



**SPERM DRP1 VE MFN2 PROTEİN
MİKTARLARININ İN VİTRO FERTİLİZASYON
BAŞARISINDAKİ ROLÜ**

Fatma AKSOY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Osman Nuri KELEŞ

Yüksek Lisans Tezi-2019

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPERM DRP1 VE MFN2 PROTEİN MİKTARLARININ İN
VİTRO FERTİLİZASYON BAŞARISINDAKİ ROLÜ**

Fatma AKSOY

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Osman Nuri KELEŞ**

**ERZURUM
2019**

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

**SPERM DRP1 VE MFN2 PROTEİN MİKTARLARININ İN VİTRO
FERTİLİZASYON BAŞARISINDAKİ ROLÜ**

Fatma AKSOY

Tez Savunma Tarihi : 04.07.2019

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Osman Nuri Keleş (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Jale Selli (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Tolga Mercantepe (Recep Tayyip Erdoğan
Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2019**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi.....	4
2.2. Testisin Histolojisi	6
2.2.1. Spermatogenez	6
2.2.2. Spermiyogenez.....	7
2.2.2.1. Golgi Evresi	7
2.2.2.2. Şapka Evresi	8
2.2.2.3. Akrozom Evresi	8
2.2.2.4. Olgunlaşma Evresi.....	8
2.2.2.5. Spermiyogenez Sırasında Nükleustaki Değişimler.....	9
2.3. Spermin Yapısı	10
2.3.1. Baş Bölgesi	10
2.3.2. Kuyruk Bölgesi	12
2.3.2.1. Aksonem	12
2.3.2.2. Dış Yoğun Fiberler	13
2.3.2.3. Fibröz Kılıf	14

2.3.2.4. Mitokondriyal Kılıf.....	15
2.3.2.5. Bağlantı Parçası	15
2.3.2.6. Orta Parça	16
2.3.2.7. Esas Parça	16
2.3.2.8. Son Parça	16
2.4. Mitokondri Yapısı ve Fonksiyonu	16
2.5. Mitokondriyal DNA ve Kalıtımı.....	19
2.6. Mitokondri İç Dinamikleri.....	22
2.6.1. Mitokondriyal Fizyon	22
2.7. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri.....	27
2.8. Yardımcı Üreme Teknikleri.....	29
2.8.1. İn Vitro Fertilizasyon.....	30
3. MATERYAL VE METOT.....	32
3.1. Etik Kurul Onayı.....	32
3.2. Çalışma Populasyonu.....	32
3.3. Örneklerin Temini.....	32
3.4. İn Vitro Fertilizasyon.....	32
3.4.1. Oosit Toplama İşlemi.....	32
3.4.2. Semen Analizi Uygulaması	33
3.4.2.1. Spermioqram Analizi	33
3.4.3. Spermin Hazırlanması.....	35
3.4.4. ICSI İşlemi.....	35
3.4.5. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi ve Embriyo Transferi.....	35
3.5. Western Blot Analizi	37
3.5.1. Örneklerin Hazırlanması.....	37

3.5.2. Spektrofotometre ile Protein Tayini	37
3.5.3. Blotlama Basamağı	38
3.5.4. Bloklama Basamağı	39
3.5.5. Birinci Antikor ile Muamele	39
3.5.6. İkinci Antikor İle Muamele	39
3.5.7. Görüntüleme Basamağı.....	39
3.6. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Demografik Bulgular	41
4.2. DRP1 ve MFN2'nin göreceli yoğunlukları ile IVF Parametreleri Arasındaki Korelasyon Analiz Bulguları	41
4.3. DRP1 ve MFN2'nin göreceli yoğunlukları ile IVF Parametreleri Arasındaki Regresyon Analiz Bulguları.....	43
4.4. Klinik Gebe ve Gebe Olmayan Gruplarındaki Sperm DRP1 ve MFN2 Protein Miktarları	44
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKÇA.....	53
EKLER	66
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	66
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	67
EK-3. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL ONAY FORMU	68

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Osman Nuri KELEŞ'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez kapsamında yardım ve bilgilerini eksik etmeyen Atatürk Üniversitesi Tıp Bebek Merkezi ekibine, tecrübesinden ve bilgisinden yararlandığım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nurhan AKARAS'a teşekkür ederim. Western blot analizi için Sayın Doç. Dr. Özgür KAYNAR ve Sayın Arş. Gör. Mustafa İLERİTÜRK'e ve analizlerin görüntülenmesi için Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi personeline teşekkürü bir borç bilirim. Bu çalışmayı 2015/277 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür eder, çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Fatma AKSOY

ÖZET

Sperm Drp1 ve Mfn2 Protein Miktarlarının İn Vitro Fertilizasyon Başarısındaki Rolü

Amaç: Drp1 ve Mfn2 proteinleri mitokondriyal fizyon ve füzyon olaylarında görevli olan temel bileşenlerdir. Hücre içindeki mitokondriyal morfolojinin ve hücre sağlığının korunması fizyon ve füzyon arasındaki hassas dengeden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, sperm Drp1 ve Mfn2 protein miktarlarını araştırmak, yapı ve fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olmak, fertilizasyon, gebelik, embriyo kalitesi üzerine olan etkisini araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Bu çalışma infertilite için IVF merkezine başvuran 20 gebe 20 gebe olmayan 40 çift ile yürütüldü. Erkek hastaların spermiogram analizleri alındı ve Drp1 ve Mfn2 protein miktarlarının ölçümü için Western Blot analizi yapıldı.

Bulgular: IVF tedavisi alan erkek hastaların sperm Drp1 proteininin seviyeleri (göreceli yoğunluk değeri) ile fertilizasyon oranı, transplante edilebilir embriyo oranı, iyi embriyo kalitesi oranı ve klinik gebelik oranı parametreleri arasında korelasyon saptanmadı ($p>0.05$). Mfn2 proteinin miktarı ile iyi embriyo kalitesi parametreleri arasında pozitif korelasyon saptanırken ($r_p=0,345^*$, $p=0.029$) Mfn2 verileriyle fertilizasyon oranı, transplante edilebilir embriyo oranı ve klinik gebelik oranı parametreleri arasında korelasyon gözlenmedi ($p>0.05$).

Sonuç: Sperm Drp1 proteinin fertilizasyon, iyi embriyo kalitesi, gebelik üzerinde ve böylece in vitro fertilizasyon başarısında etkisinin olmadığı, Mfn2 proteininin ise sadece embriyonun kalitesinin iyileşmesine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Drp1, İn Vitro Fertilizasyon, Mfn2, Mitokondri

ABSTRACT

The Role of Sperm Drp1 and Mfn2 Protein Content in In Vitro Fertilization

Success

Aim: Drp1 and Mfn2 proteins are the main components involved in mitochondrial fission and fusion events. The preservation of mitochondrial morphology and cell health in the cell is due to the delicate balance between fission and fusion. The aim of this study was to investigate the effects of sperm, Drp1 and Mfn2 protein, to have knowledge about structure and function, fertilization, pregnancy and embryo quality.

Material and Method: This study was carried out with 40 pairs of 20 non-pregnant, 20 pregnant who applied to IVF center for infertility. Spermogram analyzes of male patients were performed and Western Blot analysis was performed to measure the amount of Drp1 and Mfn2 protein.

Results: There was no correlation between the levels of sperm Drp1 protein (relative density value) and fertilization rate, transplantable embryo ratio, good embryo quality ratio and clinical pregnancy rate parameters of male patients receiving IVF treatment ($p > 0.05$). While there was a positive correlation between the amount of Mfn2 protein and good embryo quality parameters ($r_p = 0,345^*$, $p = 0.029$) there was no correlation between Mfn2 data and fertilization rate, transplantable embryo ratio and clinical pregnancy rate parameters ($p > 0.05$).

Conclusion: Sperm Drp1 protein fertilization, good embryo quality, pregnancy and thus on in vitro fertilization success has no effect, Mfn2 protein has been found to contribute only to improve the quality of the embryo.

KeyWords: Drp1, In Vitro Fertilization, Mfn2, Mitochondrion

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKAP	:	A kinaz bağlayıcı protein
ATP	:	Adenozin trifosfat
BRDT	:	Testisle ilişkili bromodomain
CatSper	:	Sperm katyon kanal
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
DRP	:	Dinamin bağımlı protein
ER	:	Endoplazmik retikulum
Fis	:	Fisyon faktörü
GTPaz	:	Guanozin trifosfataz
hCG	:	İnsan koryonik gonodotropin
ICSI	:	İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu
IUI	:	İntrauterin inseminasyon
IVF	:	İn vitro fertilizasyon
MFF	:	Mitokondriyal füzyon faktörü
Mfn	:	Mitofüsin
MİD	:	Mitokondriyal bölünme proteinleri
NO	:	Nitrik oksit
OXPHOS	:	Oksidatif fosforilasyon
ODF	:	Dış yoğun fibril
PAS	:	Periyodik asit schiff
POST	:	Periyoneal oosit ve sperm transferi
PZD	:	Parsiyel zona diseksiyonu
TDF	:	Testis belirleyici faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Sperm kuyruk yapısı.....	12
Şekil 2.2. İnsan mitokondriyal DNA şematik gösterimi	21
Şekil 2.3. Drp1 proteinin temel bileşenleri ve modifikasyonlarının gösterimi	25
Şekil 2.4. Mfn2 proteinin temel bileşenleri	27
Şekil 3.1. Embriyo sınıflandırılması.....	36
Şekil 4.1. İyi Embriyo Kalitesi Oranı ve Mfn2 değeri arasındaki korelasyon.	43
Şekil 4.2. Klinik gebe ve gebe olmayan gruplar arasında Drp1 protein miktarı	44
Şekil 4.3. Klinik gebe ve gebe olmayan gruplar arasında Mfn2 protein miktarı	45
Şekil 4.4. Western blot analiz sonucu görüntüsü	45

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. İnfertilite nedenleri	29
Tablo 3.1. 2010 DSÖ kriterleri	34
Tablo 4.2. Sperm Drp1 ve Mfn2 göreceli yoğunluk parametrelerinin çeşitli veriler ile korelasyon analiz sonuçları	42
Tablo 4.3. Mfn2 ve Drp1 göreceli yoğunluk parametreleri ile iyi embriyo kalitesi oranı regresyon ilişkisinin anlamlı olduğu model değerleri.....	44



1. GİRİŞ

İnfertilite, dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Çiftlerin düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yılın sonunda gebelik sağlayamaması veya çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır. Ebeveynlik içgüdüleri tüm canlılarda var olan en güçlü arzudur, bu sebeple infertilite eşlerin her ikisi içinde psikolojik olarak stresli, ekonomik olarak pahalı, tanı ve tedavi için yapılan işlemler sebebiyle zorlu bir süreçtir. Evli çiftlerin yaklaşık %10-15'inde infertilite görülmekte olup %50'sinde kadın faktörü, %30'unda erkek faktörü ve %20'sinde ise hem erkek hem kadın faktörü yer almaktadır.^{1, 2} Yıllar içerisinde erkeklerde infertilitenin görülme sıklığı artmaktadır.

Erkek infertilitesi pretestiküler, testiküler ve posttestiküler bozukluklardan kaynaklanabilir. Vakaların çoğunluğunun sebebi testiküler, %30'unun ise genetik etiyolojiye sahiptir.³ 1677'de Antoni Van Leeuwenhoek tarafından spermatozoanın ilk keşfedilmesinden bu güne modern tıp gamet etkileşimini, üreme fizyolojisini anlamaya çalışmakta, infertilite sorununu çözmek ve tedavi etmek için çözümler aramaktadır.⁴ Erkek infertilite tedavisi ve teşhisi konusunda bu kadar çok çalışmaya rağmen ele alınması gereken çok sayıda soru vardır. Erkek infertilitesi genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik alanlarda karmaşık bir hastalık olarak kabul edilmektedir. İnfertil erkeklerin %30-40'ında bariz bir infertilite sebebi bulunamamıştır. İdiyopatik infertil erkekler normal semen parametrelerine sahiptir. Erkek infertilitesini teşhis etmek için kullanılan testler mikroskopik testlerden ziyade makroskopik testlerdir. Genomik, proteomik gibi diğer yüksek verimli tekniklerin kullanımındaki gelişmeler infertil erkeklere umut vermektedir.^{5, 6}

Sperm fizyolojisindeki son araştırmalar spermin sağlıklı olmasının ve fertilitésinin önemli bir göstergesi olan hücrenin güç kaynağı olarak bilinen mitokondri üzerine yoğunlaşmıştır. Sperm mitokondrisinin biyoenerji mekanizmasının anlaşılması, spermin

saklanması ve yardımcı üreme tekniklerinin iyileşmesi için önemli bir gerekçe olacaktır.⁷ Mitokondri kısmen bileşenleri kendi genomundan kodlayan oksidatif fosforilasyon ile adenozin trifosfat (ATP) üreten çift membranlı bir yapıdır.⁸ İnsan spermindeki mitokondri, çok farklı morfolojik heterojeniteye sahiptir ve döllenme öncesi ve sırasındaki tam işlevi tartışmalıdır. Mitokondri sadece spermin hareketliliğini sağlamakla kalmayıp aynı zamanda kalsiyum homeostazisinde, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, apoptoz gibi sperm fonksiyonlarına katılır. Spermatogenezin farklı aşamalarında morfolojisi, sayısı ve konumu değişmektedir.⁹ Mitokondriyal işlevsellik ve bütünlükteki değişiklikler, mitokondriyal yapı, mitokondriyal genomik, proteomik, transkripsiyonel bozulmalar, membran potansiyeli ve oksijen tüketimindeki değişiklikler spermde fonksiyon kaybı ile ilişkilendirilmiştir.¹⁰

Mitokondri tarafından gerçekleştirilen mitokondriyal füzyon ve fizyon mitokondrinin dinamik bir yapıda olmasıyla mümkün olur. Mitokondriyal yapı hücrenin bulunduğu durumlara göre farklılıklar göstermektedir. Mitokondriyal füzyon, mitokondriyal bağlantı için mtDNA ekspresyon ürünlerine erişim sağlamayı mümkün kılarken aynı zamanda diğer parçalarla bileşenleri değiştirerek zarar görmüş kısımların onarımını yapar. Fizyon ise hücre iskeleti boyunca artan enerji ihtiyacını karşılamak için kolayca taşınabilen daha küçük mitokondriler oluşturulmasını sağlar.^{11, 12} Füzyon ve fizyon dinamiklerindeki bozulmalar sonucunda Alzheimer, Parkinson, Huntington veya glokom gibi birçok nörodejeneratif hastalıklar meydana gelir ve aralarındaki dengenin bozulması ise diyabet, obezite gibi rahatsızlıklarla ilişkilendirilmiştir.¹³

Fizyonun önemli ana temel bileşeni olan dinamin bağımlı protein 1 (Drp1) sitozolik, mitokondri ve peroksizom fizyonunda görev alan, dinamin ailesine ait bir guanozin trifosfataz (GTPaz)'dır. Mitofüsin2 (Mfn2) ise mitokondriyal morfoloji ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlayan GTPaz ailesine ait mitokondriyal füzyon proteindir.

Drp1'in düşük regülasyonu mitokondriyal DNA'nın kaybına, mitokondriyal solunumun azalmasına, hücre çoğalması ve hücre ATP'yi azaltmıştır. HeLa hücrelerinde ROS üretiminde artışa sebep olmuştur. Oositte Drp1'in knockout edilmesi infertilite ile sonuçlanmıştır. ¹⁴Oositlerde Mfn2'nin düşük olması mitokondrinin dağılımını ve morfolojisini değiştirerek oosit olgunlaşmasını ve döllemesini azaltır.¹⁵

Bu çalışmadaki amacımız, İn Vitro Fertilizasyon (IVF) merkezine başvuran infertilite tedavisi gören erkek hastalarda sperm Drp1 ve Mfn2 protein miktarlarını araştırmak, yapı ve fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olmak, fertilizasyon, gebelik, embriyo kalitesine olan etkisini araştırmaktır. Bu proteinlerin araştırılması mitokondriyal dinamiklerin anlaşılması ve aralarındaki benzersiz dengenin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Literatürde insan sperminde Drp1'in çalışılmamış, Mfn2'nin ise çok az çalışılmış olması bu çalışmanın değerini arttırmaktadır. Ayrıca spermin hassas yapısının ve özelliğinin moleküler düzeyde incelenmesi ve daha ayrıntılı kesin tanı konulabilecek moleküler düzeyde ayıraçların bulunup geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar erkeklerdeki sebebi bilinmeyen infertilitenin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi

Gonadlar, boşaltma yolları ve dış genital organlar her iki cinstede farklılaşmamış bir dönemden geçtikten sonra gelişirler. Yanlış kromozomlar aracılığıyla bu dönemde cinsiyet belirlenir. Genetik cinsiyet Y kromozomunun fertilizasyon sırasında bulunup bulunmamasına göre değişirken, gonadal cinsiyet ise embriyonik dönemde cinsiyetin belirlenmesinden sorumlu olan Y kromozomunun kısa kolunda bulunan SRY geninin varlığıyla tespit edilir.¹⁶

Erkek gonadlarının gelişimi için sadece Y kromozomundan kodlanan genetik bilgi yeterli değildir. SRY geni tarafından kodlanan ve bir transkripsiyon faktörü olan TDF (testis belirleyici faktör), DNA'nın yapısını değiştirerek diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını sağlayarak testislerin ve diğer cinsiyet organlarının oluşumunu başlatan gen ekspresyonuna neden olur.¹⁷

Gonadal kordonlar üç kaynaktan köken alırlar; mezodermal epitel, embriyonik bağ dokusu ve primordial germ hücreleri. 5. haftada gonadal gelişim ortaya çıkar ve başlangıçta çöломik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş gonadal sırtlar içerisinde 6. haftaya kadar germ hücreleri yoktur. Epitelyal kordonlar embriyonik bağ dokusu içerisine doğru kısa zamanda büyürler ve işte o zaman farklılaşmamış gonad dışta korteks ve içte medulladan oluşmaktadır.^{18, 19}

