



T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI



MİTOKONDRIYAL DNA'NIN D-LOOP BÖLGESİNİN METİLASYONUNUN
SPERM HAREKETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. BİRGİ ERCİLİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. K. EMRE AKKUŞ

İSTANBUL – 2021

T. C.
İSTANBUL-ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

MİTOKONDRIYAL DNA'NIN D-LOOP BÖLGESİNİN METİLASYONUNUN
SPERM HAREKETİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. BİRGİ ERCİLİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. K. EMRE AKKUŞ

İSTANBUL – 2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle beni bugün donanımlı bir üroloji uzmanı olarak yetiştiren başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. N. Ahmet ERÖZENCİ olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hamdi ÖZKARA'ya, Sayın Prof. Dr. Bülent ÖNAL'a, Sayın Prof. Dr. Emin ÖZBEK'e, ayrıca kısa çalışma sürecinde kendilerinden çok şey öğrendiğim emekli öğretim üyelerimizden Sayın Prof. Dr. Veli YALÇIN'a ve Prof. Dr. Zübeyr TALAT'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez sürecimin her aşamasında yanımda olan, her daim yol gösteren, hem mesleki hem sosyal gelişimimde büyük katkısı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. K. Emre AKKUŞ'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez sürecimde hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, tezimin oluşmasında büyük emekleri olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. İlhan ONARAN'a ve Dr. Ayla KARİMOVA'ya, örneklerin toplanmasında ve incelenmesinde büyük özveri gösteren biyoloğumuz Tayyar DEMİRYÜREK'e ve asistan arkadaşlarımdan Dr. Ahmet VURAL ve Dr. Kadir Can ŞAHİN'e ayrıca teşekkür ederim.

Mesleki bilgisinin yanında sosyal anlamda da bizlerle arkadaş gibi olan, cerrahi açıdan kendisinden çok şey öğrendiğim sevgili ağabeyim Doç. Dr. Çetin DEMİRDAĞ'a ve kendisiyle çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili ağabeyim Doç. Dr. Sinharib ÇİTGEZ'e teşekkür ederim.

Her zaman beyefendi kişiliğiyle kendime örnek aldığım, bilgi ve görgüsü tartışılmaz saygıdeğer ağabeyim Uzm. Dr. Nejat TANSU'ya ayrıca teşekkür ederim.

Kendileriyle daha uzun süre çalışabilmiş olmayı dilediğim yeni uzmanlarımız Uzm. Dr. Elif ALTINAY KIRLI'ya ve Uzm. Dr. Mehmet Hamza GÜLTEKİN'e, Uzm. Dr. Hüseyin BEŞİROĞLU'na ayrıca kısa bir süre kendisiyle çalıştığım Uzm. Dr. Ali SEZER'e teşekkür ederim.

Kendilerinden çok şey öğrendiğim sevgili kıdemlilerim Uzm. Dr. Fethi Ahmet TÜREGÜN'e, Uzm. Dr. Oktay ÖZMAN'a, Uzm. Dr. Berin SELÇUK'a, Uzm. Dr. Muhammed Fatih ŞİMŞEKOĞLU'na, Uzm. Dr. Fahri Yavuz İLKİ'ye, Uzm. Dr. Emre BÜLBÜL'e, Uzm. Dr. Uğur AFERİN'e ve Uzm. Dr. Ahmet GÜRBÜZ'e teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, zorlu asistanlık sürecini çekilir kılan, beraber yorulup beraber eğlendiğimiz sevgili asistan kardeşlerim Dr. Ömer YILDIRIM'a, Dr. Engin DEREKÖYLÜ'ye, Dr. Mustafa ÖZKAYA'ya, Dr. Sami Berk ÖZDEN'e, Dr. Göktuğ KALENDER'e, Dr. Muhammet DEMİRBİLEK'e, Dr. Ahmet VURAL'a, Dr. Kadir Can ŞAHİN'e, Dr. Alper OKUR'a ve Dr. Feyyaz IRMAK'a teşekkür ederim.

Ameliyathanede kendilerinden çok şey öğrendiğim, bana bir anne gibi olan sevgili ablalarım Hemşire Demet SELÇUK'a ve Hemşire Nazlı KÜPCÜK BÜYÜKTERZİ'ye, personel Murat ÜNLÜSOY'a, uzun asistanlık hayatım boyunca hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, uyumlu ve huzurlu çalışma ortamının oluşmasını sağlayan tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak beni yetiştirip bugünlere getiren, eğitim hayatım boyunca her daim desteklerini yanımda hissettiğim sevgili aileme, neşe kaynaklarım biricik yeğenlerim Ecrin ve Öykü'ye, özellikle zorlu pandemi döneminde bana bir arkadaş olan, iyi insan olmanın şartlarından olduğuna inandığım hayvan sevgisini içime aşıl原因, bir tanecik kedim oğlum Leo'ya teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla
Dr. Birgi ERCİLİ
İstanbul, Haziran '21

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	İİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Vİİ
ETİK KURUL ONAYI.....	Vİİİ
FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ.....	İX
ÖZET	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ERKEK İNFERTİLİTESİNE GENEL BAKIŞ	3
2.2. ERKEK ÜREME SİSTEMİ.....	6
2.3. SPERM HÜCRESİ VE SPERMATOGENEZ.....	10
2.4. SEMEN VE SEMEN ANALİZİ	12
2.5. ATP ÜRETİMİ VE MİTOKONDİRİ	15
2.6. SPERM MOTİLİTE BOZUKLUKLARI	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. ÇALIŞMA GRUBU GENEL BİLGİLER	21
3.2. YÖNTEM.....	22
3.3. İSTATİKSEL ANALİZ	29
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA	35
KAYNAKLAR	39
FORMLAR	45
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	47
ÖZGEÇMİŞ	49

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Semen in karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri	5
Tablo 2.2. Spermatozoada ATP üretim yolu ve işlevleri	16
Tablo 4.1. Çalışmaya alınan hastaların demografik verileri	30



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Testisi saran yapılar	7
Şekil 2.2. Epididimin bölümleri	8
Şekil 2.3. Salgı yapan bezler	9
Şekil 2.4. Spermatozoanın bölümleri	10
Şekil 2.5. Aksonem yapısı	11
Şekil 2.6. Spermatogenezin evreleri	12
Şekil 2.7. Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi	14
Şekil 2.8. Anormal şekilli spermatozoa örnekleri	15
Şekil 2.9. Spermatozoa bölümleri ve enerji üretim yollarıyla ilişkisi	16
Şekil 2.10. Mitokondri yapısı	18
Şekil 2.11. Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve D-loop bölgesi	19
Şekil 4.1. Kontrol ve astenospermi gruplarının spermatozoasındaki ATP düzeyleri	Hata!
Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 4.2. Kontrol ve astenospermi gruplarının spermatozoasındaki mitokondri D-loop metilasyon oranı.....	32
Şekil 4.3. Çalışmaya katılan bireylerin kişisel verilere göre spermatozoasındaki mitokondri D-loop metilasyon oranı.....	32
Şekil 4.4. Kontrol ve astenospermi gruplarının spermatozoasındaki mitokondriyal DNA kopya sayısı.....	33
Şekil 4.5. Çalışmaya katılan bireylerin kişisel verilere göre spermatozoasındaki mitokondriyal DNA kopya sayısı	33
Şekil 4.6. Spermatozoadaki mitokondri D-loop metilasyon oranı ile ATP miktarları arasındaki korelasyonların analizi	34

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AMH:** Anti-Müllerian hormon
- ASA:** Antisperm antikorlar
- ATP:** Adenozin trifosfat
- bç:** Baz çifti
- CFTR:** Kistik fibrozis transmembran regülatör
- CpG:** Sitozin-fosfat-guanin
- dk:** Dakika
- DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü
- FSH:** Follikül Stimulan Hormon
- GAPDS:** Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz-S
- GLUTs:** Glukoz taşıyıcıları
- IM:** İmmotilite (Hareketsiz)
- LH:** Luteinizan Hormon
- M:** Mol
- MD-EEA:** Metilasyona Duyarlı Erime Eğrisi Analizi
- mM:** Milimol
- ml:** Mililitre
- mtDNA:** Mitokondriyal DNA
- nm:** Nanometre
- NP:** Non-progresif motilite (Yerinde hareket)
- PBS:** Phosphate-buffered saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
- PR:** Progresif motilite (İleri hareket)
- PZR:** Polimeraz zincir reaksiyonu
- ROS: Reaktif oksijen türleri
- sn:** Saniye
- TRUS:** Transrektal ultrasonografi
- µl:** Mikrolitre

ETİK KURUL ONAYI

İÜC Tarih ve Sayı: 09/05/2019-71346



T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Uzm.Öğr.Dr.Birgi ERCİLİ'nin
etik kurul karar A-30

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :16.04.2019 tarih, 21263603-806.01.03-59769 sayılı yazı

Anabilim Dalımız öğretim üyesi Prof.Dr.Kadir Emre AKKUŞ'un danışmanlığında Uzm.Öğr.Dr.Birgi ERCİLİ'nin yürütücülüğünde Prof.Dr.İlhan ONARAN ve Dr.Ayla KARİMOVA'nın yardımcılıklarında "Mitokondriyel DNA'nın D-loop Bölgesinin Metilasyonunun Sperm Hareketi Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı Uzmanlık Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 07 Mayıs 2019 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Gökhan İPEK
Bölüm Başkanı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/en/vislon.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE84EK726>

Ayrıntılı bilgi için iribat : Guler SOYDANER Dahili : 22300

Istanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL

Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33

e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr

FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ

Bu tez çalışması, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin desteği ile gerçekleştirilmiştir (Proje Kodu: TTU-2019-33944).



ÖZET

Amaç: Sperm motilite bozukluğu erkek infertilitesinin nedenlerinden biridir. Sperm hareketi için gerekli olan adenozin trifosfatın (ATP) bir kısmı spermatozoa mitokondrisinde üretilir. Mitokondriyal genlerin ekspresyonunu düzenlemekte önemli bir rolü olan ve mitokondri genomunda yer alan D-loop bölgesinin CpG bazlarının metile olabildiği ve bunun bazı patolojilerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada astenospermik infertil erkek bireylerin spermatozoalarında D-loop bölgesinin metilasyon düzeyleri ile bunun ATP düzeyleri üzerindeki ilişkileri incelemiştir.

Gereç ve Yöntem: Mart 2020 – Şubat 2021 tarihleri arasında kliniğimize başvuran 24 kontrol (normospermik), 25 hasta (astenospermik) olmak üzere toplam 49 olgu çalışmaya dahil edildi. Olgulardan alınan semen örneklerinden elde edilen spermatozoaların mitokondriyal DNA'larından (mtDNA) bisülfid modifikasyon sonrası metilasyon spesifik gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulaması ile D-loop metilasyon oranı ve mtDNA kopya sayıları tespit edildi. D-loop metilasyon oranı ve mtDNA kopya sayısı, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile tespit edildi. Hücre içi ATP seviyeleri ise kemilüminesans yöntemi ile ölçüldü.

Bulgular: Çalışmaya alınan semen örneklerinden elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, astenospermi grubunun spermatozoalarında kontrol grubuna kıyasla D-loop metilasyon oranı %86 daha fazla saptanmıştır ($p<0,05$). Yine astenospermi grubunun spermatozoalarında mtDNA kopya sayısı, kontrol grubuna kıyasla %44 fazla bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak her iki grubun spermatozoalarındaki hücre içi ATP düzeyleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Aynı zamanda Spearman korelasyon analizleri, ilgili artışların spermatozoa ATP düzeyleri ile ilişkili olmadığını da göstermektedir ($p>0,05$).

Sonuç: Çalışmamızın sonuçlarına göre, astenospermik vakaların spermatozoalarında D-loop bölgesinde metilasyon artışı ile birlikte mtDNA kopya sayısında artışın da olduğu belirlenmiş, ancak bunun hücre içi ATP düzeyleri ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Astenospermik vakalarda bu metilasyon artışının nedenleri ve sonuçlarının daha net bir şekilde ortaya konabilmesi için daha ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: astenospermi, mitokondriyal DNA, D-loop bölgesi, metilasyon

ABSTRACT

Aim: Sperm motility disorder is a condition that may cause male infertility. Some of the adenosine triphosphate (ATP) required for sperm motility is produced in the mitochondria of the spermatozoa. It has been reported that the CpG bases of the D-loop region in the mitochondrial genome, which have an important role in regulating the expression of mitochondrial genes, can be methylated and this is associated with some pathologies. In this study, the relationship between methylation levels of the D-loop region and ATP levels in the spermatozoa of asthenospermic infertile male individuals was investigated.

Material and Method: A total of 49 cases, including 24 controls (normospermic) and 25 patients (asthenospermic) cases who admitted to our outpatient clinic between March 2020 and February 2021, were included in the study. D-loop methylation rate and mtDNA copy numbers were determined from mitochondrial DNA (mtDNA) of spermatozoa obtained from semen samples taken from the subjects, by methylation-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) application after bisulfite modification. Intracellular ATP levels were measured by chemiluminescence method.

Results: When the data obtained from the semen samples included in the study were evaluated statistically, the D-loop methylation rate was 86% higher in the spermatozoa of the asthenospermia group compared to the control group ($p < 0,05$). In addition, the mtDNA copy number in the spermatozoa of the asthenospermia group was 44% higher than the control group. ($p < 0,05$). However, no significant difference was observed between the intracellular ATP levels in the spermatozoa of both groups ($p > 0,05$). At the same time, Spearman correlation analyzes show that the respective increases are not related to spermatozoa ATP levels ($p > 0.05$).

Conclusion: As results of our study, it was determined that there was an increase in mtDNA copy number along with an increase in methylation in the D-loop region in the spermatozoa of asthenospermic cases, but it was shown that this was not related to intracellular ATP levels. Further studies are needed to clearly reveal the causes and consequences of increased methylation in asthenospermic cases.

Keywords: asthenospermia, mitochondrial DNA, D-loop region, methylation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %15'i infertil olup bunların yaklaşık %50'sinden erkek infertilitesi sorumludur (1). Erkek infertilitesine sebep olabilecek etkenler; semen parametrelerindeki bozukluklar, konjenital veya edinsel ürogenital anomaliler, ürogenital enfeksiyonlar, varikosel, endokrin bozukluklar, genetik anomaliler ve immünolojik etkenlerdir. Erkek infertilitesinin nedenlerinden biri olan sperm motilite bozukluğuna ise astenospermi denir.

