önemlidir (Bakos ve ark 2011).

Yaptığımız çalışmada artan VKİ ile oksidatif DNA hasarı, apoptoz, sperm konsantrasyonu, motilite, normal sperm morfolojisi ve teratozoospermi indeksi parametrelerini inceledik ve karşılaştırmalarını yaptık. Çıkan sonuç, WHO standartlarına göre obez kabul edilen bireylerde sperm konsantrasyonu, motilite ve

normal sperm morfolojisinin daha az olduğunu, DNA hasarının ve apoptozun fazla olduğunu gösterdik. Sonuçlarımız, çoğu literatür ile uyum göstermiştir.

Çalışmamız 40 birey ile yapılmış olup örneklem gruplarımız 20'şer kişiden oluşmaktadır. Tüm parametreler için anlamlı sonuçlar elde etmek adına birey sayısının artırılması ve daha sağlıklı sonuçlar elde etmek adına ileriki çalışmalarda daha fazla birey sayısı ile çalışma yapmak ilk hedefimiz arasında yer almaktadır.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada obezitenin sperm parametreleri üzerindeki etkilerini, ROS'a ve oksidatif strese bağlı apoptozis ve DNA hasarını değerlendirdik. Bunun için infertilite şikâyeti ile gelen WHO standartlarına göre obez sınıfına giren 20 erkek birey ile normal kiloya sahip 20 erkek bireyin semen örnekleri kullanılmıştır. İki grup arasında karşılaştırmalı sperm konsantrasyonları, motilite, normal morfolojiye sahip sperm sayıları, teratozoospermi indeksi, oksidatif DNA hasarı ve apoptozis analizleri yapılmıştır.

İki grup için, elde edilen sonuçlar çoğu literatür gibi obez bireylerde apoptozun, teratozoospermi indeksi değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmakla ($p>0,05$) birlikte yüksek olduğu, oksidatif DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı olmamakla ($p\leq 0,05$) birlikte yüksek olduğu, sperm konsantrasyonu, normal sperm morfolojisi ve motilite değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmakla ($p>0,05$) birlikte düşük olduğu bulunmuştur.

Bu da son yıllarda artan infertilite oranlarının, çağımızın epidemisi kabul edilen obezite ile ilişkili olabileceği yönündeki kuşkuları kuvvetlendirmektedir. Tabii ki bu savın daha da kuvvetlendirilmesi için daha çok ve farklı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu türden çalışmaların daha yüksek örneklem gruplarıyla tekrar edilmesinde de fayda vardır.

KAYNAKLAR

- Agarwal A, Said TM, 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, 9, 4, 331-45.
- Agarwal A, Said TM, 2005. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU International*, 95, 4, 503-7.
- Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS, 2014. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32, 1, 1-17.
- Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, 2008. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril*, 90, 3, 619-26.
- Aitken RJ, Baker MA, 2013. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *The International Journal of Developmental Biology*, 57, 2-4, 265-72.
- Aitken RJ, Buckingham DW, West KM, 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *Journal of Cellular Physiology*, 151, 3, 466-77.
- Alberts B JA, Lewis J, et al. , 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M, 2011. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *International Journal of Andrology*, 34, 5 Pt 1, 402-10.
- Balen AH, 2014. *Infertility in Practice*, Fourth Edition, Taylor & Francis, p.
- Björndahl L, Söderlund I, Kvist U, 2003. Evaluation of the one- step eosin- nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18, 4, 813-6.
- Brooks NL, 2005. *Apoptotic markers in ejaculated human spermatozoa*, University of the Western Cape.
- Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A, 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International Braz J Urol : Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 33, 5, 603-21.
- Cohen GM, 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326 (Pt 1), 1-16.
- Cohen JJ, 1993. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest*, 103, 2 Suppl, 99s-101s.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N, 1998. Spermatogenesis. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13 Suppl 1, 1-8.
- Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A, 2010. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol*, 7, 3, 153-61.
- El-Melegy NT, Ali M-EM, 2011. Apoptotic markers in semen of infertile men: association with cigarette smoking. *International Braz J Urol*, 37, 495-506.
- Eliasson R, 2010. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian Journal of Andrology*, 12, 1, 26-32.
- Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 4, 495-516.
- Fejes I, Koloszar S, Zavaczki Z, Daru J, Szollosi J, Pal A, 2006. Effect of body weight on testosterone/estradiol ratio in oligozoospermic patients. *Archives of Andrology*, 52, 2, 97-102.