Embriyo XY kromozomu içeriyorsa medulla testise farklılaşır, korteks ise bir takım kalıntıları dışında geriler dejenere olur. Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisiyle testis belirleyici faktör kodlanır ve primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam ederek testis ve medullar kordonları oluşturmak üzere medulla derinliklerine kadar ilerler.²⁰ Daha sonra rete testis tübüllerini oluşturmak için ince hücre kümeleri birbirleriyle anastomoz yaparlar. Kısa zamanda bu kordonlar gonadın yüzey epiteli ile

ilişkilerini kaybederek gonadın içini tamamen doldurur. Yoğun fibröz bir bağ dokusu olan tunika albuginea gelişimin daha ileri evrelerinde testis kordonlarıyla yüzey epiteli arasına girer. Genişleyen testis aşamalı olarak ayrılan mezonefrozdan ayrılır ve kendi mezenteri olan mezorçiyum ile asılı hale gelir. Seminiferöz kordonlar, seminiferöz tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılırlar. Erken evrede mezenkim, leyding (interstisyel) hücrelerini oluşturur ki bu leyding hücreleri farklılaşmamış primordiyumun testise gelişimini uyarır.¹⁹

Gestasyonun 8. haftasında Leyding hücreleri androjenik hormonları (testosteron ve androsteinedon) salgılamaya başlayarak mezonefrik kanalların ve dış genitalerin maskulin olarak farklılaşmasını uyarır. Mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı hal alır ve epididimis oluşur, kanallardan kalıcı olanları ise efferent duktulileri oluşturur. Duktus epidididimise açılırlar ve mezonefrik kanal kalın bir düz kas tabakası kazandığında ise duktus deferens oluşur. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) testesteron üretimini stimüle eder. Ayrıca fetal testisler içerisindeki sertoli hücreleri tarafından bir glikoprotein olan antimülleriyan hormon salgılanır ve paramezonefrik (mülleriyan) kanallarının gelişimini baskılar.^{17, 18}

Testisler gonad halindeyken lumbal bölgede bulunurlarsada 3. fütal aydan itibaren skrotuma doğru inmeye başlarlar ve buna descensus testis denir. 3. aydan itibaren testisler periton altına iniş yaparlar, 5. ayda inguinal halkaya yaklaşır ve 7. ayda kanalı geçerler. Testislerin bu göçüne testesterona duyarlı olarak kısalan testis ve skrotum arasında bağlantıyı sağlayan gubernakulumun sebep olduğu bilinmektedir. Doğumda testisler skrotuma tamamen inmiş bulunurlar. Bazen tek ya da çift testis iniş yapamaz ve pelviste kalır buna kriptorşidizm denir. Testiste önemli değişiklikler yapabilir ve testiküler kanser riskini arttırır.²¹

2.2. Testisin Histolojisi

Erkek gametler gebeliğin 4. haftasında yolk kesesi duvarı endoderminden gelişir, primordial germ hücrelerinden köken alırlar ve gonadlarda mitozla sayılarını arttıırırlar.²¹

Her bir testis düz kas hücreleri içeren yoğun fibroblastik bir bağ dokusu olan tunika albuginea ile çevrelenmektedir. Tunika albuginea testisin posterior yüzeyinde kalınlaşır ve organ içerisine sokulur. Buna mediastinum testis denir ve fibröz ince uzantılar yaparak içerisini sayıları 250 kadar olan piramidial lobüllere böler. Her bir lobül ise sayıları 1 ila 4 arasında değişen kıvrıntılı seminifer tübüller içerir. Seminifer tübül içerisinde spermatojenik hücrelerin sperm haline dönüşümü gerçekleşir. Seminifer epitel germinal epitel ile döşelidir. Germinal epitelde bulunan sertoli hücreleri, sperm oluşumu sırasında hücreleri saran, uzun piramidiyal hücrelerdir.²²

Leyding hücreleri tarafından salgılanan erkek cinsiyet hormonu olan testesteron; erkek fetusta gonadların normal gelişimi için gerekliyken, pubertede sperm üretiminin başlatılmasından, cinsiyet bezlerinin salgılarından ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumludur. Puberteden hemen önce seks kordonlarının içleri boşalarak seminifer tübül haline gelir ve pitüiter gonadotropinlerin seviyelerinin artmasıylada eşsiz bir süreç olan spermatogenez başlar.²³

2.2.1. Spermatogenez

Puberteyle primordial germ hücreleri diploid germ hücreleri olan spermatogonyumlara farklırlar. Spermitositogenez adı verilen mitoz bölünme aşamasında spermatogonyumlar bölünerek Tip A koyu spermatogonyumları oluştururlar.²⁴ Bol heterokromatin içeren, oval çekirdeğe sahip ve yoğun bazofilik boyanan hücrelerin bir kısmı kök hücre olarak kalırken, soluk boyanan,oval ve ince granüler kromatine sahip olanlar ise Tip A açık spermatogonyumlara farklırlar. Tip A açık spermatogonyum mitokondri, çok az miktarda golgi ve endoplazmik retikulum

içerir. Ayrıca farklılaşma sürecinde ve spermin oluşumunda görevlidir. Tip A açık spermatogonyumun bir kısmı mitoz bölünme geçirerek en çok bulunan tip olan Tip B spermatogonyumunu oluşturur. Bazal laminayla bağlantıları daha azdır ve sitoplazmalarında diğer A tiplerine göre daha fazla ribozom bulundurlar. B tipi spermatogonyumlar mayoz bölünme geçirecek olan primer spermatositlere dönüşürler.²⁵

Seminiferöz epitelin en büyük hücresi olan primer spermatositler (diploit 4N DNA) yaklaşık 22 gün süren profaz evresinde leptoten, pakiten, diploten ve diakinez safhalarına ulaşıp metafaza geçerler. Ardından anafazda krossing over ve ayrılmaya uğrayan kromozomların karşı kutuplara ilerlemesiyle 1.mayoz bölünmeyi tamamlar ve iki adet sekonder spermatosit (haploit2N DNA) oluştururlar. Sekonder spermatositler 2.mayoz bölünmeyle spermatidleri meydana getirirler. Spermatogonyumlar ve spermatidler birbirlerine protoplazmik köprülerle bağlıdır ve sertoli hücrelerinin stoplazmalarındaki girinti ve çıkıntılarda gömülü halde bulunurlar.²⁶

2.2.2. Spermiyogenez

Haploid kromozoma sahip olan spermatidin olgun sperme farklılaşması sırasında meydana gelen yeniden şekillenme olarak tanımlayabileceğimiz spermiyogenez dört evreden oluşmaktadır.²⁴

2.2.2.1. Golgi Evresi

Basit bir hücre özelliğinde olan spermatid; stoplazmasında nukleusun yakınında belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriyonlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum içerir. Glikoprotein bakımından zengin ve PAS (Periyodik Acid Schiff) pozitif proakrozomal granüller golgi aygıtında birikir ve akrozomal vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelirler. İçeriği artan ve genişleyen vezikül aynı zamanda spermin ön kutbunda belirler. Sentriyoller ise jukstanuklear bölgeden spermatidin arka

kutbuna doğru hareket ederler. Bu aşamada mitokondriler sitoplazmanın kenarına doğru göç ederek plazma zarına yakın yerleşir.²⁷

2.2.2.2. Şapka Evresi

Akrozom vezikülü genişler ve çekirdekle temas ettiği noktadan başlayarak çekirdeğin ön yarısında yayılır. Çekirdek içeriği yoğunlaşır, akrozom bölgesinde çekirdek zarı porlarını kaybeder ve kalınlaşır.²⁸

2.2.2.3. Akrozom Evresi

Spermatidin yoğunlaşan çekirdeği yassılaşır ve uzar. Spermatidin başı sertoli hücrelerine gömülür ve seminifer tübülün bazaline doğru yönelir, kuyruk ise lümeneye doğrudur. Nukleusun sığ oluşuna tutunan sentriyollerin bir tanesi dokuz periferik 2 merkezli mikrotübül parçalarının bir araya gelmesini başlatarak aksonem yapısını meydana getirirken bu sentriyole dik açıyla konumlanan diğer sentriyol ise kuyruğu çekirdeğe bağlayan bağlantı parçasını oluşturur. Mitokondriyonlar flagellum posterior parçasını heliks tarzda sararak flagellumun orta parçasını oluştururlar.²⁸

2.2.2.4. Olgunlaşma Evresi

Spermatid flagellasının etrafındaki artık cisimcik denilen fazla stoplazma sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır, manşet dağılmaya başlayıp, dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda olgunlaşma tamamlanır. Olgun spermatozoonlar seminifer tübül lümenine doğru salınırlar.

Bu aşamada hareketsiz olan spermler pasif olarak sertoli tarafından salgılanan sıvı içerisinde olgun hale gelecekleri epididime geçerler. Daha sonra emisyon ve ejakulasyon ile vas deferens yardımıyla üretraya ulaşırlar. Spermatogenez ve spermiyogenez insanlarda yaklaşık olarak 65-75 günlük bir sürede tamamlanır.^{17,25}

2.2.2.5. Spermiyogenez Sırasında Nükleustaki Değişimler

Herbiri yaklaşık 50 kb kilobayt) DNA içeren sperm kromatininin en yaygın ve bilinen fonksiyonu paternal genetik bilgiyi oosite iletmektir. Erkek üreme hücrelerinde büyük kromatin değişiklikleri meydana gelir. Spermiyogenez sırasında histonların protaminlerle değiştirilmesi yer alır. Spermatide spesifik H2B varyantları var olan histonların yerine sentezlenir. Bu varyantlar kromatin açma kapasitesine sahiptir ve histon asetilasyonunu kolaylaştıran kararsız nükleozomları oluştururlar. Testis- spesifik bromodomain içeren protein (BRDT), hiperasetilasyon histonu ile birlikte histonların giderilmesine aracılık eder ve histonların geçiş proteinlerine geçişine yol açar. Son olarak geçiş proteinleri daha küçük, arjinin ve sisteinden zengin protaminlerle yer değiştirir.²⁹

Kromatindeki değişikliğin doğru olması için gereken protaminasyon DNA'nın korunması ve yoğunlaşması için gereklidir.³⁰ Sperm protamin içeriğindeki değişikliklerin DNA hasarı ve erkek kısırlığı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Protamin transkripsiyon aktivitesini önleyen gen susturma işlemine katılmaktadır. Drosophila'da yapılan çalışmada mayoz sonrası fazda az sayıda gende transkripsiyon tespit edilmiştir. Çok sayıda çalışma ise spermin binlerce farklı tipte RNA (mRNA, miRNA, İRNA ve antisense RNA) taşıdığını gösterdi. Sperm hücresi oosit için RNA sağlar, bunların bir kısmı normal embriyogenez için gereklidir. Ayrıca bazı sperm proteinleride fertilizasyondan sonra önemli rol oynar.³¹ Fare hariç çoğu memelide sentrozom ve sentrozom proteinleri paternal olarak kalıtılır.

Ejekulat spermatozonlarındaki nükleozomlarda histonlar tamamen ortadan kaldırılmamıştır. Sperm kromatininde yaklaşık olarak farelerde %1, insanda %15 ve bazı keseli türlerde %50 bulunur. DNA dizisinde kodlanan kalıtsal bilginin yanısıra epigenetik bilgide önemlidir. Epigenetik bilgi DNA metilasyonu, histonların modifikasyonları,

kromatinle ilişkili proteinler, RNA'nın varlığı ve kromatin yapısı ile oluşur. Normal embriyo gelişimi için DNA metilasyonu gerekli olduğu bilinmektedir.³²

2.3. Spermin Yapısı

Seminifer tübül lümenine geçen spermatozonlar morfolojik olarak olgun olmalarına rağmen fonksiyonel olarak olgun değildirler. Hareket kabiliyetini epididimis, duktus deferens, prostat, vezikula seminalis ve glandula bulboüretalisten salgılanan ve alkali olan semen salgısıyla kolaylaştırırken, dölleme yeteneğini dişi genital kanallarında kapasitasyonla sağlarlar.

2.3.1. Baş Bölgesi

Sperm başı; DNA'yı içermesi, koruması, oositi tanınması, oosit membranıyla füzyon yaparak içeriğini oosite aktarması gibi fonksiyonları nedeniyle önemlidir. Normal sperm başı yassı, sivri, 4,5 µm uzunluğunda ve 3 µm genişliğindedir.

Baş bölgesi akrozom, ekvator bölgesi ve akrozom sonrası bölgeden oluşur. Çekirdeğin 3/2'lik ön kısmını kapsar. Akrozom zarı plazma zarının altında bulunur ve arka tarafta bir katlantı yaparak ön kısma gelir. İki zar arasındaki dar boşluk olan akrozomal matrikste birçok hidrolitik enzim bulunur. Bu enzimler hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteaz olan akrozindir. Zonayı parçalayarak spermin geçmesini sağlayan akrozin bir inaktif zimojen olan proakrozin ile tutulur.¹⁷ Akrozom reaksiyonu sırasında salgılanan diğer bir zimojen ise sperminojendir. Bu enzimler akrozom reaksiyonu denilen egzositotik yolla salınırlar. Baş bölgesi membran akışkanlığı ve lipid içeriği, plazma membranındaki partiküllerin dağılımı, membran yüzeyi elektriksel yükleri arasında farklılıklar gösterir. Aktin, spektrin ve vimentin dağılımı membran bölgelerinde farklılıklar gösterir. Aktin ve spektrin ön akrozom ve esas parçada bulunur.³³

Akrozom başlığının arka tarafında ekvator bölgesi bulunur. Akrozom reaksiyonu ve akrozomal başın kaybindan sonra dış akrozomal başın oolemmaya bağlanması ön akrozom ile ekvator bölgesi arasındaki bölgeden olur. Ekvator bölgesi vimentinden zengindir ve bu elektron mikroskopunda pentalaminer bir görünüme neden olur.

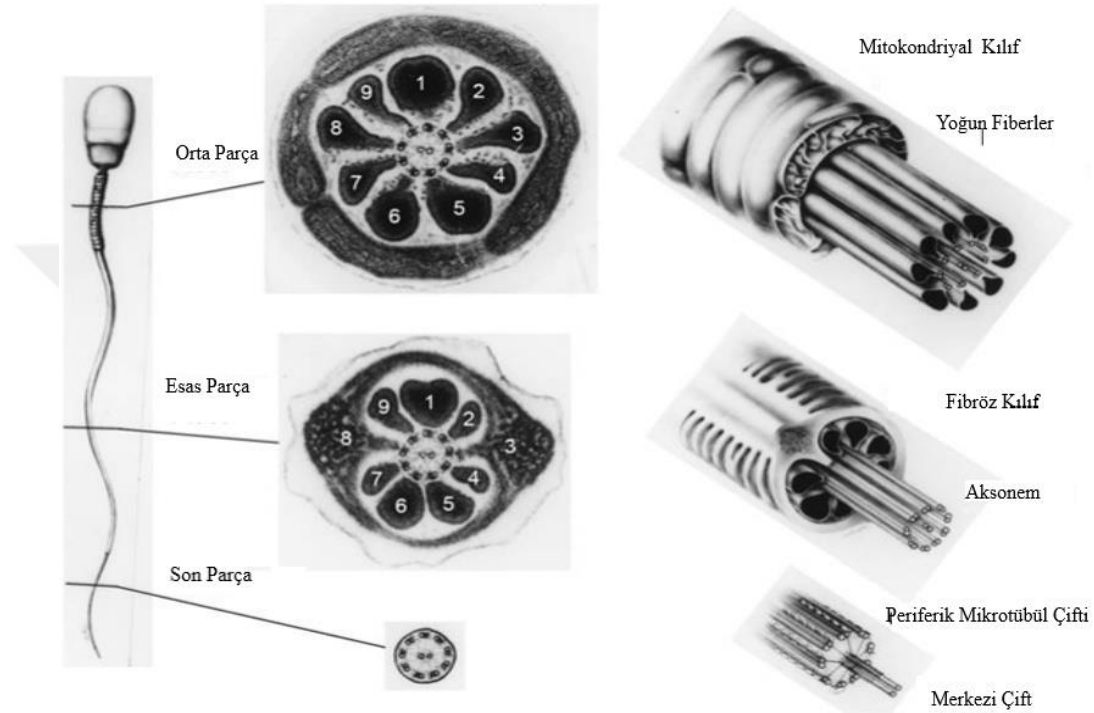
Akrozom ile nukleus arasında disülfid köprüsüyle sağlamlaştırılmış sert bir yapı kesintisiz olarak çekirdeği kaplar ve postakrozomal kılıfı oluşturur. Çekirdek haploid sayıda kromozom içerir ve döllenmeden sonra sıkıca paketlenmiş kromatin yeniden şekillenir. Baş bölgesini kuyruktan ayıran son halka bazal plakadır ve çekirdek zarı burada porlara sahiptir.³⁴

Plazma zarı akrozomun ön bölgesini çevreler ve önemli iki görevi vardır. Bunlardan ilki zona pellusidayı tanıma ve bağlanma ikincisi ise dış akrozomal membranla birleşmektir. Ön akrozomal bölgede membran glikokaliksinde bulunan kompleks glikokonjugatlar aracılığı ile zonaya bağlanma gerçekleşir. Hücre yüzey proteinlerin belirlenmesinde ise lektinler yaygın olarak kullanılırlar.³⁵

Kapasitasyon sırasında zona pellusidaya bağlanmadan önce glikokaliks kompozisyonu kaybolur. Akrozom reaksiyonunun başlamasıyla bu bölgede destabilizasyon ve dış akrozomal membran birleşmesi gerçekleşir. Sonraki değişiklik ise matriksin dekonduksiyonudur ve sonuç olarak dış akrozomal membran dalgalı bir görünümde olur. Böylece dış akrozomal membran ile plazma membran arasında noktasal birleşme bölgeleri olur. Daha sonra bu iki membranda delikler meydana gelir ve delinme (fenestrasyon) tamamlanır. Noktasal birleşme bölgeleri bir araya gelerek plazma ve dış akrozomal membran parçalarından oluşan çeşitli boyutta ve çoğunlukla küresel veziküllerle kaplanır. Matriks tamamen kaybolur. İç akrozomal membran ise kararlı yapısını koruyarak spermin zona pellusidaya geçerken maruz kalabileceği streslere karşı sınırlayıcı görev üstlenir.³⁶

2.3.2. Kuyruk Bölgesi

Hareketten ve enerji üretiminden sorumlu olan bu bölge en uzun bölgedir. Yapısal olarak dört ana bölüme ayrılmıştır; bağlantı parçası, orta parça, ana parça ve son parça. Bu kısımda aksonem ve dış yoğun lif yapısı dikkat çeker. Aksonem; dış yoğun fiberler (ODF), FS (Fibröz kılıf) ve mitokondriyal kılıfla çevrilidir (Şekil 2.1).³⁷



Şekil 2.1. Sperm kuyruk yapısı³⁸

2.3.2.1. Aksonem

Sperm kuyruğuyla ilgili ilk çalışmalar 1988'de Alman sitolog Ballowitz tarafından başlatıldı. Yaklaşık 60 yıl sonra Grigg ve 1949'da Hodge tarafından bir yıl sonra ise Manton ve Clarke 'ın yaptığı elektron mikroskobu çalışmaları ile kuyrukta 11 fiber gözlemlendi. 1952 yılına gelindiğinde ise gelişen fiksasyon ve ultramikrotomlarla kesilen ince kesitlerle Fawcett ve Porter tarafından iki merkezli 9 çift mikrotübül yapısı ortaya konuldu. İlk önce Manton ve Clarke tarafından 9+2 aksonemin türler arasında her yerde bulunabileceği ve bir milyar yıl önce erken ökoryatlarda gelişen evrimsel yapılar olduğu anlaşılmıştır. Spermin ayrıntılı yapısında türler arasında geniş farklılıklar vardır.