Spermatozoa fertilizasyonun erken evresinde flajellar hareketler için adenozin trifosfat (ATP) kullanır. Spermin ara bölgesinde, ortalama 70-80 mitokondri bulunur (2). Bu bölgedeki mitokondrilerin her birinde de kopya mitokondriyal DNA (mtDNA) bulunur. Mitokondriyal biyoenerji sperm hareketliliği için önemli olduğundan dolayı, mitokondrideki kalitatif ve kantitatif farklanmalar, spermatozoadaki hücresel fonksiyonları etkiler (3). Erkek infertilitesinde mitokondrinin biyoenerjisi oldukça önemlidir. Bu nedenle de mitokondri mutasyonları sperm motilitesinde önemli rol oynamaktadır.

Mitokondri ayrı bir genoma sahiptir. Çift zincirli olan mitokondriyal genom, ağır (H) ve hafif (L) olmak üzere iki zincirden oluşur, mtDNA'nın ufak bir bölümü üç zincirli DNA yapısındadır. Bu üçüncü zincir (7S DNA), ağır zincirin kısa bir segmentinin tekrarlayan sentezinden kaynaklanır. Bu üç zincirden oluşan alana "D-loop (displacement loop-kontrol bölgesi) bölgesi" denir (4).

Sperm DNA metilasyonu düzeyi ile sperm konsantrasyonu ve motilitesi arasında anlamlı bağlantı bulunmuştur. Son yıllardaki çalışmalar D-loop bölgesindeki metilasyonların başta gen ifadesinin düzenlenmesi olmak üzere, birçok süreçte rol alan epigenetik bir belirteç olarak kullanılabilirliği bildirmektedir (5). Literatürde mtDNA D-loop bölgesinin metilasyon değişiklikleri ile çeşitli patolojiler ve hastalıklar arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (6-8). Sınırlı sayıdaki çalışmalarda D-loop bölgesinin sperm mitokondrisindeki metilasyon durumu araştırılmıştır (9). Astenospermideki motilite bozukluğunun ATP'ye bağımlılığını dikkate alırsak, D-loop veya mtDNA genlerinin sitozin-fostaf-guanin (CpG) bölgelerinde bir metilasyon artışı olduğu ve bunun da ATP seviyelerini kritik bir seviyeye ulaştırarak ilgili patolojiden sorumlu olması beklenebilir. Araştırdığımız kadarıyla bu konuyla alakalı olarak,

astenospermi ile D-loop bölgesi ve mtDNA genlerinin metilasyon durumunu irdeleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, mtDNA D-loop metilasyonunun sperm motilitesinin üzerindeki etkisini araştırmaktır. Dolayısıyla çalışmamızdan çıkabilecek sonuçlardan astenospermide mitokondrinin rolünün ne olduğuna dair daha açıklayıcı bulgular elde edilebileceği düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek İnfertilitesine Genel Bakış

2.1.1. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tanımına göre infertilite, 12 ay veya daha uzun süreyle düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrasında klinik bir gebelik elde etmedeki yetersizlik olarak tanımlanan bir üreme sistemi hastalığıdır (10). Primer infertilite korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen 12 ay sonra bile hamile kalamamak ve daha önce biyolojik olarak çocuk sahibi olamamak olarak tanımlanmaktadır. Sekonder infertilite ise aynı veya farklı seksüel partnerden bir veya daha fazla biyolojik çocuğun doğumundan bir süre sonra gebelik sağlanamaması olarak tanımlanmaktadır (11).

Dünya genelinde infertiliteyle karşılaştığı düşünülen 580 milyon insanın (çiftlerin %5-8'i) yaklaşık 372 milyonu Çin hariç olmak üzere gelişmekte olan ülkelerde bulunmaktadır (12). Birçok gelişmiş ülkede 12 aylık prevalans sınırları %3.5 ile %16.7 arasında, az gelişmiş ülkelerde de %6.9-9.3 arasında değişmekte ve toplam median prevalansın %9 olduğu tahmin edilmektedir (13). Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması 2008 yılı verilerine göre Türkiye'de indirekt verilerle (15-49 yaş üreme çağında çocuğu olmayan evli kadınların sayısı) hesaplanan infertilite prevalansı %2'nin altındadır.

2.1.2. Etiyoloji

Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %15'i infertilite problemi yaşamaktadır. Olguların %30'undan tek başına erkek faktörü sorumluyken %20'sinde hem kadın hem erkek faktörü beraber bulunur. Dolayısıyla infertil çiftlerin yarısından genellikle anormal semen parametrelerinin eşlik ettiği erkeğe ait bir faktör sorumludur (14). Bu nedenle infertil çiftlere ait tüm erkek hastalar, bir ürolog tarafından tıbbi değerlendirilmeden geçirilmelidir.

Erkek infertilitesinde rol oynayan başlıca faktörler şunlardır:

- Ürogenital anomaliler
- Ürogenital enfeksiyonlar
- Gonadotoksik maruziyet (kemoterapi, radyoterapi, kimyasal ajanlar vs.)

- Malignite
- Skrotal ısı artışı (örn. varikozel)
- Genetik anomaliler
- Hormonal faktörler
- İmmünolojik faktörler

Olguların %30'unda fizik muayene ve laboratuvar bulguları normaldir ve etken olarak herhangi bir faktör saptanamaz. Buna idiopatik veya açıklanamayan erkek infertilitesi denir (15). 10,469 hasta ile yapılan bir çalışmada idiopatik dışında erkek infertilitesinde en sık görülen üç neden; varikozel (%14.8), hipogonadizm (%10.1) ve inmemiş testistir (%8.4) (16).

Erkek infertilitesinde risk faktörleri ise ileri yaş, obezite, sigara-alkol tüketimi, cinsel yolla bulaşan hastalıklar gibi durumlardır.

2.1.3. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

Bir infertilite olgusunda erkek ve kadının hem ayrı ayrı ve sonrasında da birlikte değerlendirilmesi en önemli prensiptir. İnfertil erkeğin değerlendirilmesine öncelikle öykü, fizik muayene ve semen analizleri ile başlanır. İnfertilite etiyojisini saptamak için ek semen analizleri, endokrin değerlendirme, radyolojik görüntüleme ve genetik incelemeler yapılabilir.

Hastanın anamnezinde infertilitenin süresi, cinsel yaşam öyküsü, varsa önceki gebelikler, kadın faktörü sorgulaması yapılmalıdır. İnmemiş testis öyküsü, testiküler torsiyon veya travma öyküsü, genitoüriner enfeksiyonlar, geçirilmiş skrotal cerrahiler, eşlik eden hastalıklar ve tedavileri, uzun süre kullanılan ilaçlar mutlaka sorgulanmalıdır.

Fizik muayeneye hastanın genel görünümü ve sekonder seks karakterlerinin incelenmesi ile başlanır. Genital muayenede özellikle inmemiş testis varlığı ve testis volümü dikkatle incelenmelidir. Epididim ve vas deferensler kontrol edilmeli, varikozel varlığı hem ayakta hem de yatarak muayene ile araştırılmalıdır.

İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde öykü ve fizik muayeneden sonra ilk istenilecek laboratuvar testi semen analizidir. Semen analizinde bir sorun varsa bir ay

aralıklarla mümkünse en az iki adet semen analizi yapılmalıdır. DSÖ insan semeni analizlerinin standardize edilmesi için ilk kez 1980 yılında “WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (DSÖ İnsan Semeni İncelenmesi ve İşlemlerden Geçirilmesi Laboratuvar El Kitabı)” adlı el kitabını yayınlamıştır. 2010 yılında yayınlanan 5. basımdaki semen analizi değerleri Tablo 2.1’de verilmiştir (17).

Tablo 2.1: Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri

Parametre	Alt referans limiti
Semen hacmi (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Toplam sperm sayısı (10^6 /ejakülat)	39 (33–46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 /ml)	15 (12–16)
Toplam motilite (İleri hareket (PR) + Yerinde hareket (NP), (%))	40 (38–42)
İleriye doğru hareketlilik (PR, %)	32 (31–34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55–63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3,0–4,0)
pH	$\geq 7,2$
Peroksidaz pozitif lökositler (10^6 /ml)	$< 1,0$

Bu tabloya göre belirtilen referans değerlerin altında olan semen analizi anormallikleri ise şöyle isimlendirilir:

- **Normospermi:** Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat
- **Oligospermi:** Referans değerlerden düşük sperm konsantrasyonu
- **Astenospermi:** Referans değerlerden düşük motilite yüzdesinin olması
- **Teratospermi:** Referans değerden düşük morfoloji yüzdesinin olması
- **Oligoastenoteratospermi:** Sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji değerlerinin hepsinin referans değerlerden düşük olması
- **Kriptospermi:** Ejakülatta sperm izlenmezken, santrifüj sonrası pellette sperm izlenmesi
- **Nekrospermi:** Ejakülatta yüksek oranda immotil ve az sayıda canlı sperm çıkması
- **Azospermi:** Ejakülatta hiç sperm olmaması
- **Aspermi:** Ejakülat elde edilememesi

Hipotalomo-hipofizer-gonadal aksın değerlendirilmesi spermatogenez hakkında önemli ve değerli bilgiler verebilir. Bu nedenle anormal semen parametreleri olan erkeklerde, erektil disfonksiyon ve cinsel istekte azalma gibi yakınmaları olan hastalarda sabah saatlerinde Follikül Stimülant Hormon (FSH), Luteinizan Hormon (LH), prolaktin, total/serbest testosteron ölçümleri yapılmalıdır.

İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde radyolojik görüntüleme en sık parsiyel veya komplet duktal obstrüksiyonların araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu amaçla skrotal renkli Doppler ultrasonografi, transrektal ultrasonografi (TRUS), vazografi gibi tetkikler uygulanır.

Şiddetli oligospermili (<5 milyon/ml) veya non-obstrüktif azospermili olgulara mutlaka karyotip ve Y kromozom mikrodelsiyon analizi önerilmelidir (18). Palpe edilemeyen vaz deferensisi olan erkeklerde ve partnerlerinde kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) gen mutasyonu mutlaka araştırılmalıdır. Partnerde de pozitif ise mutlaka genetik danışmanlığa yönlendirilmelidir.

2.2. Erkek Üreme Sistemi

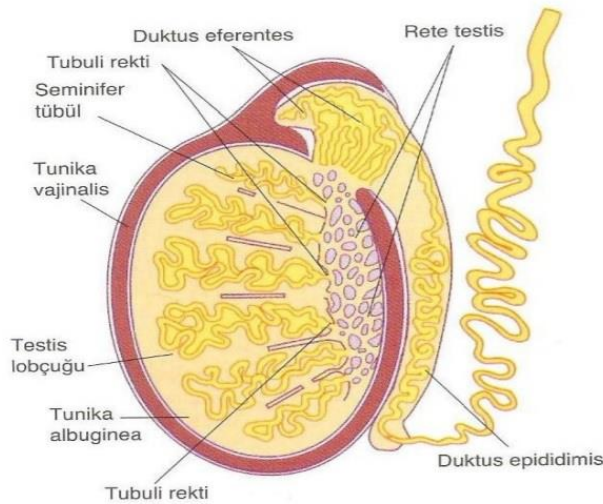
Erkek üreme sistemi testisler, sperm taşıyan kanallar ve salgı yapan bezler olmak üzere üç ana bölümden meydana gelir. Bunun dışında erkek üreme sistemi anatomik olarak dış ve iç genital organlar olarak ikiye ayrılabilir.

- **Dış genital organlar:**
 - Penis
 - Skrotum
- **İç genital organlar:**
 - Testis
 - Epididim
 - Spermatik kord
 - Duktus deferens (vas deferens)
 - Duktus ejakulatorius
 - Prostat
 - Seminal vezikül
 - Bulboüretal bezler (Cowper bezleri)

2.2.1. Testis

Primer üreme organı olan testisler skrotum içindedir ve spermatik korda asılı durumda bulunur. Ağırlıkları 10-14 gramdır ve boyut olarak 4 cm uzunlukta, 2,5 cm genişlikte ve 3 cm kalınlığındadır. Spermatozoa denilen erkek cinsiyet hücrelerini ve erkeklik karakterini sağlayan testosteron hormonu yapımını gerçekleştirmektedir. Normal karın içi sıcaklıkta fonksiyon göstermeyip vücut ısısından 2-3 °C kadar daha düşük ısıda sperm üretirler.

Testisi dıştan içe tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa adlı katmanlar sarar (Şekil 2.1). Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşır ve bezin içine giren septumlarla testisi yaklaşık 250 piramidal bölmeğe ayırır. Her bölmede gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül bulunmaktadır. Bu gevşek bağ dokusu içinde Leydig hücreleri, seminifer tübüllerin duvarlarında bazal lamina üzerinde ise Sertoli ve germ hücreleri bulunur. Leydig hücreleri testosteron salgılamak, seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinden Anti Müllerian Hormon (AMH), germ hücrelerinden spermatozoa üretilir. Bu tübüller rete testise açılarak içeriklerini boşaltırlar. Spermatozoa buradan sırasıyla duktus efferentese, epididime ve duktus deferense gelir.



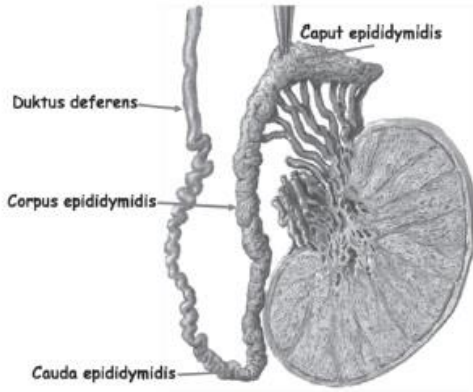
Şekil 2.1: Testisi saran yapılar

2.2.2. Sperm Taşıyan Kanallar

Sperm taşıyan kanallar; epididim, duktus deferens (vas deferens), duktus ejakulatorius ve üretradan oluşur.