- Franken DR, Oehninger S, 2012. Semen analysis and sperm function testing. *Asian Journal of Andrology*, 14, 1, 6-13.
- Gartner LP, Hiatt JL, 2007. *Color Textbook of Histology*, Saunders/Elsevier.
- Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U, 2010. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biology of Reproduction*, 82, 1, 96-104.
- Hall JE, 2015. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, Elsevier.
- Hammiche F, Laven JS, Boxmeer JC, Dohle GR, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP, 2011. Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *Journal of Andrology*, 32, 1, 70-6.
- Hammoud A, Gibson M, Hunt SC, Adams TD, Carrell DT, Kolotkin RL, Meikle AW, 2009. Effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery on the sex steroids and quality of life in obese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94, 4, 1329-32.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT, 2008. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertility and Sterility*, 90, 4, 897-904.
- Handelsman DJ, Swerdloff RS, 1985. Male gonadal dysfunction. *Clinics in endocrinology and metabolism*, 14, 1, 89-124.
- Hofny ER, Ali ME, Abdel-Hafez HZ, Kamal Eel D, Mohamed EE, Abd El-Azeem HG, Mostafa T, 2010. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril*, 94, 2, 581-4.
- Igney FH, Krammer PH, 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews. Cancer*, 2, 4, 277-88.
- Imawati Budihardjo, Holt Oliver, Michael Lutter, Xu Luo a, Wang X, 1999. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 1, 269-90.
- Jarow JP, Kirkland J, Koritnik DR, Cefalu WT, 1993. Effect of obesity and fertility status on sex steroid levels in men. *Urology*, 42, 2, 171-4.
- Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE, 2004. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*, 82, 4, 863-70.
- Jeyendran RS, 2003. *Sperm Collection and Processing Methods: A Practical Guide*, Cambridge University Press.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM, 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410, 6828, 549-54.
- Kahn BE, Brannigan RE, 2017. Obesity and male infertility. *Current Opinion in Urology*, 27, 5, 441-5.
- Katib A, 2015. Mechanisms linking obesity to male infertility. *Central European Journal of Urology*, 68, 1, 79-85.
- Kerr JB, Millar M, Maddocks S, Sharpe RM, 1993. Stage-dependent changes in spermatogenesis and Sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. *The Anatomical Record*, 235, 4, 547-59.

- Kolesnikova LI, Kolesnikov SI, Kurashova NA, Bairova TA, 2015. [Causes and Factors of Male Infertility]. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, 5, 579-84.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE, 2006. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of Andrology*, 27, 3, 450-2.
- Kumar N, Singh AK, 2015. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8, 4, 191-6.
- La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Calogero AE, 2012. Negative effect of increased body weight on sperm conventional and nonconventional flow cytometric sperm parameters. *Journal of Andrology*, 33, 1, 53-8.
- Li H, Zhu H, Xu C-j, Yuan J, 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, 94, 4, 491-501.
- Liu Y, Ding Z, 2017. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction (Cambridge, England)*.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ, 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 4, 487-501.
- Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K, 2005. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20, 1, 208-15.
- Makker K, Agarwal A, Sharma R, 2009. Oxidative stress & male infertility. *The Indian Journal of Medical Research*, 129, 4, 357-67.
- Maneesh M, Jayalekshmi H, 2006. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 21, 2, 80-9.
- Martini AC, Tissera A, Estofan D, Molina RI, Mangeaud A, de Cuneo MF, Ruiz RD, 2010. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertil Steril*, 94, 5, 1739-43.
- Martinon F, Tschopp J, Inflammatory Caspases. *Cell*, 117, 5, 561-74.
- SemenAnalysis, 2014. https://www.andrologyaustralia.org/wp-content/uploads/Factsheet_SemenAnalysis.pdf.
- McPherson NO, Lane M, 2015. Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? *Asian Journal of Andrology*, 17, 3, 450-8.
- Brooks NL 2005. . Apoptotic markers in ejaculated human spermatozoa, University of the Western Cape.
- Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD, 2007. Men's body mass index and infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22, 9, 2488-93.
- Nicopoulou SC, Alexiou M, Michalakis K, Ilias I, Venaki E, Koukkou E, Mitios G, Billa E, Adamopoulos DA, 2009. Body mass index vis-a-vis total sperm count in attendees of a single andrology clinic. *Fertil Steril*, 92, 3, 1016-7.
- Obesityandoverweight,2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Pacey AA, 2010. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Human Fertility (Cambridge, England)*, 13, 4, 189-93.
- Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M, 2012. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*, 2, 4, 253-63.

- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sorensen TI, Olsen J, 2007. Subfecundity in overweight and obese couples. *Human Reproduction* (Oxford, England), 22, 6, 1634-7.
- Rogalinska M, 2002. Alterations in cell nuclei during apoptosis. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7, 4, 995-1018.
- Rogers K, 2010. *The Reproductive System*, Britannica Educational Pub.
- Ross RJ, 2006. *Histology: a text and atlas*. Section 21: Male Reproductive System.
- Roth MY, Amory JK, Page ST, 2008. Treatment of male infertility secondary to morbid obesity. *Nature clinical practice. Endocrinology & Metabolism*, 4, 7, 415-9.
- Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM, 2002. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biology of reproduction*, 66, 4, 950-8.
- Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD, 2006. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology* (Cambridge, Mass.), 17, 5, 520-3.
- Samant ZGBaPM, 2011. *Role of Oxidative Stress in Male Infertility*.
- Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD, 2010. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27, 1, 3-12.
- Shaha C, Tripathi R, Mishra DP, 2010. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365, 1546, 1501-15.
- Shamsi MB, Imam SN, Dada R, 2011. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28, 11, 1073-85.
- Shayeb AG, Bhattacharya S, 2009. Review: Male obesity and reproductive potential. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 9, 1, 7-12.
- Tournaye HJ, Cohlen BJ, 2012. Management of male-factor infertility. Best practice & research. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 26, 6, 769-75.
- Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC, 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic Pathology*, 25, 1, 82-8.
- Tunc O, Bakos HW, Tremellen K, 2011. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia*, 43, 2, 121-8.
- Vasan SS, 2011. Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian journal of urology : IJU : Journal of the Urological Society of India*, 27, 1, 41-8.
- Walczak-Jędrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczek J, 2013. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, 66, 1, 60-7.
- Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S, 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction*, 8, 11, 984-91.
- WHO, 2010. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, World Health Organization, p.
- Yan N, Shi Y, 2005. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 35-56.
- Zhivotovsky B, 2003. Caspases: the enzymes of death. *Essays in Biochemistry*, 39, 25-40.