Dışardaki her çift A ve B alt birimlerinden oluşur. A mikrotübülünde ve ortadaki merkezi tübüllerde 13 adet protoflaman varken B mikrotübülü 10 adet protoflamandan oluşur. Mikrotübül protoflamanlarından herbiri yaklaşık 50 kda kütleyle sahiptir ve GTP bağlayıcı α - ve β - tübülün heterodimerlerinin uç uca polimerleridir. Mikrotüpler fonksiyonel olarak polar yapılardır. A tübülünden yan taraftaki B tübülüne kollar çıkar. Bunlar arasındaki mesafe 24 nm'dir ve iç ve dış olarak adlandırılırlar. Ca^{++} , Mg^{++} bağımlı ATPaz izomeri olan dynein, kolların ana bileşenidir, kaydırma hareketi yaparak kuyruğun hareketini sağlar ve dynein kolları taşınmadan önce sitoplazmada birleştirilir.^{39, 40}

Dynein aksonemal ilişkili faktör 2 (DNAAF2), lösinden zengin tekrar içeren 6 (LRRC6) ve PIH domain içeren 3 (PIH1D3) dış ve iç dynein kollarının yapımı için gereklidir ve yokluğunda kusurlu aksonemal oluşumlara yol açar. Tektin genlerinden birindeki mutasyona sahip farelerde erkeklerin kısır olduğu, spermin kusurlu bir hareketliliğe sahip olduğu ve dynein kollarının bir kısmının veya tamamının eksik olduğu gösterildi.⁴¹ 96 nm uzunluktaki neksin proteini ise her A tübülünü bir sonraki çift tübüle bağlayan ve kayma miktarını sınırlayan elastik yapılar olarak hareket eder. Sonic hedgehog sinyal yolunda bir G proteini olan Arl136'daki mutasyonlar embriyonik primer silyalarda AB birliğinin kapanmasını doğrudan veya dolaylı olarak engeller. Bu modifikasyonlardaki ve yolaklardaki mutasyonların sperm aksonem yapısını ve hareketliliğini etkileyip etkilemediği ve fenotipleri genellikle öldürücü olduğu için kısırlığa yol açıp açmadığı halen bilinmemektedir.⁴²

2.3.2.2. Dış Yoğun Fiberler

Dış yoğun fiberler flagellanın %60'ını oluştururlar. Sperm kuyruğu oluşumu sırasında her mikrotübül çiftinin distalinden başlayıp esas parça içinde sona eren dış yoğun fibriller bulunur. Dış yoğun fibriller gözyaşı damlası şeklinde ve dışta kesikli korteks içte medulladan oluşur. Medullanın sisteinden zengin, keratin benzeri bir protein

olması, disülfid çapraz bağları içermesi sperm kuyruğuna elastikiyet ve yapısına sağlamlılık katar. Her dış yoğun fibril farklı uzunluktadır. Bu fibriller kasılabilir proteinler içermezler fakat ATPaz aktiviteleri ve Ca^{++} bağlama özellikleri vardır. Sperm hareketinin dışı yolculuğundaki kapasitasyon ve hiperaktivasyonu dış yoğun fibrillerin doğru işlevine bağlıdır. Bu yoldaki genlerdeki mutasyonlar sperm oosite ulaşamayacağı için kısırlık ile sonuçlanacaktır.⁴³

2.3.2.3. Fibröz Kılıf

Sperm kuyruğunun bir başka destekleyici yapısı fibröz kılıftır. Fibröz kılıf geninin mutasyonu fibröz kılıf displazisine sebep olur ve yapısal olarak önemini gösterir. Fibröz kılıf sperm kuyruğunun hareketi için enerji sağlamada önemli bir yapıdır. Ana parçanın anterior kısmındaki dış yoğun fibril 3 (ODF3) ve ODF8'e bağlanmış iki uzunlamasına sütundan oluşur. Bugüne kadar yirmiden fazla fibröz kılıf ile ilişkili protein bildirilmiştir. İki yapısal ana bileşeni A-kinaz bağlayıcı proteinler AKAP3 ve AKAP4'tür. AKAP3 fibröz kılıfın oluşumunu başlatırken, AKAP4 ise geliştirir. AKAP4'ün delesyonu dış yoğun fibril ve aksonemde bozulmaya neden olmazken fibröz kılıf tamamlanamadığı için kısırlığa sebep olur. AKAP4 mutant farelerde AKAP3 ve gliseraldehit 3- fosfat dehidrojenaz (GAPD) düzeyleri düşüktür.⁴⁴ GAPD ve heksokinaz adlı iki enzim fibröz kılıfta yer alarak glikolitik yolda görev alır. Fibröz kılıf kalsiyum sinyalinde, sperm katyon kanal (CatSper) iyonları, kalsiyum bağlayıcı tirozin fosforilasyon düzenleyici protein (CABYR), kalsiyum bağlayıcı protein fibröz kılıf CABYR bağlayıcı protein (FSCB) etkileşiminde önemli rolü vardır. Kalsiyum seviyelerini kontrol eden iyon kanalı CatSper kompleksidir ve bu kompleksteki bozukluk spermin hiperaktivasyon yapamamasına ve erkek infertilitesine yol açar.⁴⁵

2.3.2.4. Mitokondriyal Kılıf

Mitokondriyal kılıf helikal ve sıkı şekildeki bir yapıdır. Mitokondriyal kılıfın oluşumu sırasında mitokondriler bir uçtan bir uca sarmal oluşturan aksonem ve dış yoğun fiberlerin çevresini sararlar. Sperm mitokondrisinin fonksiyonu somatik mitokondrilerle benzerdir. Oksidatif fosforilasyonla sperme enerji sağlar ve aynı zamanda proteinlerin ve protein izoformlarının bulunduğu yerdir. Annulus orta parça ve esas parçayı birbirinden ayıran yoğun halka yapısıdır. Annulusun orta parça ve mitokondriyal kılıfla ilgili olduğu hipotezi SEPT4 ve TAT1 annulus proteinleri knockout fare modelleriyle desteklenmiştir.^{46, 47}

Mitokondriyal kılıfın oluşumunda annulusun doğru yerleşimi ve varlığı tek başına yeterli değildir. Kinesin light chain 3 (KLC3)'ün mitokondriye bağlanması ODF'in bağlanmasında yetersizliğe bu da mitokondriyal kılıfta hataya yol açarak ileri hareketlilikte ve fertilitede değişikliklerle sonuçlanır. Selenyumun taşınması için gerekli olan bir protein olan selenoprotein P (SEPP1) mitokondriyal proteinin oluşumu için gereklidir. Yapılan çalışmalarda Sepp1 ve selenyum olmayan farelerde mitokondriyal kılıfta bozukluklar ve kısırılık olduğu saptanmıştır. Selenyum eksikliğinin etkisi sperm için mikro besinlerin önemine dikkat çekmiştir. Sperm mitokondrisiyle ilişkili sistenden zengin protein (SMCP) mitokondriyal kapsülün dağılmasını önler.⁴⁸

2.3.2.5. Bağlantı Parçası

Başı kuyruğa bağlayan kısa bölgedir. Bir çift sentriyol ve kaba fiberlerin başlangıcını içerir. Distal sentriyolde çıkan mikrotübüller 9+2 şeklinde düzenlenerek aksonemi yaparlar. Proksimal sentriyol ise 9 adet üçlü dış mikrotübül içerir. Bu yapılar bağlantı parçasına esneklik kazandırarak bazal plak bağlantısında gerilim yaratmadan bükülmeyi sağlar

2.3.2.6. Orta Parça

3,5 µm uzunluğundadır ve annulus hizasına kadar uzanır. En önemli özelliği mitokondrileri sarmalayan mitokondri kılıfının varlığıdır. Ayrıca 9+2 mikrotübüler aksonem ve dokuz adet dış yoğun fiberlerden meydana gelir. Türe özgü sayıda mitokondri içerir ve insan sperminin mitokondrisi düzensiz aralıklarla dizilidir. Sarmalın 11-15 döngüsü vardır ve yaklaşık her sarmala 2 mitokondri denk gelir.⁴⁹

2.3.2.7. Esas Parça

Kuyruğun en uzun bölümüdür ve yaklaşık 40 µm uzunluğundadır. Yapısında aksonem, 7 dış yoğun fiber ve onları çevreleyen fibröz kılıftan oluşur. Esas parçanın karakteristik özelliği olan fibröz kılıf, yapısal proteinleri arasındaki disülfid bağlarındaki yapıyı stabil bir hale getirerek kuyruk hareketini kontrol eder.

2.3.2.8. Son Parça

Yaklaşık 5 µm uzunluğunda olan son parça fibröz kılıfın distalinden başlar. Sadece aksonem yapısından oluşur. Bu bölgede fibröz kılıf ve kalın fiberler kaybolur. Önce dynein kolları ve daha sonra sırasıyla iç ve dıştaki mikrotübüler çiftler kaybolur. En uca geldiğinde ise mikrotübül yapısı tümünden kaybolur.⁵⁰

2.4. Mitokondri Yapısı ve Fonksiyonu

Yunanca mitos (iplik) ve chondros (tane, buğday) sözcüklerinden oluşan mitokondri bazı ilkel protozoa ve memeli eritrositleri hariç oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde farklı sayı ve şekillerde bulunur.⁵¹ Mitokondrilerin kökenini açıklayan endosimbiyotik teoriye göre mitokondriler, bir endosimbiyotik alfa proteobakterinin Asgard Archaea ile ilgili bir konakçı hücreyle bir araya gelerek bütünleşmesinden kaynaklanan ortak bir ata organelinden gelmiştir.⁵² Mitokondriler yuvarlak, ovoid, filamentöz şekilde bulunabilirler yada spermde olduğu gibi aksonem etrafında sıralanmış şekilde de bulunabilirler. İki zarla çevrilmiş olan mitokondriler dört bölümden meydana

gelmiştir. Dış mitokondriyal membran; sınırları düzgün ve kesintisizdir. İçerisinde bulunan porin proteini sayesinde 10 kDa'dan daha küçük moleküllere karşı serbest geçirgenliğe sahiptir. İç mitokondriyal membran; por sayısı dış membrana göre daha azdır ve bu sebeple yarıgeçirgendir. Mitokondri içerisine çok sayıda kıvrım yaparak yüzey alanını arttıran krista adı verilen yapıları oluştururlar. İç membranın diğer bileşenleri ise iç yüzeye tutunmuş olan ribozomlar ile elektron transport sisteminde fonksiyon gören enzimler ve kofaktörlerdir. İç mitokondriyal membran ile prokaryotik organizmalar arasındaki hücresel membran arasındaki benzerlikler endosimbiyotik teoriyi doğrular niteliktedir.¹⁰

İntermembran alanı; 40-80 Å° arasındadır. İç ve dış membran arası intermembranöz aralıktır. Matriks aralığı ise mitokondriyal matrikside içeren iç membranla çevrili olan kısımdır. Mitokondriyal matriks; bakterilerdekine benzeyen sirküler DNA ve mitokondriyal ribozomlar bulundurur. Ayrıca çok sayıda Krebs siklusunu, lipidlerin β-oksidasyonu ve mitokondriyal DNA sentezi gibi fonksiyonu için gerekli olan birçok eriyik enzimleride içerir.⁷ İnsanlarda olgun oosit yüz binlerce mitokondri içerebilirken olgun sperm ise yüzden az mitokondri bulundurur.⁵³

Sperm hücrelerinin mitokondrisi kendine has somatik hücrelerden farklı özellikler taşır. Bunların ilki spermin orta kısmında aksonemin etrafına sıkıca sarılmış şekilde bulunmasıdır. Ana parçası ise mitokondriden yoksundur ve glikolitik enzimlerle zenginleştirilmiştir. İkincisi sitokrom gibi proteinlerin ve izoenzimlerin spesifik izoformlarına sahiptir. Bunlar sitokrom c oksidaz VIb altbirimi, laktat dehidrogenaz (LDH-X ya da LDH-C4), E1-pirüvat dekarboksilaz (pirüvat dehidrogenaz kompleksinin bir bileşeni) ve kreatin kinazdır.⁵⁴ Üçüncüsü ise mitokondriyal kapsülün sistein ve prolin bakımından zengin olan selenoproteinler arasındaki çoklu disülfür köprüleriyle şekillendirilmesidir. Bu proteinler ise spermatidlerde enzimatik olarak aktif, olgun

spermatozoalarda ise yapısal proteinlerdir ve bu proteinlerden başlıcası selenoprotein fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidazdır. Mitokondriyi çevreleyen çözünmeyen proteinlerin yaklaşık %50'sini selenoproteinler kapsar. Bu karmaşık bağlanma mitokondrinin izole edilmesini zorlaştırmaktadır. Mitokondrial kılıf sertlik ve hipo ozmotik strese karşı dayanıklılığı arttırarak flagella içinde yapısal destek sağlar.⁷

Hücrenin enerji santrali olarak bilinen mitokondri oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile ATP üretiminde, sitrik asit döngüsü (kreps döngüsü), a-ketoasitlerin oksidatif dekarboksilasyonu, yağ asitleri, aminoasit metabolizmasının ve pirimidin sentezinin birçok reaksiyonunda temel görev üstlenir. Ayrıca hücre farklılaşması, ROS üretimi, apoptoz, kalsiyum sinyali, demir metabolizması gibi işlerde aktif rol alır.⁵⁴

Diğer hücrelerle benzer şekilde sperm hücrelerinde iki enerji üretim sistemi vardır; mitokondrial oksidatif fosforilasyon ve glikoliz. Mitokondrinin sperm motilitesindeki ana enerji kaynağı olup olmadığı substratlar (piruvat, malat, fumarat, sitrat veya 2-oksanotarat), spermatozoanın membran durumu, numunenin kaynağı (insan, fare veya diğer hayvanlar) gibi çeşitli faktörlerden dolayı halen tartışma konusudur.⁵⁴ Çalışmaların çoğunda ortaya çıkan genel kabule göre sperm hücrelerinin kadın üreme organında bulunan substratlara bağlı olarak enerji üretimi için farklı mekanizmalar kullanarak çok yönlü bir metabolik aktivite gösterdiği dir.⁵⁵ Öte yandan yüksek glikolitik aktivite düşük mitokondrial OXPHOS da araştırmacılar tarafından doğrulanmıştır.⁵⁶ Enerji üretimi için gerekli olan oksidatif fosforilasyon veya elektron taşıma sistemi mitokondri iç zarında düzenlenir ve beş protein kompleksi mevcuttur. İlk ve en büyük bileşeni NADH-dehidrojenaz (Kompleks I), süksinat dehidrojenaz (Kompleks II), sitokrom-c oksidoredüktaz (Kompleks III), sitokrom-c oksidaz (Kompleks IV) ve ATP sentazdır (Kompleks V). Sadece ETZ'ye elektron taşıyan Kompleks II hariç diğer solunum kompleksleri iç zar boyunca protonları taşıyarak proton gradientinin olmasını

sağlarlar. Kompleks IV 'te oksijen suya indirgenir. Siyanid, azid, karbonmonoksit Kompleks IV'ü inhibe eder. Son olarak Kompleks V veya ATP sentaz ise proton itici kuvveti kullanarak ATP sentezinden sorumludur. Kompleks II nükleer DNA tarafından kodlanırken diğer kompleksler mitokondri tarafından kodlanır.⁵⁴