Epididim, testisin üst arka kısmında bulunur. Spermatozoa fonksiyonel olgunluğa burada erişmekte, hareket yeteneklerini burada kazanmakta ve bir bölümü burada depo edilmektedir. Epididim yaklaşık 4 cm uzunluğunda tek bir kanal yumağıdır. Daha sonra kanalcıklar birleşerek tek bir kanal (duktus epididimisi) meydana getirirler. Yumak açıldığında uzunluğu 6 metreyi geçer. Epididimin; caput epididimisi, corpus epididimisi ve cauda epididimisi olarak üç bölümü vardır (Şekil 2.2).

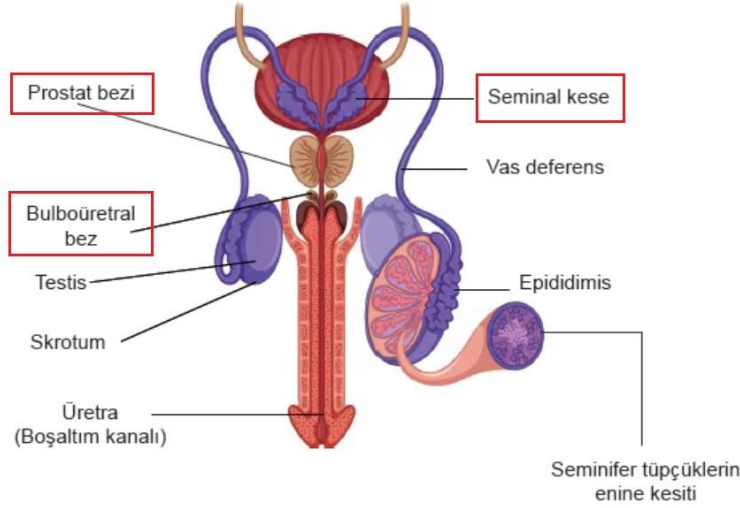
Duktus deferens (vas deferens), cauda epididimisinin kalınlaşarak devam etmesiyle oluşur. Yukarıya doğru yönelip funikulus spermaticus içerisinde inguinal kanaldan geçerek karın boşluğuna girer ve mesanenin alt arka yüzüne gelir. Burada ampulla duktus deferentis denilen bir genişleme gösterir ve seminal veziküllerin kanalı olan duktus ekskretorius ile birleşerek duktus ejakulatorius olarak prostatik üretraya açılır. Ejakülat (semen), üretradan dışarı atılır. Spermatozoanın büyük bölümü duktus deferenste depo edilir. Epididim ve duktus deferenste yaklaşık bir ay süreyle fertil kalabilir. Eğer bir ay içinde ejakülasyonla atılmazsa, dejenere olur ve vücut tarafından absorbe edilirler.



Şekil 2.2: Epididimin bölümleri

2.2.3. Salgı Yapan Bezler

Salgı yapan bezler; prostat, seminal vezikül ve bulboüretral bezlerden (Cowper bezleri) oluşur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Salgı yapan bezler (kırmızı kutucuk ile işaretli olanlar)

Prostat; mesanenin altında ve rektumun önünde yer alan, kestane şekli ve büyüklüğünde, yaklaşık 20 gr ağırlığında, düz kas lifleri, bağ dokusu ve bez dokusundan yapılmış bir organdır. Tepe kısmı (apeks) aşağıda, tabanı (bazis) ise yukarıda yerleşmiştir. Bezin boşaltıcı kanalları prostatik üretraya açılırlar. Salgısı günlük 0,5 ml kadardır ve ejakülataın %15-25 kadarını oluşturur. Ovumun döllenmesini sağlamak üzere alkalin (bazik) yapıdadır. Rektumdan yapılacak bir muayene ile prostat ele gelebilir.

Seminal vezikül; mesanenin arka alt tarafında yerleşmiş tubüler yapıda bir çift bezdir. Duktus ekskretorius adlı kanalı duktus deferens ile birleşerek duktus ejakulatorius adlı kanalları oluşturur ve bu kanallar prostatik üretraya açılır. Ejakülataın en büyük bölümünü bu bezin salgısı oluşturur (yaklaşık %60). Fruktoz, sitrik asit, fibrinojen, prostaglandinler ve spesifik proteinleri içeren salgısı, spermatozoayı aktive eder. Ek olarak kadın genital traktusunda immünsupresif bir etkiye sahip olduğundan fertilizasyonda önemlidir.

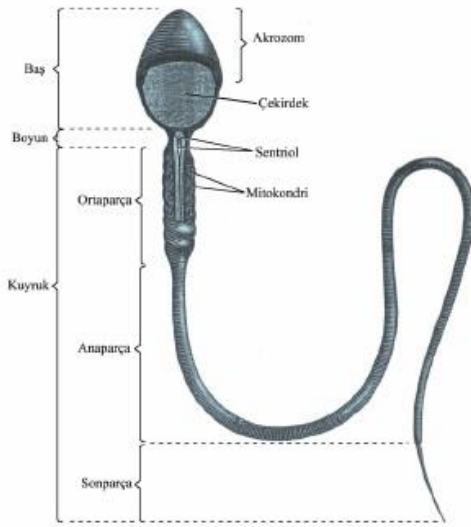
Bulboüretral bezler (Cowper bezleri); membranöz üretra'nın her iki tarafında bezelyeye benzer, bir cm çapında, sarı renkli bir çift bezdir. Kanalları bülböz üretraya

açılır ve müköz bir salgısı vardır. Bu salgı, seksüel uyarı sırasında üretraya girer ve üretra içinde kalmış idrarı nötralize eder. Seksüel uyarı sırasında ilk olarak bu bez aktive olur. Penis ucunda berrak olarak görülen salgı, bu beze aittir.

2.3. Sperm Hücresi ve Spermatogenez

2.3.1. Sperm Hücresinin Yapısı

Sperm hücresi (spermatozoa), yaklaşık 60 mikron boyunda olup baş kuyruk olmak üzere iki bölümden oluşur. Baş ve kuyruk arasında bir boyun bölgesi (sperm bağlantı parçası) vardır. Kuyruk bölümü ise orta parça, ana parça ve son parçadan oluşur (Şekil 2.4). Tüm spermatozoa polipeptid ve lipidden oluşmuş bir plazma membranı ile çevrilidir.

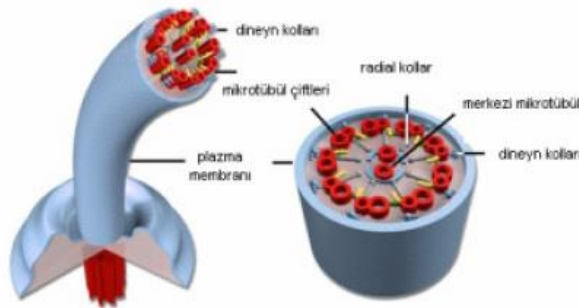


Şekil 2.4: Spermatozoanın bölümleri

Başın büyük kısmını nükleus oluşturur ve 2/3 ön kısmı akrozom denilen bir kılıf ile örtülmüştür. Akrozom özel bir tip lizozom olarak kabul edilir ve içinde hidrolitik enzimler bulunur. Bu enzimler döllenme sırasında spermin oosite girişini kolaylaştırır (akrozom reaksiyonu). Boyun bölgesi (sperm bağlantı parçası), bir çift sentriyolün bulunduğu dar bir parçadır.

Kuyruğu oluşturan ilk parça olan orta parça; sarmal olarak dizilmiş mitokondrilerin oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet kolondan oluşur. Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. Fibröz kılıf ve aksonemden oluşur. Son parça ise sadece aksonemden oluşan kısa bir parçadır.

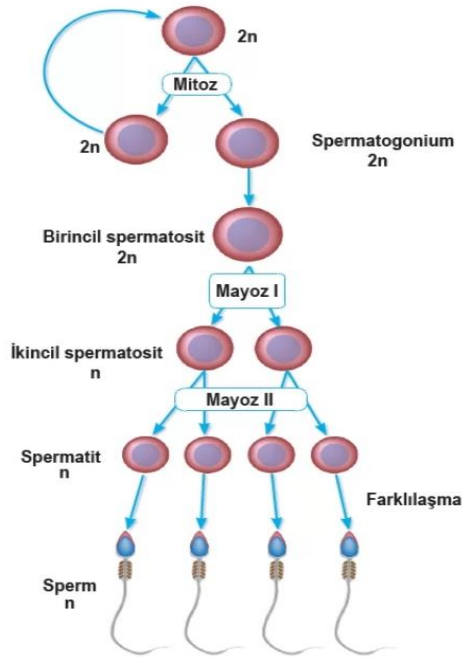
Aksonem, spermatozoada hareketin oluşumunu sağlayan temel yapıdır. Dışta 9 adet tübülün dimerleri bulunur ve bunlar radyal uzantılarla merkezdeki santral mikrotübüle bağlanırlar, böyle 9+2 düzeninde bir mikrotübül yapısı oluşur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Aksonem yapısı

2.3.2. Spermatogenezin Evreleri

Ana sperm hücresi olan spermatogoniumlardan olgun sperm hücresinin meydana gelmesine kadarki sürece spermatogenez denir. Gonositler doğumdan sonra 3. ayda çoğalarak diploid (2n) spermatogoniumları meydana getirir. Puberteyle beraber gonodotropik hormonların etkisiyle spermatogoniumlar primer spermatositlere farklılaşmaya başlar. İlk mayotik hücre bölünmesi bu hücrelerde meydana gelir. Mayoz I tamamlandığında, bir primer spermatositten, her biri haploid (n) sayıda kromozoma sahip iki tane sekonder spermatosit oluşur. Mayoz II ile birlikte, sekonder spermatositler iki adet spermatid oluşturmak üzere bölünür. Böylece diploid (2n) sayıda kromozoma sahip primer spermatositten, her biri haploid (n) sayıda kromozoma sahip 4 adet spermatid oluşur. Daha sonra spermatidler olgun spermatozoaya dönüşür (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Spermatogenezin evreleri

Spermatogoniumdan olgun spermatozoaya kadar olan tüm bu süreç yaklaşık 64-74 gün sürer. Spermatogenez ergenlikte başlar, yaşam boyunca devam eder ve hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın uygun etkileşimine bağlıdır. FSH, Sertoli hücre fonksiyonu için gereklidir. LH ise, Leydig hücrelerinden spermatogenez için gerekli olan testosteron yapımını uyarır.

Seminifer tübüllerin etrafındaki bağ dokusunun içerdiği düz kas hücrelerinin kasılması ile spermatozoa pasif olarak epididime taşınır. Spermatozoa burada motilitesini ve oositi tanıyıp ona tutunabilme yeteneğini kazanır, buna da spermin olgunlaşması denir.

2.4. Semen ve Semen Analizi

2.4.1. Semen (Ejakülât)

Epididim, duktus deferens, seminal vezikül, prostat ve bulboüretal bezlerin salgılarının karışımıyla oluşan ve içinde spermatozoayı barındıran sıvıdır. Yaklaşık 3-4 ml olup 300-400 milyon adet spermatozoa içerir. Semen %10'unu spermatozoa, geriye

kalan %90'lık kısmını da bezlerin salgıları oluşturur (%60 seminal vezikül, %30 prostat, %10 duktus deferens ve bulboüretral bezler).

Semenin içeriğinde fruktoz, C vitamini, inositol, bakır, çinko, magnezyum, prostaglandinler gibi birçok madde bulunur. Semen kokusunu testislerde üretilen aminler verir.

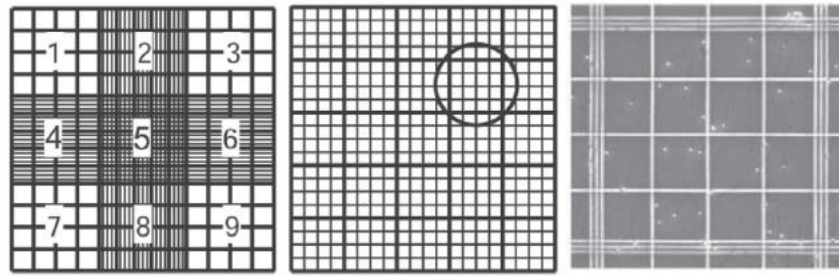
2.4.2. Semen Analizi (Spermiyogram)

Semen analizi için verilmesi gereken numune; sıcaklık değişimlerini ve zaman kaybını önlemek için laboratuvar yakınındaki özel bir odada, ideali 3-7 günlük bir cinsel perhiz sonrasında verilmelidir. Semen önce makroskopik olarak değerlendirilmeli, sonra mikroskopik değerlendirmeye geçilmelidir.

- **Makroskopik değerlendirme:**
 - **Likefaksiyon:** Semen toplama kabında önce yarı katı koagulum şeklindedir. Prostatik proteazlar tarafından koagulum parçalanarak semen sıvı hale gelir. Bunun için numune kabı 37 °C'lik bir inkübatörde bekletilmelidir. Semen genellikle 15 dk içinde likefiye olur.
 - **Semen viskozitesi:** Likefaksiyon sonrası semen kabın içinden pipet yardımıyla alınarak damlamaya bırakılır. Eğer oluşan damla 2 cm'den uzun iplikçik oluşturuyorsa viskozite artmıştır.
 - **Ejakülatın görünümü:** Normal likefiye olmuş semen numunesi homojen, gri-opelesan bir görünüme sahiptir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse, daha az opak bir görünüm alabilir, hemospermi varsa kırmızı-kahverengi görünebilir.
 - **Semen hacmi:** En iyi hacim ölçümü, numune kabının tartılmasıyla yapılır. Semen dansitesi 1 gr/ml olarak kabul edilerek semenin hacmi hesaplanır (19). Alt referans sınırı 1,5 ml'dir (17).
 - **Semen pH'ı:** Likefaksiyondan sonraki 30 dk içinde ölçülmelidir. Alt referans sınırı 7,2'dir (17).