Zini A, Libman J, 2006. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. CMAJ : Canadian Medical Association Journal, 175, 5, 495-500.



6. EKLER

EK-A: ETİK KURUL KARARI

 T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 70632468-050.01.04/
Konu : Kararlar

Sayın Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

10.02.2017 tarihli "İnfertil erkeklerde obeziteye bağlı sperm apoptozunun değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projeniz, 22.02.2017 tarihli Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Toplantısı'nda görüşülmüş olup; kurulun konu ile ilgili 2017/64 sayılı kararı ekte sunulmuştur.
Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Doç. Dr. Hüsnü ALPTEKİN
Başkan

Ek : Karar sureti

 T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2017/04	Toplantı Tarihi : 22.02.2017
--------------------------	------------------------------

Karar Sayısı 2017/64 S.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ender ERDOĞAN'ın "İnfertil erkeklerde obeziteye bağlı sperm apoptozunun değerlendirilmesi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 10.02.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr.Ender ERDOĞAN'ın "İnfertil erkeklerde obeziteye bağlı sperm apoptozunun değerlendirilmesi" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.



EK-B: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

“İnfertil erkeklerde obeziteye bağlı sperm apoptozunun değerlendirilmesi” başlıklı araştırma projesi için İnfertilite şikâyeti ile gelen kilolu hastalarda, spermdede meydana gelen oksidatif stres ve DNA hasarıyla ilişkili apoptozun değerlendirilmesi amaç edinilmiştir.

Bu proje için infertilite (kısırlık) şikâyeti ile gelen dünya sağlık örgütü standartlarına göre vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplanarak obez sınıfına giren hastalardan Üç-yedi günlük cinsel perhiz süresinin ardından, sperm örneği alınacaktır. Vücut kitle indeksi kilogram cinsinden vücut ağırlığının boy uzunluğunun karesine bölünmesi ile elde edilir. Rakamlara göre vücut kitle indeksi (VKİ) 18.5-24.9 kg/m² arasında olanlar normal bireyleri oluştururken, 25-29.9 kg/m² arasında olanlar orta kilolu, 30-39.9 kg/m² arasında olanlar aşırı kilolu (obez) olarak kabul edilir.

Araştırma süresince ve sonunda hastalara bir tedavi uygulanmayacaktır.

Çalışma örneği olarak semen numuneleri kullanılacağı için bireyler açısından bir risk ve rahatsızlık söz konusu değildir.

Çalışmamız klinik bir çalışma olmadığı için bireyler açısından klinik zarar içermemektedir.

Bireylerin çalışmaya katılımı gönüllülük esasına bağlı olduğundan bireyler istedikleri bir zamanda çalışmadan çıkarılmalarını talep edebilir.

İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar kesinlikle gizli tutulacaktır. Kişilerin sadece laboratuvar verileri kullanılacaktır. Araştırma sonuçlarının yayınlanması halinde dahi gönüllünün kimliği kesinlikle gizli kalacaktır.

Araştırmanın süresi 8 ay olarak planlanmıştır.

Araştırmaya 20 kilolu ve 20 normal kilolu birey dahil edilecektir.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur formunda yer alan yukarıdaki açıklamaları okudum.

Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim/yetkili araştırmacı tarafından yapıldı.

Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum.

Yukarıda adı geçen araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı ve benden elde edilen semen örneklerinin bu çalışmada kullanılmasını kabul ediyorum.

Yetkili araştırmacının:

Adı/Soyadı :

İmzası :

Gönüllünün:

Adı/Soyadı :

İmzası :

Yasal temsilcisinin(gerekirse):

Adı/Soyadı :

İmzası :

Not: araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bunlara günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları:

Yardımcı Araştırmacı:

Ad/Soyadı: Nazlı Gök

Telefon:

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılı Kırıkkale doğumludur. İlk, ortaokul eğitimlerini Yozgat/Yerköy’de, lise eğitimini Ankara’da tamamladı. Üniversite eğitimini Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen/Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde aldı. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD yüksek lisans eğitimine başlamıştır, fakat çeşitli nedenlerden dolayı devam edememiştir. Çıkan af kapsamında yararlanıp 2015 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD’na tekrar dönüş yapmıştır.