2.5. Mitokondriyal DNA ve Kalıtımı

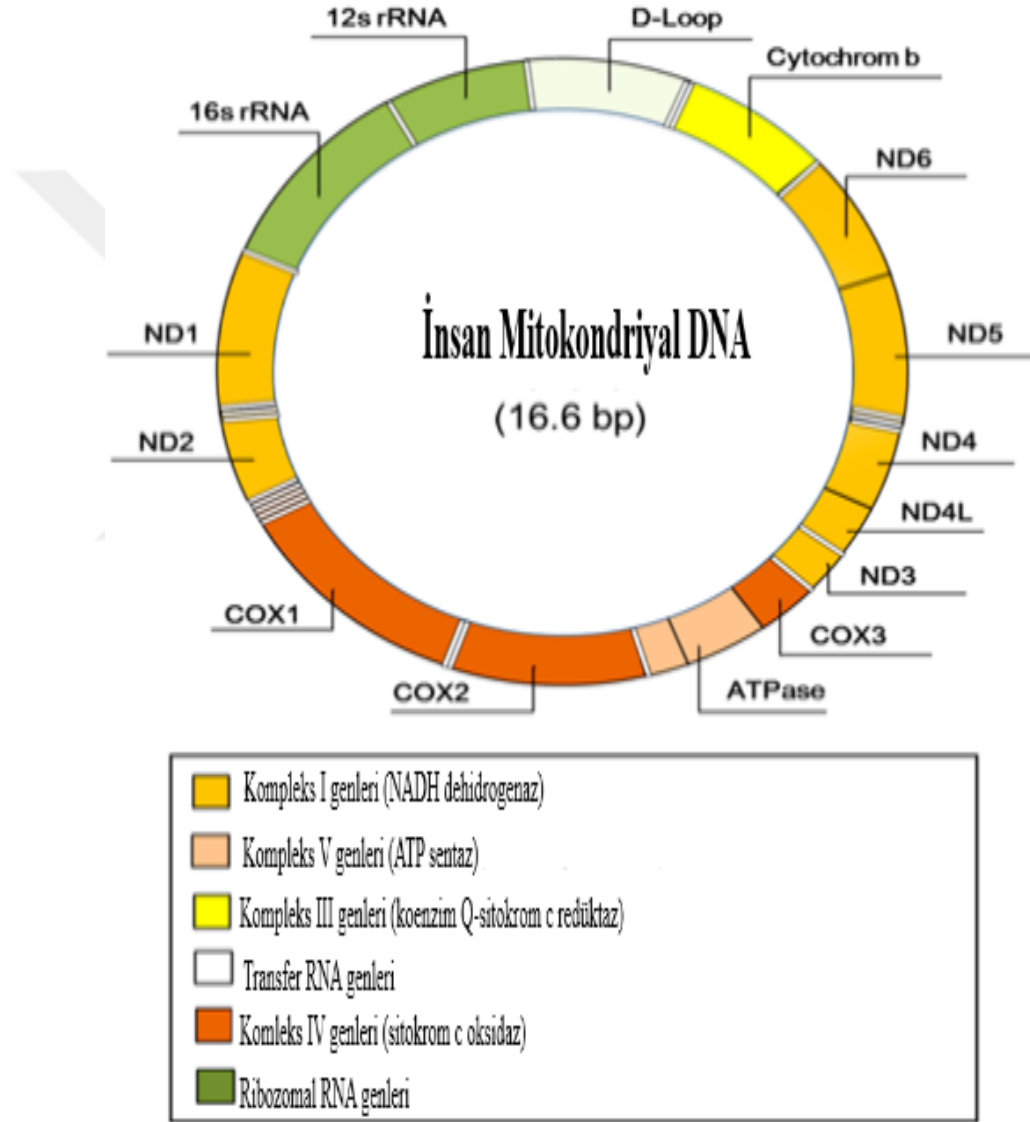
Mitokondriyi diğer organellerden ayıran özellikler sirküler bir genoma ve spesifik ribozomlara sahip olmasıdır. Böylece protein sentezide yapabilmektedir. Mitokondriyal genom 13-17 kb dairesel çift sarmallı DNA içerir ve oksidatif fosforilasyon enzimlerinin alt üniteleri olan 13 peptidi, 22 tRNA, 2 rRNA (16S,12S) şifreleyen 37 gene sahiptir.⁵⁷ Oksidatif fosforilasyon için gerekli olan diğer 74 polipeptid ise nükleer genom tarafından kodlanmaktadır.⁵⁸ ATP üretimi için hem mitokondriyal hemde nükleer genomda bulunan genlerin koordineli etkileşimi önemlidir.⁵⁹ mtDNA'daki iç halka sitozin nükleotidi bakımından zengin olduğundan hafif zincir, dış halka ise guanin nükleotidi bakımından zengin olduğundan ağır zincir olarak isimlendirilmektedir. mtDNA'da replikasyonun başladığı D-loop (Displacement loop) olarak adlandırılan bölge aynı zamanda transkripsiyon promotöründe yer aldığı kodlama yapmayan bir bölge içerir (Şekil 2.2). Nükleer DNA'dan farklı olarak mitokondride başlangıç kodonları AUA, AUU iken bitiş kodonları ise AGA ve AGG'dir.⁶⁰ mtDNA'daki mutasyon oranı nDNA'dakine göre 10-100 kat daha fazladır. Bunun sebepleri ise mtDNA da intron ve histonların olmaması, yeterli tamir mekanizmasının olmaması, replikasyonun hızlı olması ve proofreading olmamasındandır.^{47, 61, 62}

Memeli somatik hücrelerinin çoğu değişken sayıda mitokondriyal DNA kopyaları içerir. İnsan oositleri ortalama 200.000 mtDNA kopyası içerirken memeli spermatozoası 10-15.000 arasında içerir.⁶³ Hücre bölünmesinde mitokondriler yavru hücrelere replikatif segregasyon yolu ile dağılmakta olup bir hücredeki mtDNA'ların aynı olması

homoplazmi olarak adlandırılırken, bir hücrede mutasyonlar veya polimorfizmler varlığında farklılık gösteren iki tip mitokondriyal genomun olması durumu ise heteroplazmi olarak adlandırılır.⁶⁴ Bazı çalışmalar mtDNA kopya sayısı ile sperm kalitesi ve mtDNA çoğaltılmasının düzenlenmesi arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir. mtDNA'nın replikasyonu çekirdek tarafından kodlanmış mitokondriye taşınmış olan DNA polimeraz gama (POLG) ve mitokondrial transkripsiyon faktörü A (TFAM) tarafından kontrol edilir. POLG de yapılan mutasyonlar erken menopoz, Parkinson, Alper hastalığı (mtDNA tükenmesi sendromu) gibi hastalıklarda mtDNA delesyonlarının birikmesiyle ilişkilidir.⁶⁵ TFAM mtDNA transkripsiyonunu aktive eden HMG (yüksek hareketlilik grubu) proteindir ve replikasyonun başlatılması için gerekli olan RNA primerinin üretilmesini sağlar. TFAM ekspresyonu düşüklüğü ise mitokondrial miyopati, ensefalomiyopati gibi bozukluklarla ilişkilidir.

Uniparental mtDNA kalıtımı kabul edilen bir süreçtir. Oosit içerisindeki paternal mitokondri spesifik olarak ortadan kaldırılır ve mtDNA reepikasyonu olmaz. Oosit içerisindeki paternal mitokondriyi tanıma ve tahrip etme spermatogenez sırasında başlatılan ubiquitinasyon işleminin bir sonucudur ve en geç üçüncü embriyonik bölünme sırasında meydana gelecektir. Oosit içerisine fertilizasyon ile geçen mtDNA'nın kalıtımı nadir olduğundan muhtemel bir dezavantaj taşır ve mtDNA'sı ortadan kalkan bir sperm daha iyi bir zigot üretecektir.⁶⁶ Ubikuitin hedeflenen protein substratları üzerinde polyubikuitin zincirleri oluşturan proteolitik bir şaperondur. Polyubikuitin protein substratlarını bir proteolitik organel olan 26-S proteozoma yönlendirir. Lizozomal bozunma ve membran-lipoperoksidasyon enzimi 15-lipoksijenaz (15-LOX) ooplazmada mitokondrial bozulmaya katkı sağlar. Döllenmeden önce sperm mtDNA'sının elimine edilmesi ve erken embriyolarda sperm mitokondrisinin düzensiz dağılımı gibi iki mekanizma insanlarda maternal kalıtımda rol oynar. Yardımcı üreme teknikleri

gerçekleştirildiğinde iki noktaya dikkat edilmelidir. İlki mtDNA'nın dengesiz dağılımından kaynaklanan konsantre etkileri nedeniyle paternal mtDNA'nın etkisi göz ardı edilemez. Bir miyopati hastasının kas mtDNA'sının %90'nının paternal mtDNA olduğu bildirilmiştir. İkincisi ise embriyoya gönderilen paternal mtDNA oranı arttırılabilir.⁶⁷ Bununla beraber ICSI sonrası parental kalıtımın olduğuna dair bir kanıt belgelenmemiştir.⁶⁸



Şekil 2.2. İnsan mitokondriyal DNA şematik gösterimi⁶⁹

2.6. Mitokondri İç Dinamikleri

Dinamik organeller gibi mitokondride sürekli olarak hücrel değişikliklere uyum sağlamak için fizyon ve füzyon geçirir. Mitokondriyal fizyon hasarlı mitokondrinin ayrışmasına izin verirken aynı zamanda yeni bir mitokondride oluşturur, buna karşılık mitokondriyal füzyon ise fonksiyonel kusurları telafi etmek ve mitokondriler arasında materyal değişimine izin vererek tübüler ya da uzamış bir mitokondri oluşturur.⁷⁰ Mitokondrideki füzyon ve fizyon mitokondri bütünlüğünün korunması, mtDNA ve protein kalitesini korumak için gereklidir.⁷¹ Mitokondriyal dinamiklerle ilgili ilk çalışma 1915 yılında yapıldı. 1990'lı yıllara kadar mitokondri yapısıyla ilgili birçok çalışma transmisyon elektron mikroskopuyla gözlenmiştir.⁷² Işık mikroskopunun ve in vivo floresan işaretleyicilerin 1990'lı yıllarda gelişmesi ile mitokondri dinamikleri canlı hücrelerde gözlenmeye başlanmıştır. Mitokondriyal dinamiklerle ilişkili genlerin ifadeleri ilk olarak Hales ve arkadaşları tarafından 1997 yılında *Drosophila*'da tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.⁷³

2.6.1. Mitokondriyal Fizyon

Mitokondriyal fizyon diğer hücre yapılarının, sayısız proteinlerin katıldığı ve düzenlemeye tabi tutulduğu karmaşık bir işlemdir. Bunların arasında en önemlisi ise DNM1L geninin bir ürünü olan Drp1 tarafından gerçekleştirilir. Dinamin ailesine ait ancak GTPaz aktivitesine sahip bir protein olan Drp1, zar yapılarının yeniden yapılandırılmasını sağlayan işlemlerde görevlidir. Sadece mitokondrinin değil aynı zamanda peroksizomlarında fizyonuna aracılık eder.⁷⁴

Drp1 proteini diğer dinamin ailesi üyelerine benzer şekilde dört bölüme sahiptir; GTPaz (N terminalinde), orta (etki alanı), değişken (VD), ek B, GTPaz efektör bölgesi (GED) (Şekil 2.3). GTPaz, orta ve GED bölgeleri diğer dinamin ailesi üyeleriyle ortak olmasına karşın değişken bölge sadece Drp1'e özgüdür. Merkezi alan dimer, tetramer ve

yüksek yapılı Drp1 oluşumunda görev alır. Drp1 fizyolojik koşullar altında en küçük fonksiyonel birimi olan dimerleri oluşturur, daha yüksek dereceli oligomerleri oluşturmak için ise diğer aminoasit rezidüleri ile etkileşime girer. GTPaz'ın görevi GTP hidrolizi iken, GED bölgesi GTPaz alanına bağlanır ve aktivitesini uyarır. Değişken alan sarmal oligomerlerin çapını etkiler. İn vitro çalışmalarda değişken alanın tümünden silinmesi ile Drp1'in çapının 250 nm'den daha fazla olduğu, değişken alanın olduğu fakat B eki olmadığında spirallerin çapının 200 nm'nin altında olduğu B eki olduğunda ise 100 nm'nin altına düştüğü görülmüştür. B ekinin varlığının GTP1 GTPaz aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Değişken alan Drp1'in oligomerizasyonunun düzenlenmesini, aynı zamanda mitokondri yüzeyindeki doğru geometriyi almasını ve sonraki süreçte parçalanmaya yol açan zarların sıkılaştırılmasını sağlar.^{75, 76}

DNM1L gen ürünü olan Drp1 21 ekzondan 3 ekzonda (ekzon 3,16,17) alternatif eklemeye tabi tutulur. Ekzon 3 GTPaz bölgesinin bir kısmını kodlar, ekzon 16,17 ise B ekindeki bölgeyi kodlar. Bu eklemeler çeşitli izoformların oluşmasını sağlar. Örneğin izoform 2 hem mitokondriyle hemde mikrotübüllerle etkileşime girebilir. Bazı çalışmalara göre Drp1'in farklı izoformları arasında heterooligomerler oluşabildiği ve bununda spiral yapının boyutunun şekillenmesini sağlayabildiği gösterilmiştir. Drp1'deki bu alternatiflerin varlığı hücre tipine göre değişir ve proteinin hücredeki yerinde farklılıklar olur. Farelerde yapılan bir çalışmada beyindeki ve böbrekteki gen ekspresyon örneklerinin farklı olduğu ve farklı fonksiyonlarının olduğu görülmüştür.⁷⁷ Drp izoformlarının boyutu yaklaşık 80 kda ve 699 ila 749 aminoasit aralığındadır.⁷⁸

Drp1 proteini aktivitesini, yerini ve dinamikleri etkileyen post-translasyonel modifikasyonlar geçirir. Bu modifikasyonlar fosforilasyon, sumolasyon, ubikutinasyon ve S-nitrosilasyondur. Serin 616'nın sikline bağımlı B1 kinaz 1 (cdk1) ile fosforilasyonu organelin hücrelere eşit dağıldığı mitoz sırasında mitokondriyal fizyona neden olan

Drp1'in aktivasyonuna neden olur. Oksidatif stres altında C δ protein kinazı (PKC δ) aktive olur, fosforilasyona yol açar, mitokondrinin parçalanmasına ve anormal çalışmasına neden olarak beyin hasarına yol açar. Serin 637'nin fosforilasyonu protein ROCK1 ve AMPK ile olur. ROCK1 hiperglisemi sırasında aktive olur, Drp1'in aktivasyonuna neden olarak mitokondriyal fizyona yol açar ve sonuçta diyabetik nefropatiye neden olur. AMPK (AMP-aktive edilmiş protein kinaz) aracılığıyla Drp1 fosforilasyonu ise metabolik stres altında pankreatik β hücrelerinin işleyişini geliştirmek için mitokondriyal fizyonu inhibe eder. Bu davranıştaki farklılıklar hücre tipi, yaş, Drp1'in konumu gibi durumlara bağlı olabilir.⁷⁹

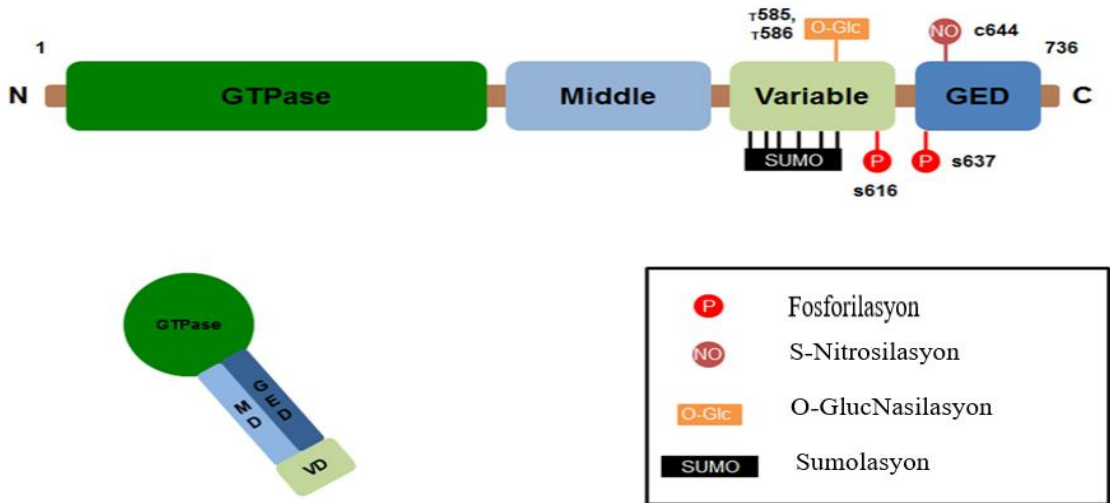
Sumolasyon proteine SUMO ekleme işlemidir. SUMO (small ubiquitin-like modifier) ubikuitin ailesine aittir ve kovalent enzimleri E1, E2 ve E3 ligazdır. SUMO için E3 ligaz proteini MAPL (mitokondriye bağlı protein ligaz)dır. Apoptoz sırasında proapoptotik Bax/Bak proteinlerindeki seviyenin artmasıyla Drp1 MAPL'ye gelir ve Drp1 'in mitokondriye bağlanmasına ve fizyon aktivasyonuna yol açar. Drp1'in bağlanmamasını ise SenP3 ve SenP5 sistein proteazları sağlar. Drp1'in SenP5 ile parçalanması mitoz sırasında mitokondriyal fizyonu kolaylaştırır. SenP3 proteazı hücrel stres altında Drp1 aktivitesini düzenler.⁸⁰

Ubikütinasyon substrat proteinine ubikuitin ekleme işlemidir. MARCH5/MITOL mitokondri üzerinde mutasyona uğramış, yanlış katlanmış yada hasar görmüş proteinlerin ubikütinasyonunda görevlidir ve fizyon sürecini düzenler. Parkin proteininin ise Drp1'i proteozomal bozulmaya götürerek Drp1 seviyesini kontrol ettiği ileri sürülmektedir.⁸¹

S-nitrosilasyon nitrik oksidin (NO) -SH sistein grubuyla reaksiyonundan ortaya çıkar. Drp1'in GED alanında gerçekleşir. NO sinyal molekülünün fazlalığı mitokondriyal fizyona sebep olarak özellikle sinir hücrelerinde olumsuz etkiye neden olur.⁸²

Dıştaki mitokondrial zar da Drp1 ile doğrudan etkileşime giren, Drp1'in fizyon bölgelerine alınmasında ve fizyon işleminde görev alan çeşitli proteinler vardır. Bunlar; mitokondrial fizyon faktörü (Mff), fizyon faktörü 1 (Fis1), 49/51 kda mitokondrial bölünme proteinleridir (MİD49 ve MİD51).⁸³ Mitokondrial fizyonda Drp1 aktivitesi için en önemli reseptör Mff'dir. Bu proteinler dış mitokondrial membran proteinleridirler. MİD49 ve MİD51 karboksi terminal alanları ile halkalar oluşturarak aktif olmayan Drp1'e bağlanmasından ve GTPaz aktivasyonunun inhibe edilmesinden sorumludurlar.⁸⁴

Mitokondriyal bileşenlere ek olarak endoplazmik retikulum ve aktin hücre iskeletide mitokondriyal fizyonda rol oynar. Endoplazmik retikulum (ER) tübülleri çevreler ve Drp1'in mitokondriye alınmasından önce mitokondriyal tübülleri sıkılaştırır. Organeller arası arayüzde ER ile ilişkili formin, INF2 aktin polimerizasyonunu kolaylaştırır ve aktin hücre iskeletinin küçük parçalarını oluşturur. Cortactin, Cofilin ve ARP2/3 gibi diğer aktin düzenleyici proteinler mitokondri ve fizyonla ilişkilidir.¹³



Şekil 2.3. Drp1 proteinin temel bileşenleri ve modifikasyonlarının gösterimi⁸⁵

2.6.2. Mitokondriyal Füzyon

İki veya daha fazla mitokondrinin bir araya gelerek büyük bir mitokondri oluşturması anlamına gelen mitokondriyal füzyon iki bağımsız iç ve dış membranın uyum