- **Mikroskopik değerlendirme:**

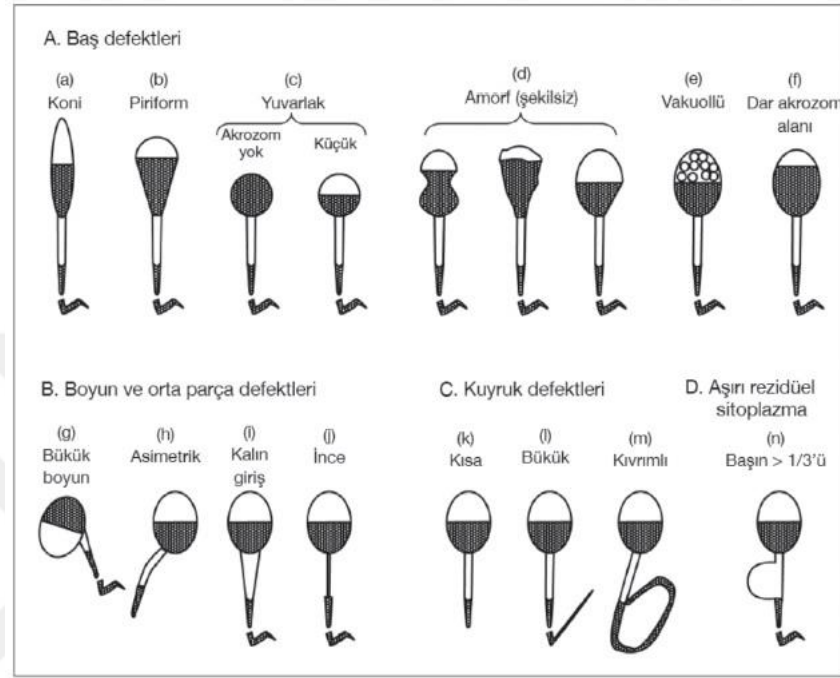
- **İlk inceleme:** Faz kontrast mikroskobu kullanılır. Lam üzerine 10 mikrolitre semen konulur. Önce x100 büyütme, sonra x200 ve x400 büyütme altında örnek değerlendirilir.
- **Sperm sayısı:** Öncelikle gerekli olan dilüsyon oranı belirlenerek semen seyreltici fiksatif hazırlanır. Semen dilüe edildikten sonra sayım kamaralarına yerleştirilir. Bunun için en çok DSÖ'nün de önerdiği "Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi" kullanılır (Şekil 2.7) (17). Aynı semenden en az 2 dilüsyon hazırlanır ve en az 200 sperm sayılır. Daha sonra spermatozoa konsantrasyonu (ml'deki sperm sayısı) hesaplanır ve semendeki toplam sperm sayısı hesaplanır. Alt referans sınırı spermatozoa konsantrasyonu için 15 milyon/ml, semendeki toplam sperm sayısı için 39 milyondur (17).



Şekil 2.7: Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi

- **Sperm motilitesi:** Likefaksiyondan sonraki 30 dk içinde bakılmalıdır. Spermatozoa hareketlerine göre ileri hareket (progresif motilite, PR), yerinde hareket (non-progresif motilite, NP) ve hareketsiz (immotilite, IM) olarak sınıflandırılır.
- **Sperm vitalitesi:** Hücre membranlarının bütünlüğünü değerlendiren boyama veya hipoozmotik şişme testi ile ölçülebilir. Alt referans sınırı %58'dir (17).
- **Spermatozoa dışındaki hücrelerin sayısı:** Sayımın yapıldığı hemositometrede epitel hücreleri, lökositler ve immatür germ hücreleri de sayılır. Pozitif peroksidaz lökositler için alt referans sınırı 1 milyon/ml'dir (17).

- **Sperm morfolojisi:** Spermatozoanın baş, boyun, orta parça, ana parça ve kuyruk bölümleri ayrı ayrı değerlendirilir. Anormal spermatozoa morfolojisine ait örnekler Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8: Anormal şekilli spermatozoa örnekleri

2.5. ATP Üretimi ve Mitokondri

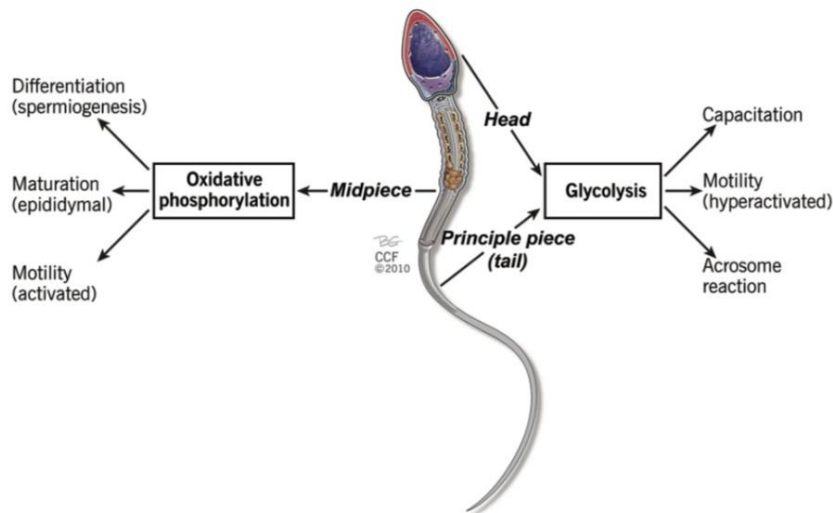
2.5.1. Sperm Hücresinde ATP Üretimi

Spermatozoa enerjisini glikoliz ve oksidatif fosforilasyon olmak üzere iki yolla sağlar (Tablo 2.2). Oksidatif fosforilasyonla daha fazla ATP üretilmesine rağmen baskın olan yol glikolizdir. Spermatozoa baş, orta parça ve ana parça üzere üç ayrı kompartmandan oluşur. Bu üç bölgede farklı metabolik süreçler işlemektedir (Şekil 2.9). Mitokondriler sadece orta parçada bulunduğu için burada enerji üretimi oksidatif fosforilasyonla olurken, baş ve ana parçada glikoliz ile enerji üretimi gerçekleşir.

Tablo 2.2: Spermatozoada ATP üretim yolu ve işlevleri

ATP Üretim Yolu	Spermatozoa Bölümü	Spermatozodaki Rolü
Glikoliz	Baş, ana parça	Kapasitasyon, hiperaktif motilite ve akrozom reaksiyonu
Oksidatif fosforilasyon	Orta parça	Spermiyogenez, sperm matürasyonu, aktif motilite

Enerjinin büyük kısmı glukoz ve fruktozdan sağlanır ve bunların spermatozoaya girişleri glukoz taşıyıcıları (GLUTs) tarafından yapılır (20). Seminal plazmada fruktoz konsantrasyonu, glukoz konsantrasyonunun 50 katı kadardır ancak glukoz, spermatozoanın şeker tüketiminin yarısını karşılamaktadır. Seminal vezikülden salgılanan sıvıda bulunan fruktoz, spermatozoanın beslenmesini sağlar. Fruktoz ölçümü seminal vezikül fonksiyonunu göstermede yararlıdır. Ejakülasyondan sonra fruktolizis işlemi ile spermatozoalar fruktozu tüketmektedir. Spermatozoa sayısının yüksek olduğu durumlarda fruktoz tüketimi fazla olur ve seminal fruktoz konsantrasyonu azalır. Buna bağlı olarak, azospermik ve oligospermik erkeklerde seminal fruktoz düzeyleri yüksek oranlarda tespit edilir (21). Ayrıca seminal fruktoz konsantrasyonu, motil sperm konsantrasyonu ile ters ilişkilidir (22).

**Şekil 2.9:** Spermatozoa bölümleri ve enerji üretim yollarıyla ilişkisi

2.5.1.1. Glikoliz

Olgun spermatozoada orta parçada bulunan mitokondrilerde üretilen enerjiyi ana parçaya iletecek bir sistem bulunmadığından dolayı buradaki enerji üretimi glikoliz ile olur. Yani flajellar hareket için gerekli enerji glikoliz ile sağlanır. Deneysel çalışmalar spermatozoada mitokondriyal oksidatif fosforilasyon durdurulduğu zaman bile hareketin hâlâ devam ettiğini göstermektedir (23). Miki ve ark., spermatozoaya özgü bir glikolitik enzim olan gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz-S (GAPDS) enziminin sperm motilitesi ve fertilite için gerekli olduğunu göstermiştir (24). Bu nedenle glikoliz, sperm motilitesi için ATP üretiminde temel metabolik yol olarak görülmektedir. Baş ve ana parçada kapasitasyon, hiperaktif motilite ve akrozom reaksiyonları için glikoliz aracılığıyla elde edilen ATP enerjisine ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Ana parçada seçici olarak üretilen heksokinaz ve laktat dehidrogenaz gibi glikolitik enzimlerin spermatozoaya özgü izoformlarının varlığı bu kavramı güçlendirmektedir (25).

2.5.1.2. Oksidatif Fosforilasyon

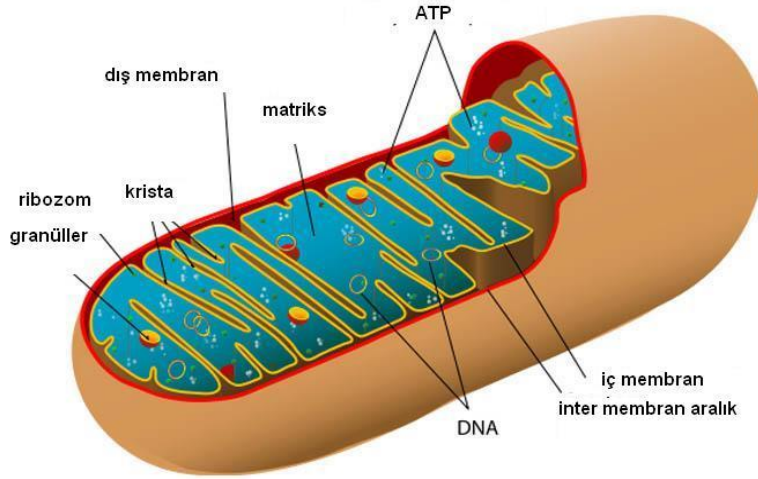
Her ne kadar glikoliz yolu ile üretilen ATP kritik olsa da mitokondri, spermatozoanın enerji üretimi için oldukça önemlidir. Oksidatif fosforilasyon ile üretilen enerji özellikle spermiyogenez, sperm matürasyonu ve aktif motilite için kullanılır. Spermiyogenez, spermatogenez sonucu oluşan spermatidlerin olgun, hareketli spermatozoalara dönüştüğü aşamadır. Spermiyogenez sırasında mitokondrilerde de majör yapısal değişiklikler olur (26). Bu değişiklikler sırasında meydana gelen hatalar sonucu motilite bozuklukları meydana gelebilir.

Olgun spermatozoada oksidatif fosforilasyon orta parçada meydana gelir. Elde edilen ATP'nin büyük kısmı aksonemin kollarında dynein ATPaz tarafından kullanılır. Spermatozoanın serbest oksijen radikallerine maruz kalması ise mitokondri mutasyonlarına sebep olabilir ve bunun sonucunda motilite bozulabilir (27).

2.5.2. Mitokondri Yapısı ve İşlevi

Mitokondri çift membranla çevrili bir organeldir. Mitokondriler iki membran arasında bulunan bir intermembran aralığına ve matrikse sahiptir. Mitokondriyal iç

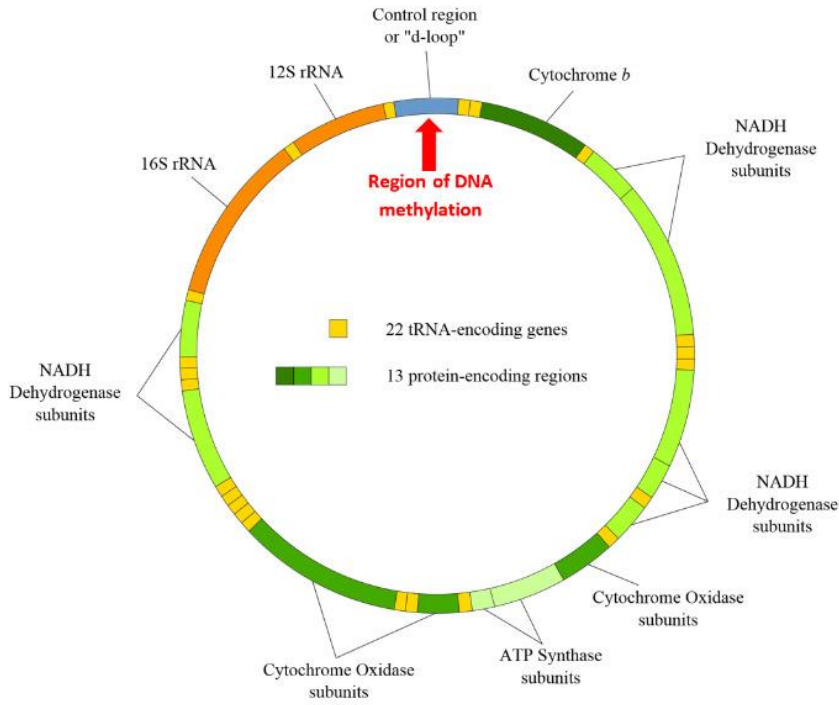
membranda krista adı verilen yapılar mevcuttur (Şekil 2.10). Spermatozoada yaklaşık 70-100 tane mitokondri bulunur.



Şekil 2.10: Mitokondri yapısı

Mitokondri ayrı bir genoma sahiptir ve nükleer genomdan farklılıkları mevcuttur (Şekil 2.11). mtDNA dairesel olup intron içermez. Çift zincirli olan mitokondriyal genom, ağır (H) ve hafif (L) iki zincirden oluşur. mtDNA'nın ufak bir bölümü üç zincirli DNA yapısındadır. Bu üçüncü zincir (7S DNA), ağır zincirin kısa bir segmentinin tekrarlayan sentezinden kaynaklanır. Bu üç zincirden oluşan alana "D-loop (displacement loop-kontrol bölgesi) bölgesi" denir (4). Yaklaşık 1000 bç (baz çifti) uzunluğa sahip olan bölge, hem ağır zincirin replikasyon orijini hem de her iki ipliğin promotor bölgelerini içermektedir.

Son yıllardaki çalışmalar, D-loop bölgesindeki metilasyonların başta gen ifadesinin düzenlenmesi olmak üzere, birçok süreçte rol alan epigenetik bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirmektedir (5). Epigenetik değişiklikler, DNA metilasyonu ve transkripsiyon sonrası histon modifikasyonlarından sorumludur (9). Sperm DNA metilasyon düzeyi ile sperm miktarı ve motilitesi arasında anlamlı (pozitif) bağlantı bulunmuştur (28). Bununla birlikte mtDNA'nın bazı genlerine ait CpG bölgelerinin de metile olabildiği ve ilgili genin ekspresyonunu etkileyebileceği gösterilmiştir (29). Dolayısıyla D-loop bölgesindeki metilasyon değişikliklerinin mitokondride ATP üretimini ve buna bağlı olarak motiliteyi bozabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.11: Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve D-loop bölgesi

2.6. Sperm Motilite Bozuklukları

DSÖ'nün 2010 kılavuzuna göre, ileri hareketli+yerinde hareketli spermlerin $\leq 40\%$ veya sadece ileri hareketli spermlerin $\leq 32\%$ olması azalmış sperm motilitesi (astenospermi) olarak değerlendirilir.

Sperm hareket bozuklukları izole olarak ortaya çıkabileceği gibi (astenospermi), daha çok şekil ve sayı azlığı ile beraber (oligoastenoteratospermi) görülebilir. İzole astenospermi daha çok flajellar sorunlara bağlı olurken kombine bozukluklarda sorun genellikle spermatogenezdeki sorunlardır. Motilitede azalma, spermin aksonem ve kuyruğunun fonksiyonlarını sağlayan 200-300 ayrı gendeki bozukluk nedeniyle oluşabilir.

Sperm motilitesinin başlatılması ve sürdürülmesinde ATP, ATPaz enzimi, cAMP ve kalsiyum ile birlikte ortamdaki pH, adenilat siklaz ve serin proteaz enzimlerinin önemli bir yeri vardır. Ayrıca seminal plazma içerisinde bulunan fruktoz, çinko, prostaglandin gibi maddeler de sperm motilitesini olumlu yönde etkiler (30). Spermatozoanın hareket kazanması için gerekli olan en önemli basamak olan aksonem

gelişimi testiste gerçekleşmesine rağmen spermin aktif hareketli hale gelmesi için epididimin varlığı şarttır.

Sperm motilite bozukluğuna sebep olan başlıca durumlar ise şunlardır:

- ***Antisperm antikolar (ASA):*** Varikosel, testis torsiyonu, testis travması, kriptorşidizm, obstrüktif patolojiler kan-testis bariyerini bozarak ASA oluşuma neden olurlar ve bu antikolar sperm yüzeyine bağlanarak motiliteyi etkilerler (31).
- ***Enfeksiyonlar:*** Lökospermi durumunda özellikle nötrofiller serbest oksijen radikalleri oluşturarak sperm motilitesini bozabilirler.
- ***Varikosel:*** Varikosel de aynı şekilde serbest oksijen radikallerini artırarak motiliteyi etkiler (32).
- ***İmmotil silya sendromu:*** Otozomal resesif geçişli bir hastalık olup mikrotübülleri birbirine bağlayan dynein kollarında kısalık veya yokluk sonucu sperm hareket yeteneğinde azalma görülür (33).
- ***Fibröz kılıfın displazisi:*** İmmotil silya sendromunun bir varyantıdır ve fibröz kılıfın bozukluğuna bağlı olarak spermatozoa kuyruğu kısa, kalın ve düzensiz olabilir ve bu durum motilitenin bozulmasına neden olur.
- ***Protein karboksilaz metilaz eksikliği:*** Spermatozoa kuyruğunda bulunan ve motiliteyi regüle eden bir enzimdir, eksikliğinde hareket bozukluğu görülür (34).
- ***Epididimin fonksiyonel bozuklukları:*** Epididim matürasyonunda bir defekt olması veya burada bulunan serbest oksijen radikalleri motiliteyi olumsuz etkiler.
- ***Fonksiyonel sperm kuyruk defektleri:*** Spermatozoa kuyruğundaki ATP ve ATPaz enzimidaki defektlere, kalsiyum ve eksikliğine, adenilat siklaz enzimidaki eksikliğe, spermatozoa membranındaki fonksiyonel defektlere bağlı olarak sperm hareketi etkilenebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma için İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alındı (09.05.2019 tarihli, 83045809-604.01.02-71346 sayılı yazı).

Mart 2020 – Şubat 2021 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Androloji Polikliniği'ne başvuran 30 kontrol (normospermik), 30 hasta (astenospermik), olmak üzere toplam 60 olgu çalışmaya dahil edildi. Hastalara bilgilendirilmiş gönüllü olur formu doldurulduktan sonra sadece İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Androloji Laboratuvar'ı tarafından değerlendirilen semen örnekleri DSÖ 2010 kılavuzuna göre normospermik ve astenospermik olarak sınıflandırıldı. Toplanan semen örnekleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı. Çalışma prospektif olarak gerçekleştirildi.

- **Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri (Hasta Grubu):**
 - 20-55 yaş arasında olan hastalar
 - En az 1 senedir çocuk sahibi olamayan hastalar
 - İzole astenospermisi olan hastalar
- **Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri (Kontrol Grubu):**
 - 20-55 yaş arasında olan hastalar
 - En az 1 çocuk sahibi olan veya eşi gebe olan hastalar
 - Normospermik olan hastalar
- **Çalışmadan Dışlanma Kriterleri:**
 - Bilinen malignitesi olan, KT veya RT alan hastalar
 - Bulaşıcı hastalığı olan (Hepatit vs.) hastalar
 - Herhangi bir kronik hastalığı olan hastalar
 - Testis travması, epididimorşit geçirmiş olan hastalar

3.2. Yöntem

3.2.1. Spermatozoa İzolasyonu

Semen örneğinden 1 ml alınıp 1000 xg'de 5 dk santrifüj edildi. Pelletin üzerine 1 ml PBS tamponu eklenip 1000 xg'de 5 dk santrifüj edildi. Elde edilen pelletin üzerine 50 mM 50 µl Tris-HCl (pH:6,8, 4-8 °C) eklenip +4 °C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 1000 xg ve +4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Pellet üzerine 500 µl hücre lizis tamponu ve 1 µl Proteinaz K (20 µg/ml) eklenip 56 °C'de 15 dk çalkalamalı su banyosuna koyuldu. Ardından 1000 xg ve +4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Pellet 750 µl PBS tamponu eklenerek 1000 xg ve +4 °C'de 7 dk olmak üzere iki kere yıkandı.

Bu işlem sonrasında mikroskop değerlendirmesi yapılarak lökosit kök hücrelerinin semen örneklerinden uzaklaştırıldığı kontrol edildi.

- **PBS tamponu:** 0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,0018 M KH₂PO₄
- **Hücre lizis tamponu:** 1 M Tris, 1 M NaCl, 1 M EDTA, %0,05 Triton X-100

3.2.2. ATP Düzeylerinin Belirlenmesi (Biolüminesans)

ATP ölçümü bioluminesans deney kiti CLS II (ATP Bioluminescence Assay Kit CLC II) (Roche) ile yapıldı. Çalışma gruplarını oluşturan tüm bireylerin izole edilmiş sperm örneklerinde ATP miktar tayini, üretici firmanın tavsiye ettiği yöntemine uygun olarak yapıldı. Her olgu için deney iki kez tekrarlandı. Sperm süspansiyonu tüplere aktarıldıktan sonra 50 µl luciferase eklenerek 10 sn içerisinde kemilüminesans ölçümü yapıldı. Kor ölçümü ise ATP ve hücre yokluğunda yapıldı. Örneklerdeki ATP miktarları, ATP konsantrasyonlarından elde edilen standart eğri yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar n mol/mg protein olarak hesaplandı.

3.2.3. Protein Miktar Tayini (Lowry-Hartree Modifiye Yöntemi)

Protein miktarları tayini standart olarak sığır serum albüminin kullanıldığı kısmen değiştirilmiş Lowry yöntemine göre yapıldı (35,36). Protein tayini için kullanılacak standart eğriyi elde etmek için artan oranlarda ve bilinen miktarlarda sığır serum

albümini, dokuz örnek içine konulduktan sonra diğer örnekler protein içeriği belirlenecek hücre kesimleri konuldu. Örneklerin hacmi distile su ile 90 µl'ye getirildi. Daha sonra proteinler 50 µl 2 M NaOH içinde 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Ardından örnekler 1 ml çözelti-1 eklendi, 10 dk 20 °C'de tekrar inkübasyon yapıldı ve örneklerin üzerine 100 µl çözelti-2'den eklendi, 37 °C'de 30 dk inkübe edilen örneklerin 750 nm'deki absorpsiyon değerleri okundu (A_{750}). Artan oranda standartların bulunduğu örneklerin A_{750} 'de verdikleri değerlerin karşılığı olan ve protein miktarının bir işlevi olan standart doğru çizildi. Çizilen doğrudan protein miktarı bilinmeyen hücre kesimlerinin okunan A_{750} değerlerine karşılık gelen protein miktarı hesaplandı.

- **Çözelti-1:** 50 ml %2 Na_2CO_3 + 1 ml $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ + 1 ml %2 Potasyum Sodyum Tartarat
- **Çözelti-2:** Folin ve Ciocalteu'nun fenol reagenti + H_2O (1:1)

3.2.4. DNA İzolasyonu

Semen örneklerinden ticari kit kullanılmak suretiyle (ZymoResearch Quick-DNA Kits) DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA konsantrasyonu ve saflık ölçümleri, 1'er µl DNA örneği NanoDrop Scientific TM 1000 (Thermo Fisher, Delaware, USA) cihazına yüklenerek belirlendikten sonra -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.5. D-loop Metilasyon Oranı Tespiti İçin Referans DNA'nın Oluşturulması

Sağlıklı bireyin sperminden hazırlanan bisülfid modifiye sonrası mitokondri DNA'sı, metillenmemiş referans olarak kullanıldı. Metillenmiş referans için, semen örneklerinden izole edilen mitokondri DNA'sını mitokondri restriksiyon enzimi BamHI (Fast Digest BamHI Thermofisher Scientific) uygulandı. Ardından DNA örneğinin tümünü metillemek için M.SssI CpG Metilaz (New England BioLabs Inc., Beverly, MA, ABD) enzimi uygulandı. Daha sonra aşağıdaki maddeler 50 µl reaksiyon hacminde 37 °C'de 16 saat süreyle inkübe edildi:

- 10 U M.SssI CpG Metilaz
- 160 µM S-adenosilmetiyonin

- NE Tampon 2 µl (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotritol, pH 7.9)

Bu işlem sonrasında bütün DNA miktarı metillenmiş olmaktadır. Sonrasında bisülfid modifikasyonu uygulandı. Her iki standart (metillenmiş ve metillenmemiş) örnekleri sanger dizileme metodu ile kontrol edildi. Elde edilmiş metillenmiş ve metillenmemiş DNA örneklerine bisülfid modifikasyon yöntemi uygulandı.

3.2.6. DNA Bisülfid Modifikasyonu

Metilasyon ölçümü için bisülfid modifikasyonu yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde DNA baz diziliminde metillenmemiş olan tüm sitozin bazları kimyasal reaksiyonla urasile dönüştürülür. Metile olan sitozinler etkilenmez, sitozin olarak kalır. Çalışmaya katılan bireylerden elde ettiğimiz ve standart için kullanacağımız DNA örnekleri (Zymo EZ DNA Methylation-Gold™ Kit) üretici firmanın tavsiye ettiği yöntemine uygun olarak yapıldı. DNA konsantrasyonu ve saflık ölçümünden sonra örnekler -80 °C de muhafaza edildi.

3.2.7. Standart Oluşturulması

Çalışmamızda plazmid kullanmak sureti ile iki standart oluşturuldu, mitokondri miktarı ve mitokondri D-loop metilasyon oranı tespiti için adı geçen referans mtDNA'lerden PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) yapıldı. PZR yönteminde kullanılan primerler şunlardır:

- 5'-TAGGGTTATAAAGTTTAAATAGTTTATA-3'
- 5'-ACAAAATCAAAAACAAATACTAC-3'

Primerler CpG adacığı içermemekle birlikte elde edilen 200 bç üründe 10 adet CpG adacığı bulunmaktadır. PZR işlemi ardından agaroz jelden gene özgü PZR ürününün izolasyonu yapıldı.

3.2.8. Agaroz Jelden Gene Özgü PZR Ürününün İzolasyonu

PZR sonrası ürünümüzü saf olarak agaroz jelden izole etmek için High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanıldı. Bu işlem için şu basamaklar uygulandı:

1. PZR ürünü agaroz jelde yürütüldükten sonra gene özgü bant steril bistüri ile kesilerek 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Her 100 mg agaroz başına 300 µl bağlanma tamponu eklendi.
3. 15-30 sn vortekslendi.
4. 56 °Cde 10 dk inkübasyon yapıldı, ardından vortekslendi.
5. Her 100 mg için 150 µl izopropanol eklendi, ardından vortekslendi.
6. Kit içeriğinde bulunan toplama tüpüne filtreli kolon yerleştirildi ve mikrosantrifüj tüpündeki örnek filtrenin üzerine aktarıldı.
7. 1 dk boyunca santrifüj edildi ve altta biriken sıvı alındı.
8. Filtreli tüplerin üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi ve 8000 xg'de 1 dk santrifüj edildi, bu işlem iki kez tekrarlandı.
9. Filtreli tüpler santrifüjden çıkartılarak 1,5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi ve üzerine 200 µl Elution Buffer eklendi. 8000 xg'de 1 dk santrifüj edildi.
10. PZR ürünü -80 °C'de saklandı.

PZR ürünlerini saflaştırılmasından sonra elde edilen ürünler kontrol amaçlı agaroz jelinde yürütüldü.

3.2.9. PZR Sonrası Elde Edilen Ürün Dizisinin Vektöre Aktarılması

PZR sonucu elde ettiğimiz 200 bç'lik ürünler (metillenmiş D-loop ve metillenmemiş D-loop), aşağıda içeriği verilen kit ile vektöre aktarıldı. Klonlanma pEGM-T Easy Klonlama Kiti (Promega) kullanarak yapıldı. Seçilen gen bölgesi, PZR ve klonlama yapmadan önce kontrol amaçlı klonlanmış ve plazmid izolasyonundan sonra elde edilen bölge dizilenerek kontrol edilmiştir. Daha sonra ligasyon işlemine geçilmiştir.

5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl pEGM-T Easy Vector, 1 µl T4 ligaz, 1 µl PZR ürünü, 2 µl H₂O olmak üzere ligasyon reaksiyonu 0,5 ml'lik tüplerde hazırlandı ve +4 °C'de 24 saat bekletildi.