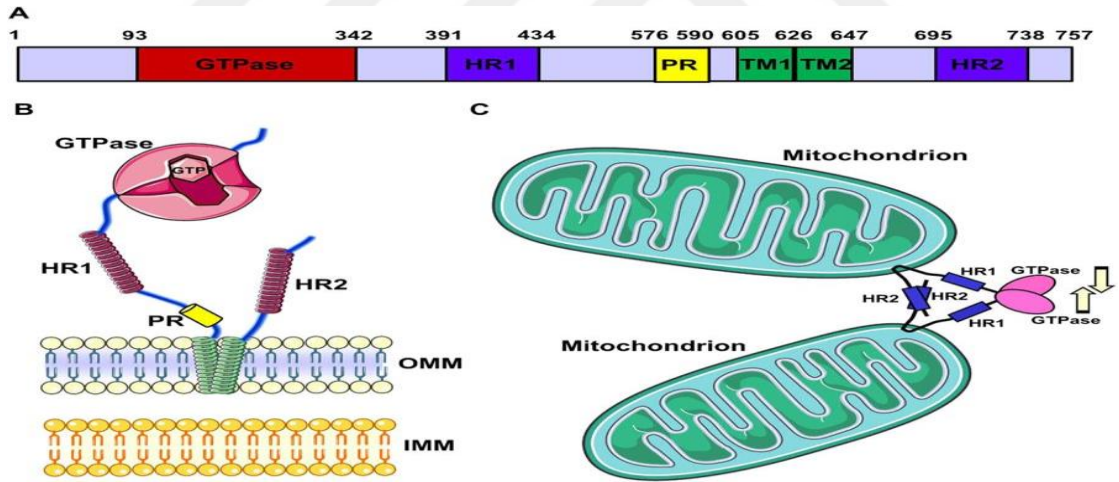
içerisinde kaynaşmasıyla gerçekleşen karmaşık bir süreçtir.⁸⁶ Mitokondriyal füzyon mtDNA kaybını önleyerek maksimum ATP üretimini koluştırmayı sağlamakla birlikte sağlıklı ve hatalı mitokondrilerin organel içeriğinin karışmasını sağlayarak mitokondriyal yeni bir içerik oluşturur.⁸⁷

İlk olarak *Drosophila melanogaster*'de keşfedilen mitokondriyal füzyon proteini Fzo proteindir. Fzo proteinin memelilerdeki homologu ise Mitofüsin 1 ve Mitofüsin 2 (Mfn1 ve Mfn2) proteinleridir.⁷⁴ Mfn1 ve Mfn2 ubikuitin transmembran GTPaz ailesine ait dış mitokondriyal membran füzyonu gerçekleştiren proteinlerdir. İnsan Mfn1 (741 aminoasit) kromozom 3 ve 18 ekzonlu (3q26.33) ve Mfn2 (757 aminoasit) kromozom 1 (1q36.22) 20 ekzonludur. Mfn1 ve Mfn2 %80 benzerdir ve aynı fonksiyonel domainleri paylaşırlar. Bu iki protein ortak olarak herbiri GTP'nin bağlanması ve hidrolize edilmesinde önemli fonksiyon oynayan amino-terminal GTPaz alanı, iki sarmal heptat tekrarı domain olan HR1 ve HR2 ve dış mitokondriyal membrana tutunmasını sağlayan iki parçalı karboksi terminal transmembran alanı içerir (Şekil 2.4). Hem HR2 hem de GTPaz alanı hücre stoplazmasına doğru uzantı yaparlar. HR2, iki bitişik mitokondriyi trans, anti-paralel, dimerik oluşturarak bağlayan homotipik ve heterotipik oligomerizasyona aracılık ederek dış zarların birbirleriyle bağlantı kurmasını sağlar. Sadece Mfn2'i protein protein etkileşimine katılan prolinde zengin bölge bulunur.⁸⁸

Mfn aracılı füzyonu açıklamak için yapılan son çalışmalarda siyanobakterilerde Mfn'nin homologu olan dinamin benzeri protein (BDLP)'nin kriyomikroskopi rekonstrüksiyonu yapılmıştır. GTP'nin varlığında lipit çift tabakanın aşırı eğriliğini tetikler ve yapısını geçici olarak değiştirir. BDLP'nin cis oligomerizasyonu ile iki lipozomu birbirine bağlamak için ince bir tüp oluşturulur ve lipit çift katman zorlanır. Mfn1 ve Mfn2'deki %20'lik farklılığa rağmen BDLP gibi cis oligomerler oluşturarak füzyon işlemini gerçekleştirdikleri varsayılmaktadır.⁸⁹ Son çalışmalar oksidatif stresin

cis-Mfn oligomer oluşumunu indükleyerek mitokondriyal füzyon oluşumunu gerçekleştirdiğini göstermiştir.⁹⁰

Mfn1 ve Mfn2 'nin yapısı transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası mekanizmalar ile düzenlenir. Ubikülitasyon ve fosforilasyonla düzenlenen proteozom aracılı bozulmayla elimine edilirler.⁹¹ Mfn2 ER stresini ve insülin direncini düzenler. Mfn2'nin bir diğer özelliği, apoptotik Bcl-2 proteinleri, proapoptotik Bax ve muhtemelen Bak ile etkileşime girmesidir.⁹² Mfn2 genindeki mutasyonlar otosomal dominant kalıtım gösteren Charcot-Marie-Tooth 2A gibi nörodejeneratif hasatalıklara neden olabilmektedir. Oksidatif metabolizma, hücre ölümü, hücre döngüsü, aksonem taşınmasında da roller üstlenmekte ve ayrıca obezite, diyabet, düz kasların gelişimindeki anormalliklerde genin ekspresyonu azalmaktadır.⁹³ Mfn2'nin kaybı doğum sonrası fare ölümüne yol açar ve serebellar atrofiyi tetikleyerek hareket ve dengede ciddi kusurlara neden olur.⁹⁴



Şekil 2.4. Mfn2 proteininin temel bileşenleri⁹⁵

2.7. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri

İnfertilite tipik olarak bir yıllık düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebe kalamama olarak tanımlanmaktadır. Çiftlerin %15-20'sini etkiler. Vakaların %30'unda tek faktör erkek iken %20'sinde ise kadın faktörü ile birlikte dir. Erkek kısırlık vakalarının %30-40'ında hiçbir neden belirtilmemiştir.^{96,97}

İnfertilite nedeniyle başvuran hastaların öyküsü, fiziksel muayenesi, endokrin değerlendirilmesi ve semen analizi yapılmalıdır. Hasta öyküsünde; hasta ve eşinin yaşı, erkeğin ve eşinin üreme öyküsü, cinsel uygulamalar, cinsel işlev, pediatrik öykü (kriptorşidizm, hipospadians, testis torsiyonu, kabakulak orşiti), gelişme (ergenlik yaşı), önceki cerrahi uygulamalar (skrotum, kasık bölgesi, karın, prostat, mesane), genital (cinsel yolla bulaşan enfeksiyon), üriner (alt idrar yolu semptomları, prostatit), alkol, sigara, çevre ve yaşam tarzı (ısıya maruz kalma), ilaç kullanımı, kanser öyküsü, tıp öyküsü, aile öyküsü (kısırlık, genetik hastalık) gibi önemli hususlar değerlendirilir. Fiziksel muayenenin amacı ise penis anatomisi, virilizasyon derecesi, testis epididim özellikleri, vas deferens varlığı, varikosel varlığı ve önceki yapılan ameliyatların görülmesidir. Endokrin muayenede folikül stimüle edici hormon (FSH), testesteron, luteinize edici hormon (LH) ve prolaktin seviyelerinin ölçülmesi yapılır. Doğuştan gelen sendromlar, beyin tümörleri, infiltratif hastalıklar ve ilaçlar, travma, enfeksiyon gibi nedenleri olan hipogonadotropik hipogonadizm, hipotalamik-hipofiz ekseninin normal gonadal fonksiyonunu stimüle edememesinden kaynaklanır. FSH, LH, testesteron seviyeleri düşük, prolaktin seviyesi ise bu hastalıkta normal veya yüksektir. Bir erkek hastada en önemli değerlendirme semen analizidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün belirlediği normal değerlere göre analizi yapılır. Ejekulatta 1×10^6 /mL'den yüksek lökosit sayısı bulunan hastalar için idrar kültüründe Chlamydia ve Gonore'nin varlığı test edilir.⁹⁸ Erkek infertilitesindeki etyolojik gruplar testislere göre pretestiküler, testiküler ve posttestiküler nedenler olarak sınıflandırılmıştır ve Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. İnfertilite nedenleri⁹⁹

Erkek İnfertilitesindeki Etyolojik Grupların Testislere Göre Sınıflandırılması
Pretestiküler Nedenler <ul style="list-style-type: none">• Hipogonadotrofik hipogonadizm - Kallmann sendromu• Hiperprolaktinemi• Farmakoloji
Testiküler Nedenler <ul style="list-style-type: none">• Varikosel• Kriptorşidizm• Testis kanseri• Radyasyon• Kemoterapi veya farmakolojik• Genetik azospermi veya oligospermi• Y kromozomu mikrolelesyonları• Klinefelter sendromu• Çevre• Enfeksiyon• Yaralanma veya travm• İmmotil silia sendromu (Kartagener Sendromu)• Anti-sperm antikorları
Posttestiküler Nedenler <ul style="list-style-type: none">• Cinsel birleşme ile ilgili• Farmakolojik• Retrograd boşalma• Vas deferensin konjenital bilateral yokluğu• Boşalma kanalı tıkanması veya seminal vezikül disfonksiyonu• Vaz deferenslerde vazektomi veya latrojenik hasar• Young sendromu• Sinir hasarı• Omurilik yaralanması• Retroperitoneal lenf nodu diseksiyonu• Sistemik hastalık

2.8. Yardımcı Üreme Teknikleri

İnfertilite problemini çözmeye yönelik geliştirilen birçok tekniği içermektedir. Tarihsel gelişimini inceleyecek olursak suni dölleme ile başlamıştır. 1779'da spermatozoanın çekirdek ve sitoplazma içerdiğini kanıtlayan rahip Lazzoro Spallanzani adlı bir fizyolog tarafından spermatozoanın dölleme için önemi bir deney sonucunda

gösterilmiştir. İlk kez embriyonun sperm ve yumurtanın fiziksel temas sonucu geliştiği saptanmıştır. Bu keşif ile Spallanzani köpekleri suni olarak döllemiştir. Suni döllemeden in vitro fertilizasyona geçişte sperm hazırlama teknikleri geliştirilmiş ve daha güvenli ve sağlıklı intrauterin inseminasyonlar popüler hale gelmiştir. 1920-1930'larda hormonların üreme ve gebelikteki önemi araştırılmıştır ve 1940'larda sentetik hormon kullanılmaya başlanılmıştır.¹⁰⁰ İn vitro fertilizasyon ile ilgili yapılan çalışmaların ilki Prof. Walter Heape'nin Cambridge Üniversitesi'nde 1890'larda yaptığı tavşan deneyindeki embriyo transferidir. 1969'ların sonlarında Edwards ve arkadaşları insan oositleriyle ilk başarılı in vitro fertilizasyonu gerçekleştirmişlerdir. 1978 yılında ise Louise Joy Brown adında sağlıklı bir tüp bebek in vitro fertilizasyon sonucu dünyaya gelmiştir.

Zamanla IVF tedavisinde farklı teknikler kullanılmaya başlanılmıştır. Yardımcı üreme teknikleri; IUI (İntrauterin inseminasyon), IVF (İn vitro fertilizasyon), ICSI (İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu), GIFT (İntrafollop gamet transferi), ZIFT (İntrafollop zigot transferi), PZD (Parsiyel zona diskisiyonu), SUZI (Subzonal inseminasyon), TET (Tubal embriyo transferi) ve POST (Periyoneal oosit ve sperm transferi) içerir.¹⁰¹ Hastanın yaşı, infertilite etyolojisi gibi faktörler göz önünde bulundurularak hasta için en uygun yöntem belirlenir. Bu yöntemlerden ilk ve en yaygın olarak kullanılanı ise in vitro fertilizasyondur.¹⁰²

2.8.1. İn Vitro Fertilizasyon

Oosit ve spermin in vitro ortamda bir araya getirilerek fertilizasyonlarının sağlanması ve gelişen embriyoların uterusu yerleştirilmesini içeren yardımcı üreme tekniğidir. Tubal faktör, endometriozis, erkek faktörü, açıklanamayan infertilite ve immunolojik infertilite gibi endikasyonlara sahiptir. Ovulasyon indüksiyonu, oosit toplanması, oositin döllemesi ve embriyo transferi aşamalarından oluşmaktadır.¹⁰³ Ovulasyon indüksiyonu için ilaç ve hormon tedavisi uygulanır. Oosit toplanması vajinal

ultrasonla yapılan yaklaşık 15-20 dk süren folikül sıvısının aspire edilmesiyle yapılan işlemdir. Daha sonrasında yumurtalar besiyerine alınır. Oosit dölleme işlemi standart dölleme veya ICSI olarak gerçekleştirilmektedir. Standart döllemede sperm numunesi alınır, konsantrasyonu ve hareketliliği değerlendirilir. Bir kültür kabının içerisine yumurtalar ve 50.000 hareketli sperm konularak inkübatöre yerleştirilir. 1992'de Palermo'nun ICSI'yi keşfetmesiyle yeni bir dönem başlamıştır. ICSI erkek faktörünün olduğu ve standart IVF'de yumurtaların % 30'dan daha azının döllenenmesi durumlarında kullanılır. ICSI'de kullanılan spermler ejakulattan elde edilebileceği gibi azospermik bireylerde epididimisten (mikroskopik epididimal sperm aspirasyonu, perkutan epididimal spermaspirasyonu şeklinde) ya da testisten (Testiküler sperm aspirasyonu (TESE)) elde edilebilir. ICSI tek bir sperm yumurta içerisine enjeksiyonunu içerir. Döllenenmeden sonraki sabah yumurtalar kontrol edilir ve iki pronukleuslu yumurtalar not edilir. Bir kaç saat içerisinde çekirdekler birleşir ve embriyo bölünmeye başlar. Embriyo transferi yumurta alımından 3 veya 5 gün sonra embriyo transfer kateteri ile uterusu yerleştirilir. 3. günde kaliteli embriyolar 6 ila 8 hücre arasındadır. 5. günde ise blastosiste dönüşmüştür. Gebelik tahlili için 12 gün beklenilir. Kanda β -hCG'nin yükselmesi bunun yanında USG'de gestasyonel kese ve fetal kalp atışının komfirmasyonu klinik gebelik olarak kabul edilmektedir.^{104, 105}

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul Onayı

“Sperm Drp1 ve Mfn2 protein miktarlarının in vitro fertilizasyon başarısındaki rolü ” adlı çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun kararıyla etik kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

3.2. Çalışma Populasyonu

Çalışmamızda 2015–2016 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği Tüp Bebek Merkezi'ne çocuk isteği nedeniyle başvuran 40 çift retrospektif olarak incelendi ve 27 ila 42 yaşlar arasında bulunan erkek hastalar etik kurul onayı alındıktan sonra çalışma populasyonuna dahil edildi.

3.3. Örneklerin Temini

Semen örneği tüp bebek merkezine başvuran 40 hastadan hastaların yaşı, boy ve kiloları, eşlik eden başka bir hastalığın olup olmadığı, kullanılan ilaçlar sorgulandıktan sonra hastaların semen örnekleri steril geniş ağızlı, toksik olmayan bir kap içerisine 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında alındı.

3.4. İn Vitro Fertilizasyon

3.4.1. Oosit Toplama İşlemi

Oosit toplama işlemi hCG dozundan 35-36 saat sonrasında gerçekleştirildi. Toplama işleminin yapılacağı günün sabahı doku kültür kabının ısıtıcı tablası (IVF Workstation L126), havalandırma sistemi çalıştırılarak petri kabı konuldu ve 37 °C'ye ayarlandı. OPU işlemi esnasında oositlerin zarar görmemesi için ışıklar kapatıldı. Hasta operasyon masasına dorsal litotomi pozisyonu verilerek yatırıldı. Steril örtüler örtülerek vajen ve vulva serum fizyolojik ile yıkandı. Steril aspirasyon iğnesi (Gynetics; Belçika) guide içinden geçirilerek fornikse yönlendirildi. Aspire edilecek folikül ultrasonografi cihazının ekranından bakılarak ortalama (-150) mmHg basınçla daha önceden ısıtılmış

falcon tüp Falcon, BD Fransa) içerisine aspire edildi ve hemen bitişikteki embriyoloji laboratuvarına teslim edildi. Folikül sıvısı stereo diseksiyon mikroskobu (SZ 61 Olympus, Japonya) kullanılarak incelendi ve oosit-kumulus kompleksi ayıklandı. 2 saat sonra G-MOPS Plus (Vitrolife, İsveç AB) bulunan petri kabının (Falco; ABD) değişik gözlerine dağıtıldı ve hyalüronidaz içeren medyum (Hyase-10X, Vitrolife, İsveç, AB) kullanılarak oosit çevresindeki kumulus korona kompleksi mekanik ve enzimatik yolla uzaklaştırıldı. ICSI için hazırlanan oositler 37 °C'deki inkübatörde (Labotect C200) inkübasyona bırakıldı.

3.4.2. Semen Analizi Uygulaması

İnfertil erkeklerden mastürbasyon yoluyla alınan semen örnekleri 37 C⁰de inkübatörde (Labotect C200) 30 dk likefiye olması beklenildi. Daha sonra örnekler spermiogram analizi için alındı.

3.4.2.1. Spermiogram Analizi

Semen örneği makroskobik ve mikroskobik olarak incelendi. Semen örneği makroskobik olarak; renk, koku, viskozite, likefaksiyon süresi ve pH açısından değerlendirilirken mikroskobik olarak da motilite, morfoloji ve aglutinasyon yönünden değerlendirildi.

Makroskobik Değerlendirme

Likefaksiyondan hemen sonra semenin gözlenmesine başlandı. Likefiye olma süresi 15-60 dakika arasındadır. Örnek pipetle dikkatlice çekilerek yerçekiminin etkisiyle damlaması beklenildi ve viskozitesi ölçüldü.

Ø: Viskozite normal

+: Biraz artmış viskozite,

++: Orta derecede artmış viskozite,

+++ : Çok artmış viskozite.

Likefiye olmuş normal bir semen homojen ve gri opelasan bir görünümüne sahiptir. Semen hacmi steril pipetle yada enjektörle çekilerek ölçülür. En az 1.5 ml olmalıdır (DSÖ 2010).¹⁰⁶

Mikroskobik Değerlendirme

Sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdesi DSÖ kriterlerine göre belirlenerek faz kontrast mikroskobunda 20 µm derinliğinde ve 200× lük büyütmede incelendi (Tablo 3.1). Konsantrasyonu ve motiliteyi hesaplamak için Makler sayım kamerası kullanıldı. Sperm hareketlerine göre derecelendirildi (+4:Hızlı ileri hareketli, +3:Yavaş ileri hareketli, +2:Yerinde hareketli, +1:Hareketsiz) (DSÖ 2010).¹⁰⁶

Tablo 3.1. 2010 DSÖ kriterleri

Parametreler	En düşük referans değer
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı(10^6)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 / ml)	15 (12-16)
Total motilite(PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite(canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi(normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
Ph	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit(10^6 per ml)	<1.0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	>20

3.4.3. Spermin Hazırlanması

Sperm seleksiyon yöntemi olan gradient yöntemi uygulandı. Bu yöntemde silica partiküller içeren mediumlar kullanıldı. % 90'lık ve % 50'lik gradient solüsyonları Spermgrad (Vitrolife) ve G-IVF Plus (Vitrolife) kullanılarak hazırlandı. 1/1 oranında konulup üzerine 3 ml semen örneği konularak 2000 rpm'de 20 dk santrifüj (Eppendorf) edildi. Sperm bulunan alt faz pipetle çekilerek üzerine 2,5 ml yıkama mediumu (G-IVF Plus) (Vitrolife) konuldu ve 1800 rpm'de 10 dk santrifüj (Eppendorf) edildi. Daha sonra üst faz alındı ve örnek ICSI için kullanılmak üzere 37 °C deki inkübatöre (Labotech C200) kaldırıldı.