3.2.10. Vektörün Bakteriye Transforme Edilmesi

Ligasyon sonrası 200 bç'lik vektör (metillenmiş D-loop ve metillenmemiş D-loop) bakteriye şu işlemlerle transforme edildi:

1. Önce kısa santrifüj yapıldı, ardından her ligasyon reaksiyonundan 2 µl alınıp 15ml'lik steril polipropilen tüplere aktarıldı.
2. Kompetan hücreler -70 °C'den alınıp buz üzerinde çözüldü ve her ligasyon reaksiyonuna 50 µl hücre eklendi.
3. Pipetaj yapıldı ve buz üzerinde 20 dk bekletildi.
4. Isı şoku uygulandı. 42 °C'de 45 sn, ardından buz üzerinde 1 dk bekletildi.
5. Tüplere SOC medyumundan 950 µl eklendi ve 37 °C'de 150 rpm'de 1,5 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyon yapıldı.
6. Kültürden SOS medyumunu ile 1:1, 1:10, ve 1:50'lik dilüsyonlar yapıldı ve ardından 100 µl olarak LB/apmisilin/IPTC/X-gal petrilere yayıldı.
7. Stb3 kompeten hücrelerine transforme edildi ve üreyen beyaz renkli koloniler seçilerek sıvı besiyerine aktarıldı.

3.2.11. Mini-Prep Protokolüyle Plasmid DNA Eldesi

5 ml'lik ampisilinli LB içeren petrilere seçmiş olduğumuz bir koloni tüpe alınır ve gece boyu çalkalamalı inkübatörde (220 rpm) bekletildi. Ardından şu işlemler uygulandı:

1. 1,5 ml'lik tüpler içine konulan karışım 5 dk 3000 rpm'de santrifüj edilir.
2. Çöken hücreler 250 µl'lik P1 (RNase) tamponu ile karıştırılır.
3. 250 µl P2 (lizis) tamponu eklenir ve iyice karıştırılır.

4. 350 µl N3 (SDS) tamponu eklenir ve iyice karıştırılır (solüsyon beyaz bir renk alır).
5. 10 dk 13000 rpm'de santrifüj edilir.
6. Süpernatant spin kolonlarına aktarılır ve 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edilir.
7. 0,75 ml PE yıkama tamponu eklenerek 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edilir.
8. Etanolü uzaklaştırmak için ilave olarak 1 dk santrifüj yapılır.
9. Kolonlar 1,5 ml'lik tüplere yerleştirilerek üzerine 50 µl EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) tamponu eklenir ve 1 dk bekleme süresinin ardından 1 dk santrifüj edilir.

İzolasyonda Qiagen QIAprep Miniprep Kiti kullanılmıştır. Plasmidlerin doğruluğunu kontrol etmek için saflaştırılmış plasmidlerden uygun olanları seçilerek dizilendiler.

3.2.12. Mitokondri DNA Kopya Sayısının Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

Gerçek zamanlı PZR için uygun koşullar belirlendikten sonra, tüm gruplarda spermatozoidlerden elde edilen DNA'larda bisülfid modifikasyon sonrası gerçek zamanlı PZR yapıldı. Gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılmak suretiyle bir örnekteki bilinmeyen total mtDNA miktarının bulunması için en uygun yol eksternal standart eğrileri kullanmaktır (37). Bu nedenle çalışmamızda hem total mtDNA hem de bir genomik kontrol gen olan (housekeeping) β -actin geni içeren plasmidler hazırlandı ve her primerin kendi seri dilüsyonlarına 10'ar kat azalan 5 dilüsyon kullanılarak 5 standart oluşturuldu. Elde ettiğimiz verilerden kopya sayısı belirlemek için <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> adresi kullanıldı. Bu grupların total mtDNA/ β -actin kopya sayısı oranı hesaplandı.

3.2.13. Gerçek Zamanlı PZR ile D-loop Metilasyon Oranının Belirlenmesi

D-loop bölgesinin metilasyonu, Methylation Sensitive Melt Curve Analysis (Metilasyona Duyarlı Erime Eğrisi Analizi, MD-EEA) tekniği vasıtasıyla değerlendirildi. DNA erime eğrileri doğrusal bir sıcaklık geçişi sırasında floresan ölçülerek elde edilir.

Metillenmiş DNA bisülfid modifikasyonundan sonra daha yüksek CpG içerdiği için erimeye karşı daha dayanıklı hale gelir. Sonuç olarak, floresan sinyali daha yüksek erime sıcaklıklarında kaydedilir. Bilinmeyen bir örneğin metilasyon durumu daha sonra erime profili ile karşılaştırılarak belirlenir. MD-EEA'da bisülfid ile muamele edilmiş DNA, metilasyondan bağımsız primerler ve SYBR green gibi çift sarmallı interkalasyon boyası ile PZR ile amplifiye edilir. Çalışmamızda MD-EEA yönteminde kullanılmak üzere CpG içermeyen aşağıdaki primerler tasarlandı:

- 5'-TAGGGTTATAAAGTTTAAATAGTTTATA-3'
- 5'-ACAAAATCAAAAACAAATACTAC-3'

200 bç'lik elde edilen ürünlerde 10 adet CpG adacığı bulunmaktadır. Gerçek zamanlı PZR tekniğı kullanılmak suretiyle bir örnekteki bilinmeyen mtDNA D-loop metilasyon oranının bulunması için en uygun yol eksternal standart eğrileri kullanmaktır (38). Bu nedenle çalışmamızda daha önce bahsettiğimiz hem metillenmiş hem de metillenmemiş plasmidlerden %100, %75, %50, %25, %10, %0 metile oranında standartlar oluşturuldu. Elde ettiğimiz verilerden metilasyon yüzdesi belirlemek için oluşturduğumuz % standart kullanmak sureti ile hesaplandı.

- PZR protokolü (içeriğı ve uygulanan işlemler) aşağıda verilmiştir:
 - Mix: 5µl
 - H₂O: 2,8µl
 - Primer (f): 0,6µl
 - Primer (r): 0,6µl
 - DNA: 2µl

	<i>Sıcaklık</i>	<i>Zaman</i>	
<i>Ön Denatürasyon</i>	+95 °C	10 dk	
<i>Denatürasyon</i>	+95 °C	15 sn	}
<i>Primer Bağlanması</i>	+48 °C	30 sn	
<i>Zincir Uzaması</i>	+60 °C	30 sn	
			40 döngü

Erime Eğrisi (Melt Curve) analizleri için termal profil 95 °C-15 sn, 60 °C-1 dk ve 0,2 artış ile 90 °C-15sn olacak şekilde programlanmıştır.

3.3. İstatiksel Analiz

Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 5 programı kullanıldı. Mann-Whitney U testi ile grupların ikili karşılaştırılmaları yapıldı. Veriler arasındaki ilişki için Spearman korelasyon analizi yöntemi uygulandı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

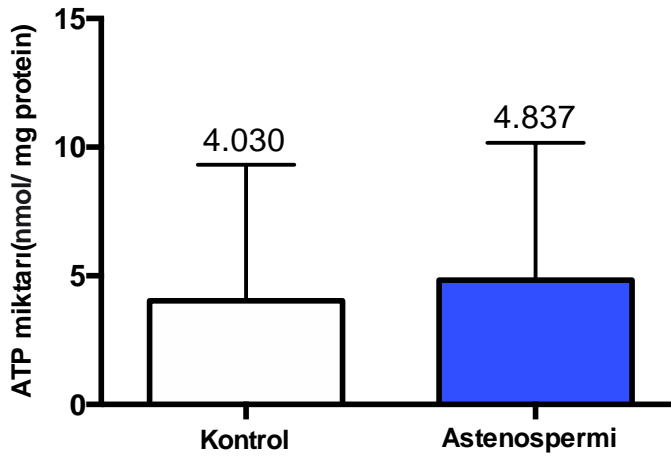
Daha önce 30 kontrol (normospermik), 30 olgu (astenospermik) olmak üzere 60 olgu olarak planlanan çalışma grubu, dışlama kriterleri ve yöntemlerde yaşanan uygunsuzluklar nedeniyle 24 kontrol, 25 olgu olmak üzere toplam 49 kişi olarak düzenlendi. Çalışmaya alınan hastaların demografik verileri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmaya alınan hastaların demografik verileri

	Kontrol (Normospermik) Ortalama ± SD (Aralık) (n=24)	Olgu (Asteno spermik) Ortalama ± SD (Aralık) (n=25)
Yaş (Yıl)	34,04 ± 5,47 (23-48)	32,92 ± 5,95 (25-46)
Toplam motilite (%)	60 ± 5,01 (53-72)	26 ± 10,3 (2-35)
Progresif motilite (%)	57,3 ± 5,42 (50-70)	21,36 ± 9,51 (1-30)

4.1. Spermatozoadaki ATP Düzeyleri

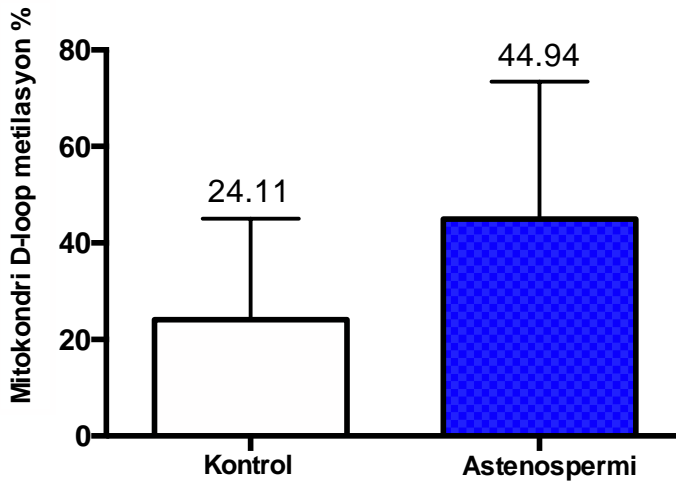
Çalışma gruplarını oluşturan tüm bireylerin spermatozoasındaki ATP düzeyleri, kit kullanılmak suretiyle lüminometrik olarak ölçüldü. Mann-Whitney U testi ile kontrol ve astenospermi grubu ikili karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir (p:0,3649) (Şekil 4.1). Grupların değişim katsayısı değerleri ise; kontrol grubu için %131,12, astenospermi grubu için %110,36 olarak hesaplanmıştır.



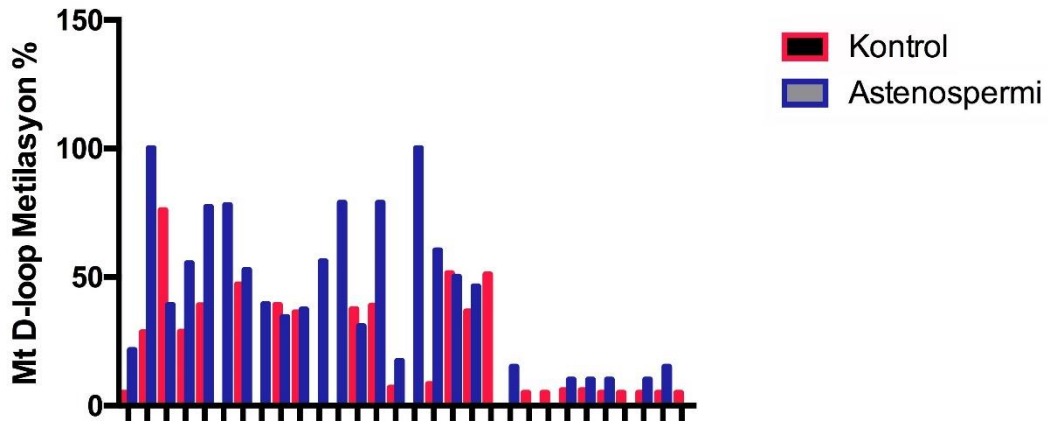
Şekil 4.1: Kontrol ve astenospermi gruplarının spermatozoasındaki ATP düzeyleri (Grafiklerin üzerindeki rakamlar ilgili grubun ortalama \pm SD değerleridir.)

4.2. Mitokondri D-loop Metilasyon Oranlarının Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

Gerçek zamanlı PZR için uygun koşullar belirlendikten sonra, tüm bireylerin spermatozoasından elde edilen DNA'lerden gerçek zamanlı PZR yapıldı. Mann-Whitney U testi ile kontrol ve astenospermi grubu ikili karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmüştür ($p:0,0015$). Kontrol grubundaki bireylerin spermatozoasından elde edilen verilere göre, mitokondri D-loop metilasyon oranı astenospermi grubuna göre daha az miktarda saptanmıştır (Şekil 4.2). Grupların değişim katsayısı değerleri ise; kontrol grubu için %86,64, astenospermi grubu için %63 olarak hesaplanmıştır. Çalışma grubuna dahil olan bütün bireylerin spermatozoasından elde edilen mitokondri D-loop metilasyon oranı kişisel veriler olarak Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.2: Kontrol ve astenospermi gruplarının spermatozoasındaki mitokondri D-loop metilasyon oranı (Grafiklerin üzerindeki rakamlar ilgili grubun ortalama \pm SD değerleridir.)