3.4.4. ICSI İşlemi

ICSI işlemi için hazır olan oosit ve spermiller belli bir düzende konulmuş HEPES tamponlu medyundan (G-MOPS Plus) (Vitrolife) oluşan damlacıklar içeren petri kabı içerisine konuldu. Tutucu (holding) ve injeksiyon (ICSI) pipetleri (Sunlight) tutuculara takılarak joy sticklerle uygun pozisyon almaları sağlandı. ICSI pipeti ile bir sperm kuyruğu kırılıp hareketsiz hale getirilerek pipet içerisine çekildi. Oositin kutup cisimciği saat 6 veya 12 hizasına getirildi. Tutucu pipetle tutulan oosit stoplazmasına ICSI pipeti ile sperm bırakıldı ve ICSI işlemi tamamlanmış oldu. ICSI işlemi sonrasında geri kalan sperm örneği ise analiz edilmek üzere azot tankına -196C⁰ konuldu. ICSI sonrası 16-18. saatler arasında fertilizasyona bakıldı. 2. ve 3. günlerde embriyo kaliteleri takip edildi.

3.4.5. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi ve Embriyo Transferi

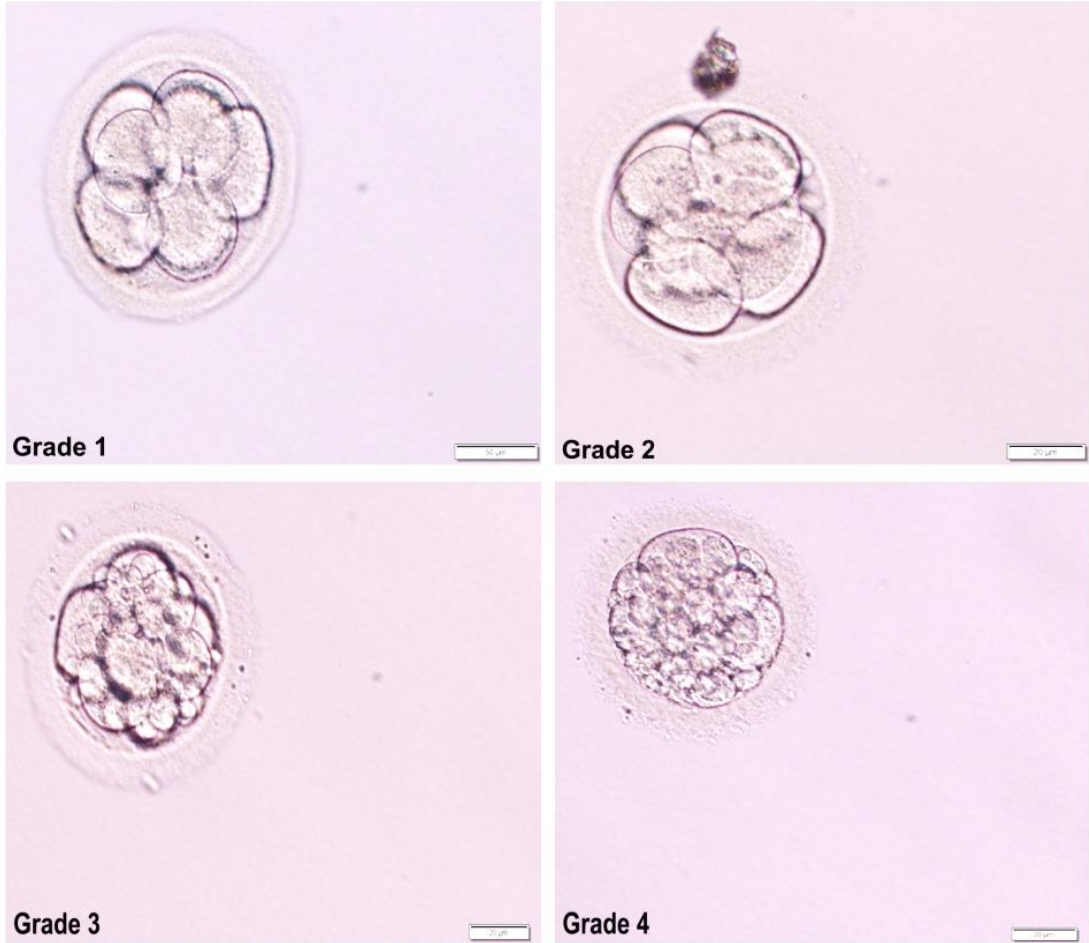
3. gün bölünmekte olan embriyoların morfolojileri ve embriyolojik gelişim durumları gözlemlendi. Fragmentasyonu ölçmek için embriyo hayali olarak dört bölüme ayrıldı ve kapladığı alan tahmini olarak belirlenildi. Embriyo David K.Gardner'a göre dört grade de değerlendirildi (Şekil 3.1).¹⁰⁷

Grade 1 Embriyo: Bu embriyolar eşit büyüklükte, simetrik blastomerele sahiptirler, fragmantasyon içermezler.

Grade 2 Embriyo: Eşit büyüklükte olmayan blastomer içermekle birlikte az miktarda (<% 10) fregmantasyon içerirler.

Grade 3 Embriyo: Blastomerleri eşit olmayıp fragmantasyonları fazladır (%10-50).

Grade 4 Embriyo: Blastomerleri eşit değildir ve fregmantasyonları %50'den fazladır.



Şekil 3.1. Embriyo sınıflandırılması

3. gün embriyolar transfer edildi ve 12 gün sonra β -hCG ölçüldü. Gebelik için β -hCG 5mIU/mL ve üzeri pozitif olarak kabul edildi.

3.5. Western Blot Analizi

3.5.1. Örneklerin Hazırlanması

Örnekler ependorf tüpe (Eppendorf) konuldu. 5000 rpm'de 10 dk santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-30R) edildi. Herbirinin üzerine 100µl'lik %2'lik SDC (Sodyum deoksikolat) eklendi. 3000 rpm'de 10 dk Tissue Lyser'a (TissueLyser, QIAGEN) konuldu. Süpernatant alınarak ependorf tüplerine konuldu ve -80 °C'de buzdolabında (Sanyo Ultra Low) saklandı.

3.5.2. Spektrofotometre ile Protein Tayini

Bunun için Bradford yöntemini kullandık. Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250'nin negatif yükte olması ve pozitif yüklü proteinlere bağlanarak 465 nm ile 595 nm arasında abzorbanans göstermesi prensibine dayanır. 5 µl süpernatant üzerine 45µl distile su konuldu ve vorteks (IKA MS3) yapıldı. 50µl örnek ve 450 µl Bradford protein assay reagent (Alfa Aesar) konularak iyi bir şekilde homojenizasyonu sağlandı. İlk önce distile su daha sonra örneğimizden 200µl konularak mikroküvette 595 nm'de ölçümleri yapıldı. Örnekler ölçülmeden önce BSA (Bovin serum albumin) ile yapılan standart grafik sayesinde protein miktarları hesaplandı.

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

Protokolü

% 4'lük yükleme jeli Hazırlanışı

Yükleme jeli (% 4'lük) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı;

Akrilamid solüsyonu	1,33 ml
4×Stacking jel buffer	2,5 ml
% 10 'luk SDS	0,1 ml
ddH ₂ O	6 ml
% 10'luk amonyum persülfat	50µl

TEMED 5 µl

% 10'luk Ayırma Jeli

Ayırma jeli (% 10'luk) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı;

Akrilamid solüsyonu 5 ml

4×Resolving jel buffer 3,8 ml

% 10 'luk SDS 0,15 ml

ddH₂O 6 ml

Amonyum persülfat 75 µl

TEMED 5 µl

Çok iyi temizlenmiş lekelerinden arındırılmış iki cam arka arkaya konularak birleştirildi ve düzeneğe yerleştirildi. Alttan sızıntı olmaması için distile su ile kontrol edildi. Hazırlanan ayırma jeline en son TEMED (Bio-Rad) eklenerek camların arasına hızlı ve dikkatli bir şekilde döküldü. Jelin düzgün ve hava kabarcığı oluşmasını engellemek için bütanol yavaşça eklendi. 5-10 dk içerisinde donan jelin üzerine yükleme jeli ilave edildi. Döküler dökülmez taraklar yerleştirilerek kuyuların oluşması sağlandı. Geriye kalan yürütme tamponu dış havuza dolduruldu. Mikropipet yardımıyla kuyular iyice temizlendi. 5µl sample buffer kuyucuğa yüklenerek jelin homojenliği ve yürütmeye uygunluğu test edildi ve jel tabanına gelince yürütme durdurularak örneklerin yüklenmesi gerçekleştirildi. Her kuyucuğa 20 µl konularak 40 amperde 60 dk yürütüldü. Yürütme süresi bittikten sonra jel kalıpları vidalar gevşetilerek yerlerinden çıkartıldı. Jelin üst kenarındaki kuyucuklar ve eğer alt kenarında kalıp dışına taşan çıkıntılar varsa düzgün bir şekilde bistüri ile kesildikten sonra jel parçalanmamasına özen gösterilerek alındı.

3.5.3. Blotlama Basamağı

SDS (Sigma) jeli üzerinde molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler bu basamakta membrana transfer edilmek üzere alındı. Bu işlem Porablot PVDF

(Polyvinylidene difluoride membrane) (Macherey-Nagel) kullanılarak gerçekleştirildi. Kurutma kağıdı üzerindeki membran üzerine jel dikkatli bir şekilde konuldu. Üzerine kurutma kağıdı yerleştirildi. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Western blot için blotlamada TransBlot Turbo (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. 1,5 amperde 25 voltta 10 dk negatif yüklü proteinlerin katottan (-) anoda (+) geçişi sağlandı.

3.5.4. Bloklama Basamağı

Bu basamak blotlama sonrası protein bağlanmayan bölgelerin ilgisiz proteinlerle bağlanmasıyla gerçekleştirildi. Membran %3'lük BSA+%0,1'lik TBST'de ((3g BSA+100 ml), (1000 ml TBS+1 ml Tween 20)) 1saat oda sıcaklığında bekletildi.

3.5.5. Birinci Antikor ile Muamele

Membran üretici firmanın tavsiye ettiği oranda (1:250) Drp1 (sc-32898 Lot # G 1912) ve Mfn2 (sc-100560 Lot A 0713) için %3'lük BSA içerisine birincil antikorlar konularak +4 C⁰'de bir gece bekletildi. Membran beşer dakika beş kez TBST (1000 ml TBS+1 ml Tween 20) ile yıkandı.

3.5.6. İkinci Antikor İle Muamele

HRP konjuge edilmiş ikinci antikorlar Drp1 (sc-2004 Lot # J2414) ve Mfn2 (sc-2005 Lot # A1515) için ayrı ayrı tavsiye edilen oranlarda hazırlanarak membran oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Membran beşer dakika beş kez TBST (1000 ml TBS+1 ml Tween 20) ile yıkandı.

3.5.7. Görüntüleme Basamağı

1 ml perox ve 1 ml enhanser (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Thermo Scientific) karıştırıldı ve membran üzerine konularak 5 dk beklenildi. PVDF membran inkübasyon sonrası ChemiDoc MP (Bio-Rad) ile kemilüminesans modda otomatik olarak görüntülenmesi yapıldı.

Elde edilen blot görüntüleri ImageLab Ver.5.0 (Bio-Rad) dansitometrik analiz programı ile değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Veriler Windows SPSS 20 paket programı kullanılarak analiz edildi. Fertilizasyon oranı tüm döllenmiş oosit yüzdesi olarak hesaplanmıştır. İyi kaliteli embriyo oranı grade 1 ve 2 embriyoların tüm embriyolara bölümünün yüzdesi olarak hesaplanırken transplante embriyo oranı ise grade 1, 2, 3 embriyoların tüm embriyolara bölümünün yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

Pearson korelasyon katsayısı IVF sonucu (fertilizasyon oranı, transplante ve iyiembriyo kalitesi oranı) ile protein miktar parametreleri arasındaki ilişkiyi analiz etmek için kullanıldı. Point biserial korelasyon katsayısı klinik gebelik oranı ile protein parametreleri arasındaki ilişkiyi analiz etmek için kullanıldı. P değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Doğrusal regresyon analizi (stepwise modeli) sperm protein miktar (göreceli yoğunluk) parametreleri ve IVF sonucu (fertilizasyon oranı, transplante ve iyi embriyo kalitesi oranı) arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için kullanılmıştır. Klinik gebe ve gebe olmayanlar ile protein miktarlarının karşılaştırılması bağımsız grup T testiyle yapılmıştır. Lojistik regresyon analizi protein miktarı ile klinik gebe ve gebe olmayan arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular

Bu çalışmaya Atatürk Üniversitesi Tüp Bebek Merkezine infertilite şikayetiyle müracaat eden 40 çift dahil edildi ve bu hasta çiftlerin demografik verileri Tablo 4.1.'de gösterildi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak rapor edildi.

Tablo 4.1. IVF tedavisine giren 40 çiftin demografik verileri. Değerler, ortalama \pm standart sapmadır.

PARAMETRELER	
Kadın Verileri	
Kadın yaşı (yıl)	31,4 \pm 5,2
Alınan oosit (n)	7,2 \pm 4,1
M2 Oosit (n)	6,05 \pm 3,56
Döllenen Oosit (2PN) (n)	4,9 \pm 3
Erkek Verileri	
Erkek yaşı (yıl)	34,8 \pm 5,3
Semen Hacim (ml)	3 \pm 1,3
Sperm Konsantrasyon (10 ⁶ /ml)	76,9 \pm 42
ProgresifMotilite (%)	63,2 \pm 11,4
Fertilizasyon ve Laboratuvar Parametreleri	
Fertilizasyon Oranı (%)	68,9 \pm 22,1
Transplante Edilebilir Embriyo Oranı (%)	81,2 \pm 28,0
İyi Embriyo Oranı (%)	48,9 \pm 34,7

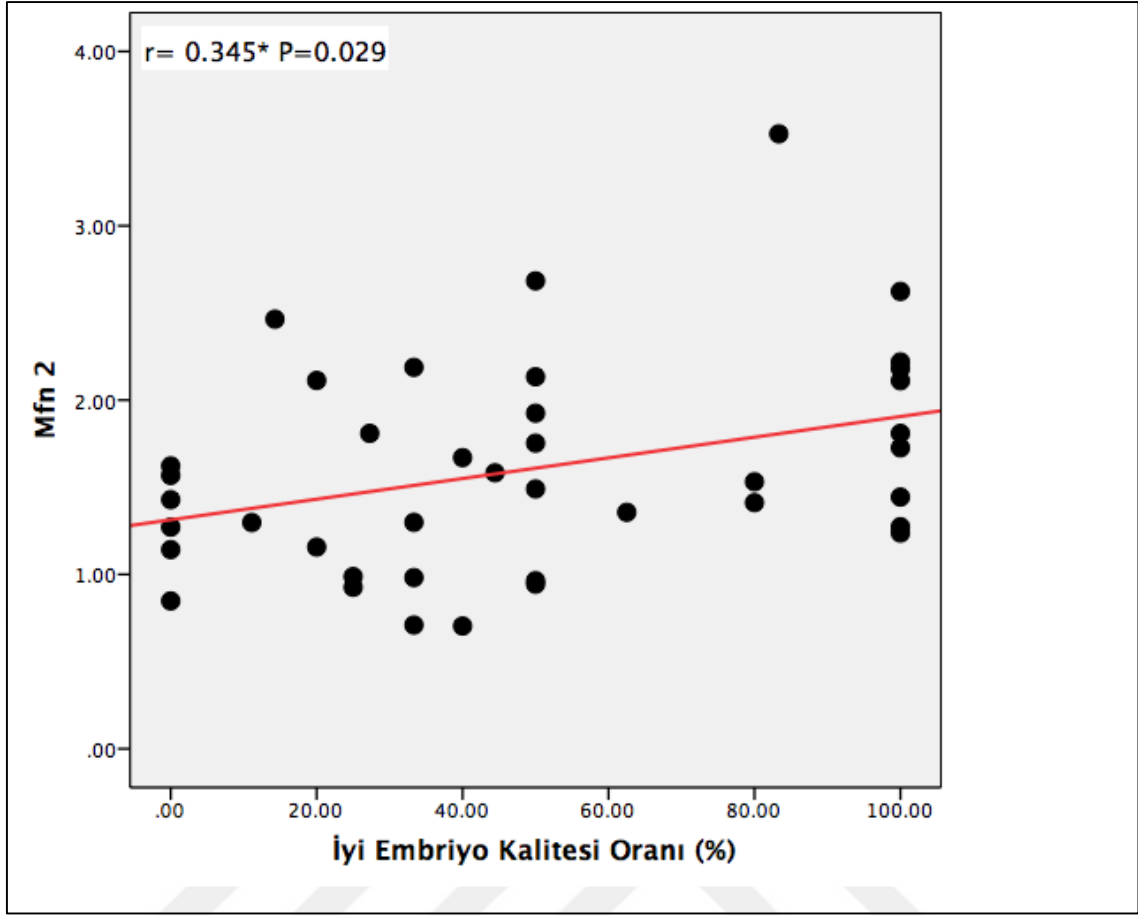
4.2. DRP1 ve MFN2'nin Göreceli Yoğunlukları ile IVF Parametreleri Arasındaki Korelasyon Analiz Bulguları

Erkek hastalara ait Drp1 ve Mfn2 protein seviyeleri ile IVF parametreleri arasındaki korelasyon katsayıları ve P değerleri Tablo 4.2'de gösterildi. Yapılan istatistiksel analiz bulguları doğrultusunda; Fertilizasyon tedavisi gören erkek hastaların sperm Drp 1 proteininin seviyeleri (göreceli yoğunluk değeri) ile klinik gebelik oranı,

transplante edilebilir embriyo oranı, fertilizasyon oranı ve iyi embriyo kalitesi oranı parametreleri arasında korelasyon saptanmadı ($p>0.05$). Mfn2 proteinin miktarı ile iyi embriyo kalitesi parametreleri arasında pozitif korelasyon saptanırken ($r_p = 0,345^*$, $p = 0.029$), Mfn2 verileriyle fertilizasyon oranı, transplante edilebilir embriyo oranı ve klinik gebelik oranı parametreleri arasında korelasyon gözlenmedi ($p>0.05$).