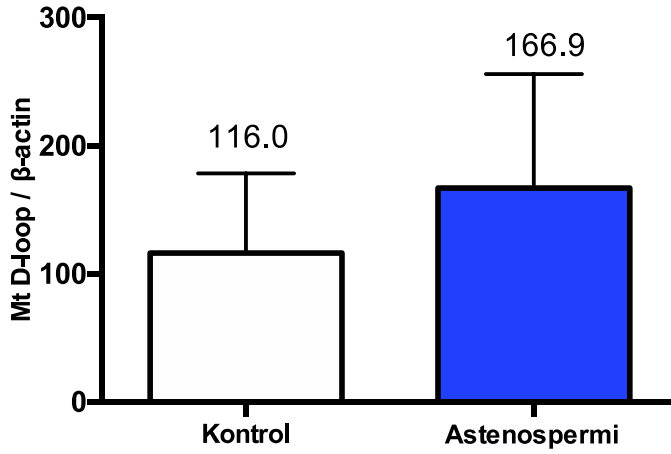


Şekil 4.3: Çalışmaya katılan bireylerin kişisel verilere göre spermatozoasındaki mitokondri D-loop metilasyon oranı

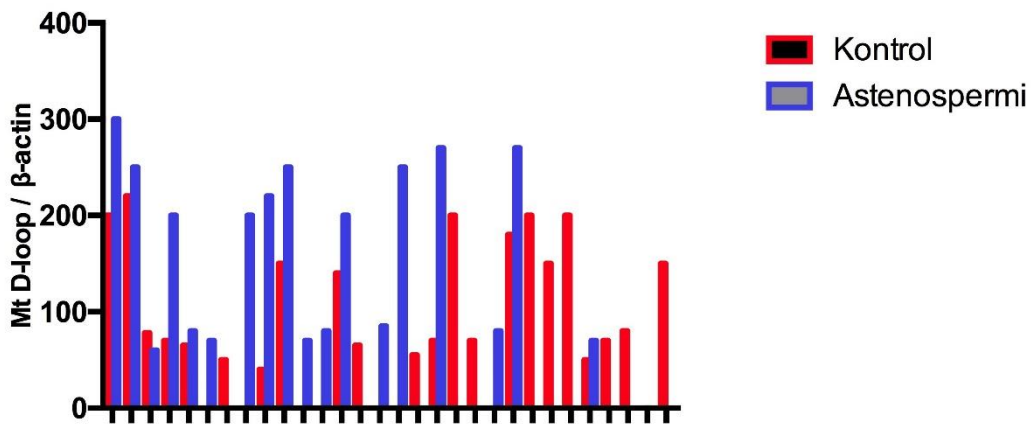
4.3. Mitokondri DNA Kopya Sayısının Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

Grupların spermatozoasından elde edilen DNA örneklerinden total mtDNA/ β -actin kopya oranı hesaplandı. Mann-Whitney U testi ile kontrol ve astenospermi grubu ikili karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmüştür ($p:0,016$). Kontrol grubundaki bireylerin spermatozoasından elde edilen verilere göre, mtDNA kopya sayısı

astenospermi grubuna göre daha az miktarda saptanmıştır (Şekil 4.4). Grupların değişim katsayısı değerleri ise; kontrol grubu için %53,78, astenospermi grubu için %53,33 olarak hesaplanmıştır. Çalışma grubuna dahil olan bütün bireylerin spermatozoasından elde edilen mtDNA/ β -actin kopya oranı kişisel veriler olarak Şekil 4.5'te verilmiştir.



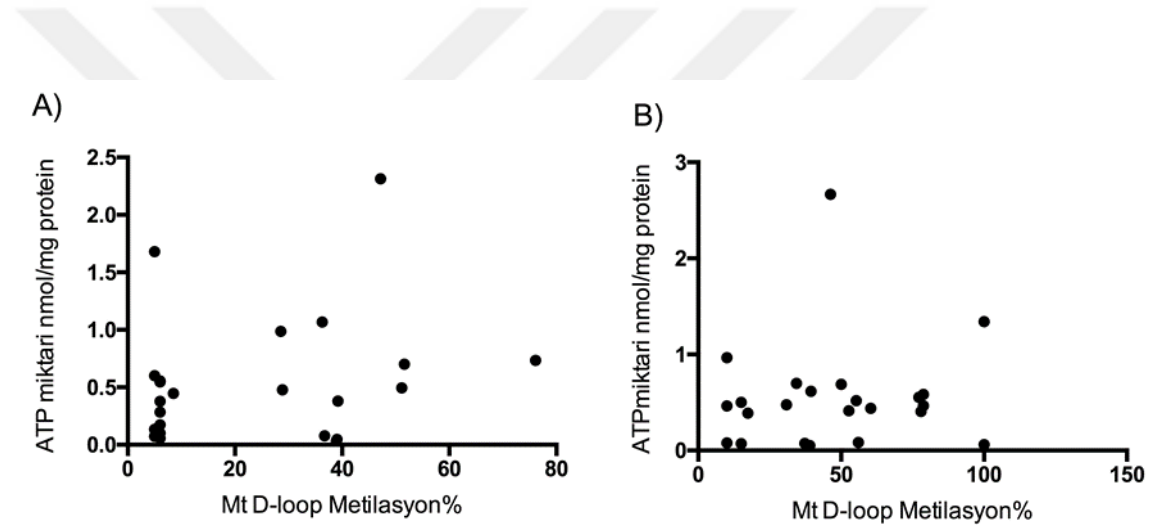
Şekil 4.4: Kontrol ve astenospermi gruplarının spermatozoasındaki mitokondriyal DNA kopya sayısı (Grafiklerin üzerindeki rakamlar ilgili grubun ortalama \pm SD değerleridir.)



Şekil 4.5: Çalışmaya katılan bireylerin kişisel verilere göre spermatozoasındaki mitokondriyal DNA kopya sayısı

4.4. Spermatozoadaki Mitokondri D-loop Metilasyon Oranı ile ATP Miktarı Arasındaki Korelasyonların Analizi

Çalışılan grupların spermatozoasındaki mitokondri D-loop metilasyon oranı ile ATP miktarları arasındaki ilişki Spearman korelasyon analiziyle değerlendirildi. Her bir çalışma grubunun değerleri ayrı ayrı analiz edildiğinde, veriler arasında anlamlı bir korelasyon görülmemiştir ($p>0,05$). Kontrol grubuna ait mitokondri D-loop metilasyon oranı ile ATP miktarının korelasyon değerlendirilmesi ($r= 0,179$) ve astenospermi grubuna ait mitokondri D-loop metilasyon oranı ile ATP miktarının korelasyon değerlendirilmesi ($r=0,089$) Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6: Spermatozoadaki mitokondri D-loop metilasyon oranı ile ATP miktarları arasındaki korelasyonların analizi (A: Kontrol grubu, B: Astenofermi grubu)

5. TARTIŞMA

Erkek infertilitesinin önemli sebeplerinden biri de sperm motilite bozukluklarıdır. Astenospermiden sorumlu olan birçok mekanizma olmasına rağmen özellikle hareket yeteneği için gerekli olan ATP üretimindeki sorunlar da motilite bozukluklarına sebep olabilmektedir (39).

Çoğu hücrede olduğu gibi spermatozoanın ATP ihtiyacı hem glikoliz hem de oksidatif fosforilasyondan gelmektedir. Oksidatif fosforilasyon sonucu üretilen ATP'nin sperm çeşitli fonksiyonlarının yerine getirilmesinde kullanıldığı ve bunlardan birinin de sperm hareketi ile ilgili olduğu üzerine kanıtlar bulunmaktadır (40,41). Mitokondri, içerdiği genomla bazı oksidatif fosforilasyonun ihtiyacı olan proteinleri sentezlemektedir. Bazı deneysel çalışmalar, mitokondri genlerindeki ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin hücre içi ATP seviyelerini etkileyebileceğini göstermektedir (42). Mitokondri genomu ile ilişkili bazı mutasyonların astenospermi ile ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Her ne kadar bu çalışmalarda astenospermi ile ilgili mutasyonlarla pozitif ilişkiler kurulsa da bunların hiçbiri bugüne kadar astenospermi ile ilgili patogenezi tam olarak açıklar görünmemektedir. Bunlara örnek verecek olursak 4,977 bç delesyonları veya oksidatif fosforilasyon komplekslerinde görev alan proteinleri etkileyen mutasyonlar ya çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerini, ya da bu genlerle ilişkili proteinlerin niteliğini bozan mutasyonlar şeklindedir (43–45).

Mitokondri genomunun 37 geni sentezlediği ve bunlardan 13'ünün oksidatif fosforilasyonla ilişkili komponentleri kodladığı bilinmektedir (46). Bu proteinlerle ilişkili ekspresyon seviyelerinin kontrolü, D-loop bölgesi olarak adlandırılan dizi tarafından sağlanmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar sonucunda, çeşitli hücre tiplerinde mitokondrinin D-loop bölgesinde yer alan CpG adacıklarının metilasyonunun, mitokondri genlerinin ekspresyonu ve mtDNA'nın replikasyonu üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir (5). Klasik bilgi olarak CpG adacıklarının metilasyon oranının artışı genin ekspresyon seviyelerini etkilediği bilinmektedir (47). D-loop bölgesi bir promotor bölge olarak görev yapar ve gen ifadesini kontrol eder. Bununla birlikte çeşitli hastalıklarla (örn. Alzheimer hastalığı, kolorektal kanser, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklar) D-loop bölgesindeki metilasyon değişiklikleri arasında ilişkiler de kurulmuştur (6–8).

Astenospermideki flajellar hareketinde ATP'ye olan ihtiyaç göz önüne alınarak, D-loop bölgesindeki metilasyon yüzdelerindeki değişikliklerin hastalığın patogenezinde bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Olası metilasyon artışlarının mitokondri ile ilişkili genlerin ifadelerini etkilemek suretiyle hücre içi ATP üretimini etkileyebileceği mevcut literatür bilgileriyle söylenebilir (42).

Bu bilgiler ışığında, sperm hücresinde mtDNA D-loop bölgesinin metilasyonu, özellikle ATP üretimi ve hareketle ilgili genleri baskılayarak astenospermiye yani erkek infertilitesine sebep olabilir. Literatürde mtDNA metilasyonu ile çeşitli patolojiler arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar mevcuttur (48). Bunlar arasında çeşitli genlerin promotor bölgelerindeki anormal hipermetilasyonla astenospermi ile arasındaki ilişkiyi gösteren az da olsa çalışmalar bulunmaktadır (49). Projemizin kurgulandığı dönemdeki Pubmed ve Web of Science veritabanları ile yaptığımız literatür çalışmamız, mitokondri genomunun promotor özelliği taşıyan D-loop bölgesinin metilasyon durumu ile astenospermi arasındaki ilişkiyi irdeleyen bir çalışma olmadığını göstermektedir. Bu doğrultuda bizim çalışmamızın amacı, D-loop bölgesinin metilasyonunun sperm motilitesinin üzerinde etkisini ortaya koymaktır. Dolayısıyla çalışmamızdan çıkabilecek sonuçlardan astenospermi patogenezinde mitokondrinin rolünün ne olduğuna dair daha geniş bilgiler elde edilebileceğini düşündük.

Çalışmamızın bulgularına bakıldığında, astenospermik vakaların spermatozoasında normospermik vakalardan alınan spermatozoaya göre yaklaşık %86 metilasyon artışı olduğu gözlenmiştir. Ancak bulgularımız bu metilasyon artışının spermatozoanın ATP konsantrasyonu üzerinde bir etkisi olmadığını da düşündürebilir. Bilindiği üzere spermatozoa glikolitik yoldan da ATP üretimi yapabilmektedir. Dolayısıyla hücre içi ATP düzeyi glikolitik yoldan gelen bir kompensasyon mekanizması ile belirli sınırlarda tutulmuş olabilir. Literatürde çeşitli patolojilerle ilişkili çalışmaları irdelediğimizde, hücre içi ATP seviyelerinin diğer bir kompensasyon mekanizması olarak mtDNA miktarını artırmak suretiyle ATP üretimini artırmak şeklinde çeşitli yorumların yapıldığı görülmektedir (50). Dolayısıyla bizim çalışmamızda görülen astenospermik vakaların spermatozoasında gözlenen %44'lük mitokondri sayısı artışı bir kompensasyon mekanizması olarak değerlendirilebilir. Bir başka olasılık da D-loop bölgesinin astenospermik vakalardaki tespit edilen seviyelerinin, hücre içi ATP üretiminde bir risk oluşturacak düzeye gelmemesidir. Astenospermik vakaların spermatozoasında

gözlemlenen D-loop bölgesindeki hipermetilasyonun, mitokondri tarafından sentezlenen proteinlerin üzerindeki etkisinin ne olduğunu bilebilmek için ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerini araştırmak gerekmektedir. Ancak araştırma projemizin bütçesi bunun incelenmesi için yeterli olamamıştır. Bu nedenle hipermetilasyonun hücre içi etkilerinin sonuçları hakkında yorum yapabilmek mümkün gözükmemektedir. Başka bir olasılık olarak da hücre içi ATP konsantrasyonunun sabit kalmasında astenospermideki başka faktörlerin (antisperm antikolar, varikosel, enfeksiyonlar gibi) patogeneizde etkili olması olabilir, yani asıl primer patoloji hipermetilasyon olmayabilir. Çalışmamızın bulguları, yukarıda vurgulandığı gibi bu konu ile doğrudan ilişkili benzer bir çalışma olmadığından karşılaştırma yapılamamıştır.

Çalışmada çıkan sonuçlarla ilgili dikkat çekici bir nokta, ölçülen parametrelerdeki değişim katsayısının yüksek olmasıdır. Bu durum, ilişkili parametrelerin kişiler arasında geniş bir aralığa dağıldığını ve kişisel varyasyonu olduğunu ortaya koyabilir. Kişiler arasındaki farklı yaşam tarzları, sigara kullanımı, hava kirliliği, ağır metaller, diyet yağları, terapötik ilaçlar gibi faktörler bu varyasyonların görünmesine sebep olmuş olabilir (51). Literatürde sigara kullanımı gibi çeşitli faktörlerle artabilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) serbest radikal üretimini artırmak suretiyle mitokondri epigenetiğini etkilediğiyle ilişkili çalışmalar bulunmaktadır (52). Dolayısıyla yaşam tarzı değişikliklerinin de etkisiyle vakalardaki varyasyonlar oluşabilir. Kişinin antioksidan savunma sistemleri ve buna benzer sistemlerin değişik varyantlarıyla ilişkili olarak da bu yaşam tarzı değişikliklerinin etkileri farklı farklı ortaya çıkabilir. Dahası astenospermi ile oksidatif stres artışı ilişkisini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (53). Yine bu kişilerdeki öngöremediğimiz genetik altyapı nedeniyle mtDNA D-loop bölgesindeki metilasyon değişiklikleri ortaya çıkmış olabilir. Ancak çalışmamızın bu kurgusuyla bahsedilen varyasyonların kaynağını ve mekanizmasını ortaya koymak mümkün değildir.