Tablo 4.2. Sperm Drp1 ve Mfn2 göreceli yoğunluk parametrelerinin çeşitli veriler ile korelasyon analiz sonuçları.

Bağımsız Değişken	Fertilizasyon Oranı	Transplante Edilebilir Embriyo Oranı	İyi Embriyo Kalitesi Oranı	Klinik Gebelik Oranı
DRP1	$r_p = 0,207$	$r_p = 0,112$	$r_p = 0.129$	$r_{pb} = -0.136$
	$p = 0,200$	$p = 0.493$	$p = 0,426$	$p = 0.433$
MFN2	$r_p = -0,058$	$r_p = 0,105$	$r_p = 0,345^*$	$r_{pb} = -0,170$
	$p = 0,722$	$p = 0,518$	$p = 0.029$	$p = 0,293$



Şekil 4.1. İyi Embriyo Kalitesi Oranı ve Mfn2 Değeri arasındaki korelasyon.

4.3. DRP1 ve MFN2'nin Göreceli Yoğunlukları ile IVF Parametreleri Arasındaki Regresyon Analiz Bulguları

Erkek hastalardan alınan sperm numunesine ait Mfn2 ve Drp1 protein miktarlarının göreceli yoğunluk verileri ile transplante edilebilir embriyo oranı, fertilizasyon oranı ve iyi embriyo kalitesi oranı arasındaki ilişkiyi test etmek için çoklu regresyon analizi stepwise modeli kullanıldı (Tablo 4.3).

İstatiksel çalışma bulguları kapsamında sperm Mfn2 proteininin verileri ile sadece iyi embriyo kalitesi değerleri arasında pozitif korelasyon gözlenmiş (regresyon katsayısı: 20.258, $p=0,029$; Tablo 4.3) diğer verilerle anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p>0.05$). Bu ilişki için doğrusal regresyon formülü: Fertilizasyon Oranı = $16.434+20.258*Mfn2$ şeklinde olup, düzeltilmiş r kare değerinden elde edilen tahmin gücü %9.7'tür. Bu model

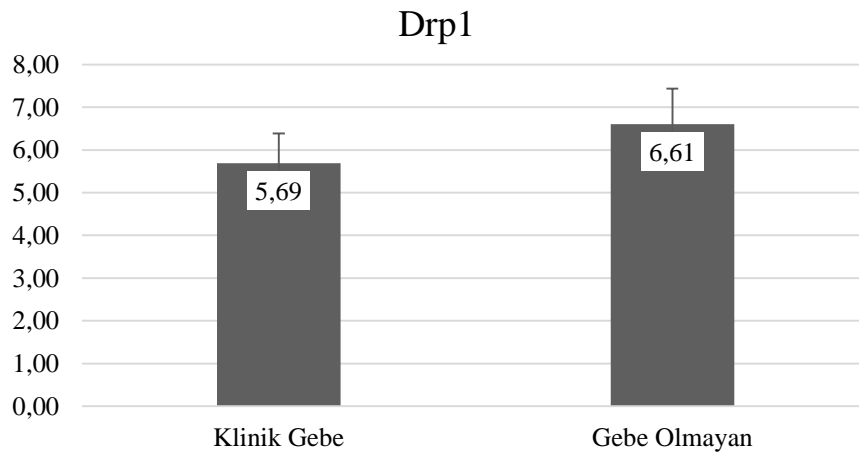
ile proteinlerimizin göreceli yoğunluk değerleri ile klinik gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı gösterildi ($p>0.05$). (Odds oranı = 1.5 [% 95 CI: 0.92-1.957]; $P = 0.408$).

Tablo 4.3. Mfn2 ve Drp1 göreceli yoğunluk parametreleri ile iyi embriyo kalitesi oranı regresyon ilişkisinin anlamlı olduğu model değerleri.

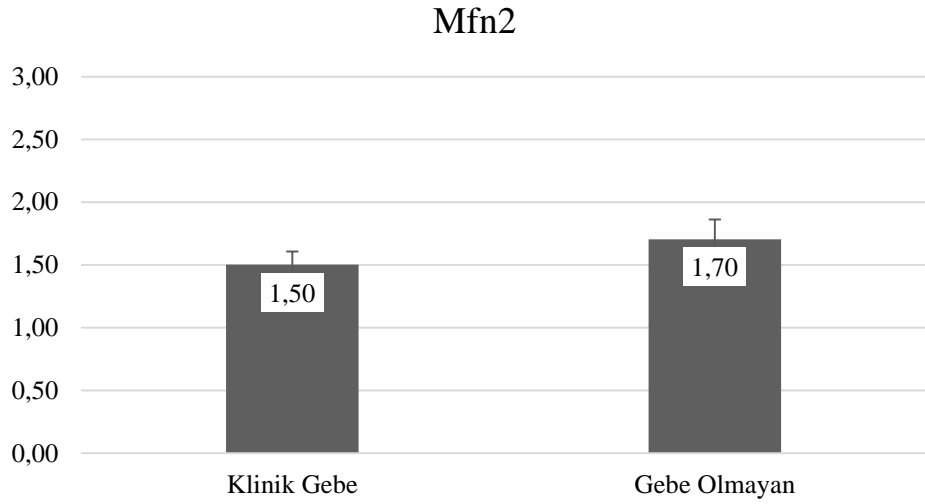
Bağımsız Değişken	Regresyon Katsayısı	Regresyon Katsayısının 95% Güven Aralığı		t Değeri	P Değeri
		Alt Sınır	Üst Sınır		
		Sabit	16.434		
Mfn 2	20.258	2.245	38.271	2.277	0.031

4.4. Klinik Gebe ve Gebe Olmayan Gruplarındaki Sperm DRP1 ve MFN2 Protein Miktarları

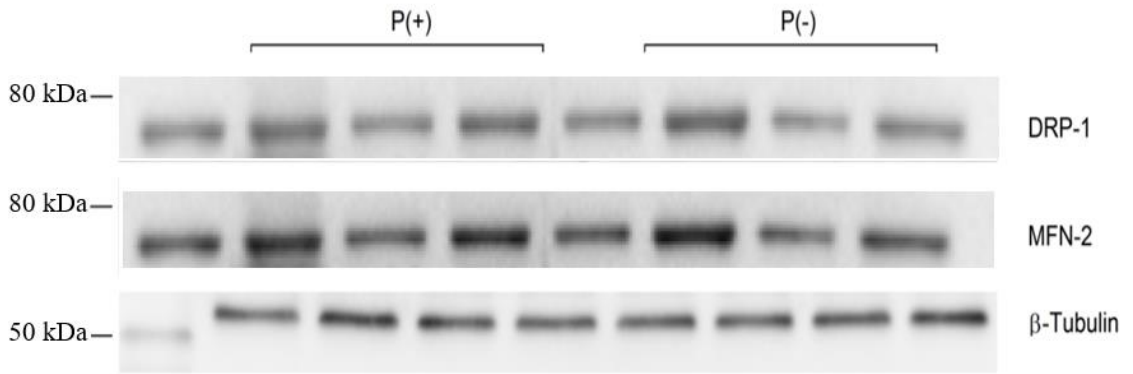
Elde edilen bulguların incelenmesi dahilinde klinik gebe ve gebe olmayan gruplarında sperm Drp1 ve Mfn2 protein seviyeleri (şekil 1, 2, 3) açısından istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.2. Klinik gebe ve gebe olmayan gruplar arasında sperm Drp1 protein miktarı (ortalama ± SEM)



Şekil 4.3. Klinik gebe ve gebe olmayan gruplar arasında sperm Mfn2 protein miktarı(ortalama±SEM)



Şekil 4.4. Western blot analiz sonucu görüntüsü (P(+):gebe, P(-):gebe olmayan)

5. TARTIŞMA

İnfertilite, üreme yaş grubundaki (18-45 yaş) çiftlerin %10-15'ini etkilemektedir. Sağlıklı bir çiftin bir ay sonunda gebe kalma olasılığı %20-25, altı ay içinde %75 ve bir yıl içinde % 90 olarak belirtilmiştir. Dünyada her on çiftten biri infertilite ile ilgili sorun yaşamaktadır. Ülkemizde evli çiftlerin %10-20'si infertiliteden etkilenmektedir ve çiftlerin yaklaşık %25'i bir yıl içinde gebe kalamamaktadır.¹⁰⁸ Yapılan araştırmalarda, infertilitenin eşlerin evlilik ilişkilerini, duygusal durumlarını ve sosyal ve cinsel yaşamlarını etkilediği belirtilmiştir.¹⁰⁹ Erkek infertilitesi kadın infertilitesi kadar yaygındır vakaların %50'sinde erkek faktörü bulunur ve yıllar geçtikçe erkek infertilite sıklığında artış olmaktadır.¹¹⁰ İnfertilitesi olan çoğu erkek hastada oligoastenoteratozoospermi sendromu bulunur. Bu sendrom dışında erkek infertilitesi olan hastaların %40-75'inde gösterilebilir bir neden bulunamamıştır ve bu hastalar normal semen parametrelerine sahip idiyopatik infertilitesi olan hastalardır.¹¹¹

Fertilite karmaşık biyolojik reaksiyonlara bağlıdır. Bu reaksiyonlardaki proteinlerin erkek ve dişi fertilitesindeki kesin rolü belirsizdir. Erkek infertilitesinin önde gelen nedenleri hala tam olarak anlaşılammış ve araştırmacıları sperm ile ilişkili proteinleri anlamaya itmıştır.¹¹² Fertil ve infertil sperm numunelerindeki proteinler incelendiğinde ekspresyonlarında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Sperm proteinleri, sperm morfolojisini, hareketliliğini, akrozom oluşumu, reaksiyonu, kapasitasyonun korunması ve dölleme anahtar rol oynamaktadırlar. Spermin verimliliğini etkileyecek, fizyolojik rolünü ortaya çıkaracak ve ayrıca infertilite için yeni tanı yöntemleri oluşturacak sperm proteinlerini tanımlamak için daha fazla çaba harcanılması gerekmektedir. Western blot hücre ve dokulardaki spesifik proteinleri analiz etmemizi sağlayan tekniktir. Bu teknik sayesinde proteinlerin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu ve gruplar arasındaki konsantrasyon değişimleri ölçülebilmektedir.¹¹³

Mitokondriyal füzyon ve fizyon, hücre fonksiyonu ve hücrenin hayatta kalmasını sağlayan, mitokondriyal içerik ve bilgi alışverişinde yer alan, hasarlı mitokondiye ortadan kaldıran temel biyolojik süreçlerdir. Mitokondriyal fizyon, hücre sitoplazmasında mitokondrielerin hasarlı bölümlerini ayırmaya yardımcı olarak mitofajiyi kolaylaştırır ve ayrıca hücre bölünmesi sırasında yeni hücrelere eşit olarak ayrılması için mitokondriyal dağılımını kolaylaştırır.¹¹⁴ Mitofaji sürecinde, Drp1 aracılığıyla ayrılan hasarlı mitokondride mitokondriyal DNA mutasyonları, aşırı ROS üretimi ve hatalı katlanmış protein birikimi membran potansiyelindeki azalmaya, bu azalmada dış mitokondriyal membran üzerinde Pink1'in birikmesine ve aktivasyonuna yol açar. Aktif Pink1, Parkin'i sitozolden mitokondri membranına lokalize olmasına ve Parkin aktivitesinin oluşmasını sağlar.¹¹⁵ Ayrıca Pink1 Mfn2'nin fosforilize olmasını sağlayarak hasar görmüş mitokondrinin diğer mitokondrieler ile füzyonunu engeller. Aktive olan Parkin Mfn1 ve 2 dahil olmak üzere dış membran proteinlerini ubiquitinle işaretlenmesini sağlar. Ubiquitinle işaretlenen mitokondri degradasyon yoluyla mitofajiye uğrar.¹¹⁶ Füzyon, mitokondrinin protein içeriğini tamamlamasını ve mtDNA onarımı için içeriklerini birleştirmesini sağlayarak bu işlevi yerine getirir.

Mitokondriyal füzyon ve fizyonun rolleri hücre fonksiyon için gerekli olduğundan, dengeli füzyon / fizyon hızı kaybı gibi anormallikler hücre fonksiyon kaybına ve ileriki süreçte apoptotik ölüme neden olabilir.¹¹⁴ Dış mitokondriyal membran füzyonuna Mfn 1 ve Mfn2 aracılık ederken, mitokondriyal fizyon dinamin ilişkili protein (DRP1) tarafından kontrol edilir.¹¹⁷ Drp'deki mutasyon anormal beyin gelişimi, optik atrofi, laktik asidemi ve neonatal ölümcül bir sendrom olan mikrosefaliye sebep olmuştur. Bu hastalarda mitokondrinin anormal uzaması gösterilmiş ,Drp'in arttığı bu sebeple fizyonunda arttığı ve füzyonun azaldığı görülmüştür.⁸² Wakabayashi ve ark. farede yaptıkları çalışmada Drp1'in knockout edilmesi sonucunda embriyoların ölümüyle

sonuçlanmıştır. Normal ATP seviyeleri ölçülmüş, fibroblast peroksizomlarında uzama kaydedilmiş, purkinje hücrelerinin az miktarda dev mitokondri içerdiği ve serebellumunda gelişimsel bozukluk izlenmiştir.¹¹⁸ Mitokondriyal dinamikler, çok sayıda korunmuş büyük guanotin trifosfat (GTPaz) ile düzenlenir. Mitofusinlerin ilk önce *Drosophila* ve mayada mitokondri füzyon için gerekli olduğu tanımlanmıştır. Memelilerde, fare nakavt modelleri füzyondaki önemini göstermektedir. Mfn1 veya Mfn2'de eksik olan fare embriyonik fibroblastları (MEF'ler), vahşi tip (WT) hücrelerde gözlenen tübüler ve birbirine bağlı mitokondriyal ağa kıyasla yüksek oranda parçalanmış mitokondri ortaya koyar. Drp1 fonksiyonunun inhibisyonu, hatalı mitokondri fisyonu ve aşırı kaynaşmış mitokondriyal ağın oluşumu ile sonuçlanır.¹¹⁹ Veriler Mfn2'nin azaldığında apoptozu teşvik ettiği, mitokondriyal metabolizmanın gelişmesini engellediğini, hücrel aktivite ve mitokondri membran potansiyelini bozduğunu, embriyolojik gelişimde bozukluğa yol açtığını göstermiştir.¹²⁰.

Canlı hücre görüntüleme alanındaki gelişmeler, mitokondri ve mitokondri ağının dinamik davranışını ortaya koydu. Homeostazı korumak için bu organeller sürekli bölünen ve kaynayan uzun tübüller oluşturur. Bu morfoloji, zıt iki işlem arasındaki dengenin sonucudur: füzyon ve fisyon. Bu denge bozulduğunda, mitokondri karakteristik biçimlerini kaybeder. Dolayısıyla, eğer mitokondri füzyonu azalır, mitokondri dengesiz fisyon nedeniyle parçalanır. Tersine, eğer mitokondri fisyonu azalır, mitokondri uzamış ve dengesiz füzyon nedeniyle aşırı derecede bağlantılı hale gelir.¹¹⁹ Conca Dioguardi ve ark. farede yaptıkları çalışmada Drp1 ve Opa1 genlerinin knockdown edilmesi mitokondri kristallerinde bal peteğine benzeyen bir görüntü oluşturduğunu gözlemlemeleri Drp1 in mitokondri morfolojisindeki önemini göstermektedir.¹²¹ Hücrelerin bölünmesinde, mitokondri muhtemelen bölünme için enerji sağlamak üzere G1-S aşamaları boyunca

kaynaşma eğilimindedir ve yeni hücrelere dağılmasını sağlamak için muhtemelen mitoz öncesi bölünme yapar.¹²²

Bir fosfolipaz D protein süper ailesi üyesi olan mitoPLD mitofusin, spermatogenez sırasında nuage oluşumu ve piRNA biyosentezine katılır. Farelerde mitoPLD, mitokondrinin yanlış konumlanmasına ve erkek kısırlığına neden olur. MitoPLD'nin aşırı ekspresyonu mitokondrinin toplanmasına neden olur ve mitokondriyal parçalanma ile sonuçlanan fizyonu azaltır.¹²³ MitoPLD ile ilişkili piRNA ların ise füzyon fizyon homeostazının mitokondriyal düzenleyicisi olduğu nuage oluşumu ve mayotik ilerlemede gerekli olduğu belirtilmiştir. Birçok hayvan türünün özellikle erkek germ hücrelerinde ifade edilen piRNA 'lar protein kodlayan genlerin post transkripsiyonel düzenlenmesinde rol alırlar.¹²⁴ Long Cui ve ark. yaptıkları çalışmada piRNA ların düşük sperm sayısı ve bozulmuş spermatogenez ile ilişkili olduğu ve infertil erkeklerde daha düşük seviyede eksprese olduğu bildirilmiştir.¹²⁵ Yapılan bu çalışma mitokondriyal dinamiklerin piRNA ve sayısız proteinlerle ilişkili karmaşık bir yapı olduğunu ve ayrıca mitokondriyal dinamiklerin fertilizasyon ve spermatogenezde rol aldığına dair önemli bir göstergedir.

Yaptığımız çalışmada Western blot analizi çerçevesinde Drp1 ile fertilizasyon oranı, transplante edilebilir embriyo oranı, iyi embriyo kalitesi oranı ve klinik gebelik oranı arasında korelasyon gözlenmemiştir. Mfn2 proteini ile fertilizasyon oranı, transplante edilebilir embriyo oranı, klinik gebelik oranı arasında korelasyon gözlenmezken iyi embriyo kalitesi oranında pozitif korelasyon gözlenmiştir (rp=0.345,p=0.029). Spermde Mfn2 protein miktarı ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan doğrusal regresyon formülü tahmin gücünü % 9.7 olup regresyon katsayısı 20.258'dir.

Mitokondriyal dinamiklerin sperm kalitesi üzerine literatürde çok az bilgi bulunmasına rağmen mitokondri ve sperm kalitesi ilişkisi üzerine birçok çalışma vardır.