Yukarıda bildirilen bazı kısıtlayıcı etkenler dışında çalışmamızı sınırlandıran en önemli faktörlerden biri, mtDNA D-loop bölgesinin hipermetilasyonunun gen ürünleri üzerinde ne gibi bir etkisi olduğunu saptayamamaktır. Çalışmamızda D-loop bölgesinin kontrol ettiği genlerle ilişkili proteinlerin ayrı ayrı ekspresyon seviyeleri değerlendirilememiştir. Daha geniş bütçeli çalışmalarda bu durum ayrı olarak araştırılabilir. Bir diğer sınırlayıcı faktör ise, hücre içi ATP konsantrasyonunun değişmeden kalabilmesine sebep olabilecek glikoliz yolu ile ATP üretiminin ayrı olarak

ölçülememesidir. Ayrıca sperm motilite bozukluğuna sebep olabilecek diğer durumların (antisperm antikorlar, varikosel gibi) çalışmamız kapsamında olmaması araştırmamızı sınırlandıran bir faktör olarak göze çarpmaktadır. Daha geniş hasta serileriyle ve oluşturulan subgruplarla izole olarak hipermetilasyonun astenospermi üzerinde ne gibi etkileri olduğu daha iyi anlaşılacaktır.

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları, astenospermi vakalarında spermatozoa mitokondri genomunda yer alan D-loop bölgesinde metilasyon artışı olduğunu ancak bunun hücre içi ATP düzeyleri üzerinde etkisi olmadığını göstermektedir. Daha ileri çalışmalarla astenospermik vakalarda bu metilasyon artışının nedenleri ve sonuçları daha net bir şekilde ortaya konulabilir.



KAYNAKLAR

1. Cassina A, Silveira P, Cantu L, Montes JM, Radi R, Sapiro R. Defective human sperm cells are associated with mitochondrial dysfunction and oxidant production. *Biol Reprod.* 2015;93(5):111–9.
2. Michaels GS, Hauswirth WW, Laipis PJ. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev Biol.* 1982;94(1):246–51.
3. Wei Y-H, Kao S-H. Mitochondrial DNA mutation and depletion are associated with decline of fertility and motility of human sperm. *Zool Stud.* 2000;39(1):1–12.
4. Cornuet J-M, Garnery L, Solignac M. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics.* 1991;128(2):393–403.
5. Iacobazzi V, Castegna A, Infantino V, Andria G. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool. *Mol Genet Metab.* 2013;110(1–2):25–34.
6. Stocco A, Siciliano G, Migliore L, Coppede F. Decreased methylation of the mitochondrial D-loop region in late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2017;59(2):559–64.
7. Tong H, Zhang L, Gao J, Wen S, Zhou H, Feng S. Methylation of mitochondrial DNA displacement loop region regulates mitochondrial copy number in colorectal cancer. *Mol Med Rep.* 2017;16(4):5347–53.
8. Stocco A, Mosca L, Carnicelli V, Cavallari U, Lunetta C, Marocchi A, et al. Mitochondrial DNA copy number and D-loop region methylation in carriers of amyotrophic lateral sclerosis gene mutations. *Epigenomics.* 2018;10(11):1431–43.
9. Tian M, Bao H, Martin FL, Zhang J, Liu L, Huang Q, et al. Association of DNA methylation and mitochondrial DNA copy number with human semen quality. *Biol Reprod.* 2014;91(4):101.
10. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R,

- Nygren K, et al. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Hum Reprod.* 2009;24(11):2683–7.
11. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, De Mouzon J, Sokol R, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Hum Reprod.* 2017;32(9):1786–801.
 12. Okonofua FE, Obi H. Specialized versus Conventional Treatment of Infertility in Africa: Time for a Pragmatic Approach/Méthode spécialisée contre la méthode conventionnelle pour le traitement de la stérilité: Le moment pour une approche pragmatique. *African J Reprod Heal Rev Africaine la Santé Reprod.* 2009;13(1):9–15.
 13. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1506–12.
 14. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* 2012;62(2):324–32.
 15. Agarwal A, Parekh N, Selvam MKP, Henkel R, Shah R, Homa ST, et al. Male oxidative stress infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *World J Mens Health.* 2019;37(3):296.
 16. Nieschlag E, Behre HM. *Male Reproductive Health and Dysfunction.* Springer; 2011.
 17. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010;5th ed.
 18. Kohn TP, Kohn JR, Owen RC, Coward RM. The prevalence of Y-chromosome microdeletions in oligozoospermic men: a systematic review and meta-analysis of European and North American studies. *Eur Urol.* 2019;76(5):626–36.
 19. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among

- fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 1995;332(5):281–5.
20. Miki K. Energy metabolism and sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:309–25.
 21. Biswas S, Ferguson KM, Stedronska J, Baffoe G, Mansfield MD, Kosbab MH. Fructose and hormone levels in semen: their correlations with sperm counts and motility. *Fertil Steril.* 1978;30(2):200–4.
 22. Gonzales GF, Garcia-Hjarles M, Napuri R. Corrected seminal fructose levels: index of secretory activity of seminal vesicles. *Arch Androl.* 1988;21(1):135–42.
 23. Narisawa S, Hecht NB, Goldberg E, Boatright KM, Reed JC, Millán JL. Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol Cell Biol.* 2002;22(15):5554–62.
 24. Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(47):16501–6.
 25. Visconti PE, Olds- Clarke P, Moss SB, Kalab P, Travis AJ, De Las Heras M, et al. Properties and localization of a tyrosine phosphorylated form of hexokinase in mouse sperm. *Mol Reprod Dev Inc Gamete Res.* 1996;43(1):82–93.
 26. De Martino C, Floridi A, Marcante ML, Malorni W, Barcellona PS, Bellocchi M, et al. Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell Tissue Res.* 1979;196(1):1–22.
 27. Ünal MS, Özer MC, Sönmez FH, Bayrak G, Demirbağ HO. Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü. 2017;
 28. Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schüssel K, et al. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(8):1627–34.
 29. Liu B, Du Q, Chen L, Fu G, Li S, Fu L, et al. CpG methylation patterns of human mitochondrial DNA. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–10.
 30. Hong CY, Chiang BN, Turner P. Calcium ion is the key regulator of human

- sperm function. *Lancet*. 1984;324(8417–8418):1449–51.
31. Haas Jr GG. Antibody-mediated causes of male infertility. *Urol Clin North Am*. 1987;14(3):539–50.
 32. Kibar Y, Seckin B, Erduran D. The effects of subinguinal varicocelectomy on Kruger morphology and semen parameters. *J Urol*. 2002;168(3):1071–4.
 33. Palmblad J, Mossberg B, Afzelius BA. Ultrastructural, cellular, and clinical features of the immotile-cilia syndrome. *Annu Rev Med*. 1984;35(1):481–92.
 34. Gagnon C, de Lamirande E, Sherins RJ. Positive correlation between the level of protein-carboxyl methylase in spermatozoa and sperm motility. *Fertil Steril*. 1986;45(6):847–53.
 35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–75.
 36. Hatree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 1972;48:422–7.
 37. Chuanzhong Y, Ming G, Fanglin Z, Haijiao C, Zhen L, Shiping C, et al. Real-time quantitative reverse transcription-PCR assay for renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Clin Chim acta*. 2002;318(1–2):33–40.
 38. Smith E, Jones ME, Drew PA. Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BMC Cancer*. 2009;9(1):1–12.
 39. Vertika S, Singh KK, Rajender S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility-an update. *Mitochondrion*. 2020;
 40. Castellini C, D'Andrea S, Cordeschi G, Totaro M, Parisi A, Di Emidio G, et al. Pathophysiology of Mitochondrial Dysfunction in Human Spermatozoa: Focus on Energetic Metabolism, Oxidative Stress and Apoptosis. *Antioxidants*. 2021;10(5):695.
 41. du Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G, Van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J Androl*. 2015;17(2):230.

42. Reinecke F, Smeitink JAM, Van Der Westhuizen FH. OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.* 2009;1792(12):1113–21.
43. Abd Elrahman MM, Hassanane MS, Alam SS, Hassan NHA, Amer MK. Assessment of correlation between asthenozoospermia and mitochondrial DNA mutations in Egyptian infertile men. *J Genet Eng Biotechnol.* 2021;19(1):1–15.
44. Al Zoubi MS, Al- Batayneh K, Alsmadi M, Rashed M, Al- Trad B, Al Khateeb W, et al. 4,977- bp human mitochondrial DNA deletion is associated with asthenozoospermic infertility in Jordan. *Andrologia.* 2020;52(1):e13379.
45. Baklouti-Gargouri S, Ghorbel M, Mahmoud A Ben, Mkaouar-Rebai E, Cherif M, Chakroun N, et al. Mitochondrial DNA mutations and polymorphisms in asthenospermic infertile men. *Mol Biol Rep.* 2013;40(8):4705–12.
46. Taanman J-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics.* 1999;1410(2):103–23.
47. van der Wijst MGP, van Tilburg AY, Ruiters MHJ, Rots MG. Experimental mitochondria-targeted DNA methylation identifies GpC methylation, not CpG methylation, as potential regulator of mitochondrial gene expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–15.
48. Gao D, Zhu B, Sun H, Wang X. Mitochondrial DNA methylation and related disease. *Mitochondrial DNA Dis.* 2017;117–32.
49. Xu A, Hua Y, Zhang J, Chen W, Zhao K, Xi W, et al. Abnormal hypermethylation of the VDAC2 promoter is a potential cause of idiopathic asthenospermia in men. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–9.
50. LEE H-C, YIN P-H, LU C-Y, CHI C-W, WEI Y-H. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J.* 2000;348(2):425–32.
51. Sharma N, Pasala MS, Prakash A. Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Environ Mol Mutagen.* 2019;60(8):668–82.

52. Chianese R, Pierantoni R. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. *Antioxidants*. 2021;10(1):92.
53. Bui AD, Sharma R, Henkel R, Agarwal A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia*. 2018;50(8):e13012.



FORMLAR**“Mitokondriyel DNA’nın D-loop Bölgesinin Metilasyonunun Sperm Hareketi
Üzerine Etkisinin Araştırılması”
Araştırması Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu****Hastanın Adı- Soyadı:****Protokol No:****Sayın Hastamız,**

Tıbbi durumunuz ve hastalığınız tanı ve/veya tedavisi için size önerilen tüm tıbbi ve/veya cerrahi uygulamalar konusunda bilgi sahibi olmak en doğal hakkınızdır. Bir yandan bu tedavi sürecine normal standartlarda devam ederken diğer yandan tedavi ve takip döneminizde sizin klinik durumunuz, rutin bakılan kan değeri ve sperm sonuçlarınız, takibiniz ile ilgili verileri araştırma amacıyla kullanmak istiyoruz. Bu araştırmada yer almayı kabul veya ret edebilirsiniz. Her iki durumda da tıbbi tedavinizin normal seyrinde devam edeceğini belirtiyorum.

Sayın Hastamız,

Erkek infertilitesi (kısırlık), çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin önemli bir sorunudur. Bu sorunu ortaya koyabilmek için spermiyogram (sperm sayımı) yapılmaktadır. Yapılan sayım sonucunda sperme ait bazı sorunlar anlaşılabilen ve kısırlığa neyin sebep olduğu ortaya konabilmektedir. Astenospermi (sperm hareket azlığı) bu sorunlardan biridir.

Bu çalışmada sperm sayımı yapılan ve sperm hareket azlığı tanısı konulmuş hastaların spermelerindeki bazı moleküler ve hücresel değişimleri laboratuvar ortamında incelemeyi amaçlıyoruz. Onay vermeniz veya vermemeniz durumunda tedavi ve takibiniz ile ilgili hiçbir değişiklik olmayacaktır. Klinik durumunuzda iyi veya kötü yönde hiçbir değişiklik öngörülmemektedir. Çalışmaya dahil olduğunuzda ise bu veriler ayrı bir bilgisayar ortamında kaydedilerek analizi yapılacaktır.

Alınan verilerin gizliliği açısından güvenlik sorunu yaşanmayacağını taahhüt ederiz.

Çalışmaya devam etmeniz için öngörülen süre 12 aydır. Bu süreçte tedaviniz ile ilgili oluşabilecek tüm durumlar için aşağıdaki numaralı telefonlardan 24 saat bize ulaşabilirsiniz.

Uzm. Öğr. Dr. Birgi Ercili
Prof. Dr. K. Emre AKKUŞ

+90 555 513 93 73
+90 532 344 95 40

Hasta / Koruması / Vekili tarafından tebliği:

Doktor/sorumlu sağlık personeli tarafından tıbbi durumunuz hakkında bilgilendirme yapıldı.

Oluşabilecek komplikasyonlar ve olası riskler ayrıntıları ile anlatıldı.

Bu çalışmadan istediğim zaman ayrılabilirim anlatıldı.

Çalışma süresince karşılaşılabileceği olası durumlar, yan etkiler anlatıldı.

İşlem sırasında fotoğraf ya da video görüntüler alınabilecek ve bunlar kimliğimizi ortaya çıkarmayacak şekilde eğitim amaçlı kullanılabilceği anlatıldı.

Hastalığınızla ilgili klinik bulgu, tetkik, tedavi ve sonuç bilgilerinin tüm kimlik bilgilerinizin gizli kalmak koşuluyla, geriye veya ileriye dönük bilimsel çalışmalar için kullanılabilceği ve yayınlanabilceği anlatıldı

Bu çalışma süresince tarafıma herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Tarafımdan da herhangi bir ücret alınmayacaktır. Bağlı bulunduğum Sosyal Güvenlik Kurumundan da herhangi bir ücret alınmayacaktır.

Tüm gerekli bilgiler doktorum tarafından açıklandı. Herhangi bir beklenmedik durumda, olumsuz durum karşısında yukarıda ismi yazılan doktoruma 24 saat ulaşabileceğim anlatıldı. Doktor bilgilerim paylaşıldı.

Alınacak numunelerimin saklanıp başka çalışmalarda kullanılabilmesini onaylıyorum.

Bu bilgiler ışığında, yukarıda açıklanan “Mitokondriyel DNA’nın D-loop Bölgesinin Metilasyonunun Sperm Hareketi Üzerine Etkisinin Araştırılması” çalışmasına hiçbir baskı, zorlama olmaksızın kendi rızamla şahsımın katılımına / vekili olduğum hastanın katılımına onay veriyorum.

Tarih: -----/-----/-----

Saat: -----

	Adı – Soyadı	İmza
Hasta / Hasta yakını (*) (yakınlık derecesi----- -----)		
Tanık		
Sorumlu sağlık personeli		

***Hastanın yakını: Vesayeti altındakiler için vasi, reşit olmayanlar için anne- baba, bunların bulunmadığı durumlarda birinci derece kanuni mirasçılar.**