Sperm mitokondri yapısındaki bozukluklar sperm motilitesinde azalmaya sebep olduğuna dair çalışmalar 1995'te Mundy ve ark. ve 2011'de Pelliccione ve ark. tarafından tespit edilmiştir. Jodar ve ark nın asthenozoospermik örneklerde yaptıkları mtRNA ve mitokondriyal protein çalışmaları mitokondri ile sperm fonksiyonunu ve erkek infertilitesini ilişkilendirmiştir. 2006'da Cordoba ve ark. 2011'de ise Ramio-Lluch ve ark. nın yaban domuz spermi üzerine yaptıkları çalışmalarda mitokondriyal işlevselliğin sperm kapasitasyonu için gerekli olduğu ve kapasitasyon sırasında oksijen tüketiminin yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir.¹⁰ Drp1 Drosophila'da çalışılmış olmasına rağmen insan ve memeli spermelerinde çalışılmamıştır. Aldridge ve ark. Drosophila Melanogaster (meyve sineği)'de yaptıkları çalışmada Drp1 yokluğunda füzyonun baskın olduğu, Drp1'in spermatogenezde mitokondriyal morfoloji için gerekli olduğu ve Drp1 aracılı mitokondriyal fizyon başarısızlığında mutant primer sperm ve birbirine bağlı mitokondriyal yığın oluştuğu gözlemişlerdir.¹²⁶ Çalışmamızda insan sperminde Drp1'in miktarları ölçülen literatürde ki ilk çalışmadır. Meyve sineğinde DRP1 yokluğunun sperm mitokondri sağlığı üzerine olumsuz etkili olduğu tespit edilmesine rağmen, çalışmamızda DRP 1 seviyelerinin IVF çıktılarını üzerine etkisinin olmadığını tespit ettik ve dolayısıyla erkek infertilitesinde insan sperm kalitesi üzerine etkisinin olmadığını düşünmekteyiz.

Mevcut çalışmada spermde Mfn2'nin artması embriyo kalitesini iyileştirmiştir. Literatürdeki çalışmalarda mevcut çalışmayı destekler niteliktedir. Zhang ve ark. farelerde in vivo ve in vitro modeller içeren çalışmasında diğer bir füzyon proteini olan Mfn1 mutasyonları spermatogenez sırasında germ hücre olgunlaşmasının bozulmasına yol açabildiği ve mitokondriyal morfolojide ciddi kusurlara neden olduğunu göstermişlerdir.¹²³ Hwa ve ark. Mfn2 nin Drosophila da homologu olan Fzo geninde yaptıkları çalışmada Fzo geninin spermatogenez sırasında eksprese edildiği ve aynı zamanda embriyogenez sırasında geniş ölçüde eksprese edildiği farklı mekanizmaların

kontrolü altında oldukları bildirilmiştir.¹²⁷ Ramio- Luch ve ark. domuz sperminde yaptıkları çalışmalar sonucu kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda Mfn2 nin rol oynadığını, mitokondri ve mitokondri sayısındaki değişiklikler gibi karmaşık süreçlerin tespit edilmesinin yardımcı üreme tekniklerinde özel bir öneme sahip olabileceğini ifade etmiştir.¹²⁸ En son 2018'de insan sperminde yapılan bir çalışmada ise Fang ve ark normozoospermi ve astenozoospermi grupları arasında Mfn2 ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış ve normozoospermili hastalarda Mfn2 seviyesi yüksek çıkmıştır. Sonuçlar, mitofusin 2'nin ekspresyon seviyesinin, insan sperminin motilitesi ve kriyoprotektif potansiyelleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir.⁹ Çalışmamızda Mfn2 protein seviyelerinin fertilizasyon oranını etkilememesi fertilizasyon oranlarının embriyo kalitesiyle ilişkisinin olmadığını göstermektedir. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, Yoeli ve ark. 177 hasta üzerinde yaptıkları araştırmada intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ile elde edilen artan fertilizasyon oranlarının embriyo kalitesini etkilemediğini tespit etmişlerdir.¹²⁹ Özellikle sperm Mfn2 değerlerinin embriyo kalitesini güçlü bir şekilde etkilemesine rağmen, bu değerın gebeliğin oluşmasını etkilememesi, gebelikte maternal endometriumda gebeliği engelleyici moleküler patolojik mekanizmalar ve maternal hormon seviyeleri gibi birçok faktörün devreye girmesi ile açıklanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İn vitro fertilizasyon başarısına sperm Drp1 ve Mfn2 protein miktarlarının etkisinin araştırdığımız bu çalışma literatürde ilk olması açısından değerlidir. Çalışmamız IVF çıktıları olan fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi ve gebelik oranları üzerine spermdeki bu proteinlerin varlığının ve fonksiyonunun anlaşılmasına katkı sağlamıştır.

Sonuç olarak sperm Mfn2 değerlerindeki artışın IVF tedavisi alan çiftlerde embriyo kalitesini önemli bir şekilde etkilediği ve dolaylı olarak gebeliği olumlu yönde etkileyebileceği bulundu. Yeni yapılacak çalışmalarla sperm kalitesi üzerine Mfn2 ve mitokondriyal füzyonun moleküler ilişkilerinin aydınlatılarak infertilite tedavisine yeni yaklaşımlar getirilebilir. Mitokondriyal dinamikteki diğer proteinlerinde Mfn2 ve Drp1 proteinleri ile beraber çalışılması etkilerinin anlaşılmasında ve karmaşık bir süreç ve yapı olan mitokondriyal dinamiklerin çözümlenmesinde bizlere yardımcı olacaktır.

KAYNAKÇA

1. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem* 2, 2011, 11-7.
2. Kirca N, Pasinlioglu T. İnfertilite Tedavisinde Karşılaşılan Psikososyal Sorunlar / Psychosocial Problems during Infertility Treatment. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 2013, 5.2: 162.
3. Halder A, Kumar P, Jain M, Kalsi AK. Genomics: Tool to predict and prevent male infertility. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2017, 9: 448-508.
4. Puerta Suarez J, du Plessis SS, Cardona Maya WD. Spermatozoa: A Historical Perspective. *Int J Fertil Steril*, 2018, 12: 182-190.
5. Mehrparavar B, Minai-Tehrani A, Arjmand B, Gilany K. Metabolomics of Male Infertility: A New Tool for Diagnostic Tests. *J Reprod Infertil*, 2019, 20: 64-69.
6. Pierik FH, Van \pm 34,7 Ginneken AM, Dohle GR, Vreeburg JT, Weber RF. The advantages of standardized evaluation of male infertility. *Int J Androl*, 2000, 23: 340-346.
7. Moraes CR, Meyers S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Anim Reprod Sci*, 2018, 194: 71-80.
8. Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod*, 2000, 15 Suppl 2: 129-147.
9. Fang F, Ni K, Shang J, Zhang X, Xiong C, Meng T. Expression of mitofusin 2 in human sperm and its relationship to sperm motility and cryoprotective potentials. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243: 963-969.
10. Amaral A, Lourenco B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, 2013, 146: R163-174.
11. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 872-884.

12. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 2012, 337: 1062-1065.
13. Roy M, Reddy PH, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 111-118.
14. Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, Miyado K, Shitara H, Yokota S, Nomura M, Mihara K, Mizushima N, Ishihara N. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr Biol*, 2014, 24: 2451-2458.
15. Liu Q, Kang L, Wang L, Zhang L, Xiang W. Mitofusin 2 regulates the oocytes development and quality by modulating meiosis and mitochondrial function. *Sci Rep*, 2016, 6: 30561.
16. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli M. *İnsan Embriyolojisi*. 7. Baskı. İstanbul, Alfa Basım Yayım Dağıtım 1992.
17. H.M R, Kaye G, Pawlina W. *Histology a text and atlas*. 4. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2003: 784-790.
18. Moore K, Persaud TVN. *The developing human: Clinically oriented embryology* 6. Baskı. USA, W.B Saunders Company, 1988.
19. Sadler TW. Langman's Medical Embryology Çeviri: Başaklar CA. Langman's Medikal Embriyoloji, 9. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2011: 26-28.
20. Erenel H, İmamoğlu M. Cinsiyet Belirlenmesi. İçinde: *Gelişim Biyolojisi*, Erkan M, İrez T (Çeviri editörleri), Developmental Biology, Gilbert SF, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2013.
21. Dudek RW. Embryology. İrez T, Erkan M. Çeviri: *Embriyoloji*, 1 Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2016: 180-184.

22. Demir R. Erkek Üreme Sistemi. İçinde: (Çeviri editörü). *diFiore'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel ilişkileriyle*, diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlation, Eroschenko VP. 10. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2013: 477-503.
23. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59: 10-26.
24. Gartner PL, Hiatt JL. Cell biology and Histology Çeviri: Hürdağ C. *Hücre Biyolojisi ve Histolojisi* 7. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2016.
25. Eşrefoğlu M. *Embriyoloji*. 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri, 2017: 38-49.
26. Junqueira LC, Carnerio J, Kelly RO. Basic Histology. Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B *Temel Histoloji*, 8 Baskı. İstanbul, Barış Kitabevi 1998.
27. Kierszenbaum AL. *Histology and cell biology*. 2. Baskı. 2002: 309-311.
28. Elder K, Brian D. İn Vitro Fertilization. Çeviri: İrez T. *İN Vitro Fertilizasyon* 3. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2014.
29. Çelik Ö. *Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar*. 1. Baskı. Adana, Nobel Kitabevi, 2011.
30. Castillo J, Amaral A, Oliva R. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. *Andrology*, 2014, 2: 326-338.
31. Burl RB, Clough S, Sendler E, Estill M, Krawetz SA. Sperm RNA elements as markers of health. *Syst Biol Reprod Med*, 2018, 64: 25-38.
32. Ren XX, Chen XL, Wang ZL, Wang D. Is transcription in sperm stationary or dynamic? *Journal of Reproduction and Development*, 2017, 63: 439-443.
33. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm

by human spermatozoa: Correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology*, 1996, 17: 276-287.

34. Gedikli S, Özbek E, Demirci T. Fertilizasyonun moleküler temeli. *Van Tıp Dergisi* 2013, 20: 294-301.

35. Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol*, 2004, 67: 271-284.

36. Adamson D, Baker V. Multiple births from assisted reproductive technologies: a challenge that must be met. *Fertility and Sterility*, 2004, 81: 517-522.

37. Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod*, 2017, 96: 2-12.

38. Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*, 1975, 44: 394-436.

39. Kierszenbaum AL. Sperm axoneme: a tale of tubulin posttranslation diversity. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62: 1-3.

40. Nicastro D, Schwartz C, Pierson J, Gaudette R, Porter ME, McIntosh JR. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 2006, 313: 944-948.

41. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol*, 2009, 187: 921-933.

42. Linck RW, Chemes H, Albertini DF. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33: 141-156.

43. Hetherington L, Schneider EK, Scott C, DeKretser D, Muller CH, Hondermarck H, Velkov T, Baker MA. Deficiency in Outer Dense Fiber 1 Is a Marker and Potential Driver of Idiopathic Male Infertility. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15: 3685-3693.

44. Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biol Reprod*, 2003, 68: 2241-2248.
45. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*, 2003, 61: 103-115.
46. Kuo YC, Shen YR, Chen HI, Lin YH, Wang YY, Chen YR, Wang CY, Kuo PL. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. *J Cell Sci*, 2015, 128: 923-934.
47. Rajender S, Rahul P, Mahdi AA. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion*, 2010, 10: 419-428.
48. Lehti MS, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol Reprod*, 2017, 97: 522-536.
49. Alkan E, Başar MM. Sperm motilite bozuklukları: Terminoloji, etiyoloji ve tedavide yenilikler. *Erkek Üreme Sağlığı*.
50. Grudzinskas JG, Grudzinskas J, Yovich J. *Gametes-the spermatozoon*. Baskı. Cambridge University Press, 1995.
51. Scheffler IJ, New York. *Mitochondria* Wiley-Liss. 1999.
52. Roger AJ, Munoz-Gomez SA, Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol*, 2017, 27: R1177-R1192.
53. Vaught RC, Dowling DK. Maternal inheritance of mitochondria: implications for male fertility? *Reproduction*, 2018, 155: R159-R168.
54. Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl*, 2012, 35: 109-124.

55. Ruiz P, Eduardo D.S, Carmen L.P, Manuel J, Enriquez JA. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Current Topics in Developmental Biology* 2007, 77: 3-19.
56. Williams AC, Ford WC. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 2001, 22: 680-695.
57. Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*, 2011, 193: 809-818.
58. Nussbaum R, McInnes R, Willard H, Boerkoel III CJIGK. Thompson & Thompson Tibbi Genetik. 6. baskı. 2005: 277-288.
59. Wolff JN, Ladoukakis ED, Enriquez JA, Dowling DK. Mitonuclear interactions: evolutionary consequences over multiple biological scales. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369: 20130443.
60. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull*, 2013, 106: 135-159.
61. Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974, 71: 2777-2781.
62. Fukunaga M, Yielding KL. Fate during cell growth of yeast mitochondrial and nuclear DNA after photolytic attachment of the monoazide analog of ethidium. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, 90: 582-586.
63. Song GJ, Lewis V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertil Steril*, 2008, 90: 2238-2244.
64. Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee NC, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown J, Chen SM, Chien YH, Hwu WL, Fan PC, Wong LJ, Atwal PS, Huang T.

Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: 13039-13044.

65. Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod*, 2007, 22: 1585-1596.

66. DeLuca SZ, O'Farrell PH. Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Dev Cell*, 2012, 22: 660-668.

67. Luo SM, Schatten H, Sun QY. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *Journal of Genetics Genomics*, 2013, 40: 549-556.

68. Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T, Day BN, Sutovsky M. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online*, 2004, 8: 24-33.

69. Seli E. Mitochondrial DNA as a biomarker for in-vitro fertilization outcome. *Current Opinion in Obstetrics Gynecology*, 2016, 28: 158-163.

70. Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev*, 2008, 22: 1577-1590.

71. Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Zorov DB. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *The Journal of cell biology*, 1988, 107: 481-495.

72. Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, 1994, 27: 198-219.

73. Hales KG, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, 1997, 90: 121-129.
74. Silva Ramos E, Larsson NG, Mourier A. Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857: 1277-1283.
75. Sesaki H, Adachi Y, Kageyama Y, Itoh K, Iijima M. In vivo functions of Drp1: lessons learned from yeast genetics and mouse knockouts. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842: 1179-1185.
76. Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingerman E, Nunnari J, Hinshaw JE. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 20-26.
77. Michalska B, Duszyński J, Szymański JPB. Mechanizm fragmentacji mitochondriów—struktura i funkcja białka Drp1. 2016, 62: 127-137.
78. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2001, 12: 2245-2256.
79. Santel A, Frank S. Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life*, 2008, 60: 448-455.
80. Harder Z, Zunino R, McBride H. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol*, 2004, 14: 340-345.
81. Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol*, 2007, 178: 71-84.
82. Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Mitochondrial Research in Translational Medicine*, 2010, 1201: 34-39.

83. Ugarte-Uribe B, Muller HM, Otsuki M, Nickel W, Garcia-Saez AJ. Dynamin-related Protein 1 (Drp1) Promotes Structural Intermediates of Membrane Division. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289: 30645-30656.
84. Ali S, McStay GP. Regulation of Mitochondrial Dynamics by Proteolytic Processing and Protein Turnover. *Antioxidants*, 2018, 7.
85. Cho B, Choi SY, Cho HM, Kim HJ, Sun W. Physiological and pathological significance of dynamin-related protein 1 (drp1)-dependent mitochondrial fission in the nervous system. *Exp Neurol*, 2013, 22: 149-157.
86. Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, Shaw JM. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol*, 1998, 143: 359-373.
87. Harvey AJ. Mitochondria in early development: linking the microenvironment, metabolism and the epigenome. *Reproduction*, 2019, 157: R159-R179.
88. Schrepfer E, Scorrano L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell*, 2016, 61: 683-694.
89. Low HH, Lowe J. A bacterial dynamin-like protein. *Nature*, 2006, 444: 766-769.
90. Shutt T, Geoffrion M, Milne R, McBride HM. The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *Embo Reports*, 2012, 13: 909-915.
91. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27: 105-117.
92. Tagaya M, Arasaki K. Regulation of Mitochondrial Dynamics and Autophagy by the Mitochondria-Associated Membrane. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 997: 33-47.
93. Zorzano A, Liesa M, Sebastian D, Segales J, Palacin M. Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21: 566-574.

94. Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 2007, 130: 548-562.
95. Filadi R, Pendin D, Pizzo P. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 330.
96. Winters BR, Walsh TJ. The epidemiology of male infertility. *Urol Clin North Am*, 2014, 41: 195-204.
97. Barratt CL, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, Oates RD, van der Poel S, St John B, Sigman MJHru. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. 2017, 23: 660-680.
98. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C, European Association of Urology Working Group on Male I. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*, 2012, 62: 324-332.
99. Katz DJ, Teloken P, Shoshany O. Male infertility - The other side of the equation. *Australian Family Physician*, 2017, 46: 641-646.
100. Sharma RS, Saxena R, Singh R. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *Indian J Med Res*, 2018, 148: S10-S14.
101. Bongso A. *Handbook on blastocyst culture*. Baskı. Department of Obstetrics and Gynaecology, National University Hospital, 1999.
102. Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Baskı. lippincott Williams & wilkins, 2005.
103. Elder K, Dale B. *In Vitro Fertilization*. 3. Baskı. England, Cambridge University Press 2010.
104. Çetin C, Çetin MT. Dünden Bugüne Yardımla Üreme Teknikleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2014, 23: 148-155.

105. Bayer SR, Alper MM. *Boston IVF Handbook of Infertility: A Practical Guide for Practitioners Who Care for Infertile Couples*. Baskı. CRC Press, 2007.
106. Organisation WH. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. 3.rd Baskı. Cambridge university press, 1999.
107. Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol*, 2004, 4: 5-22.
108. Sezgin H, Hocaoglu Ç. Infertilitenin Psikiyatrik Yönü/Psychiatric Aspects of Infertility. *Psikiyatride Guncel Yaklasimler*, 2014, 6: 165.
109. Golombok S. Psychological functioning in infertility patients. *Hum Reprod*, 1992, 7: 208-212.
110. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online*, 2007, 14: 734-745.
111. Dohle G, Weidner W, Jungwirth A, Colpi G, Papp G, Pomerol J, Hargreave T. EAU Infertilite Kilavuzu. 1992.
112. Intasqui P, Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Bertolla RP. Towards the identification of reliable sperm biomarkers for male infertility: A sperm proteomic approach. *Andrologia*, 2018, 50.
113. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*, 2006, 38: 283-293.
114. Chen L, Winger AJ, Knowlton AA. Mitochondrial dynamic changes in health and genetic diseases. *Mol Biol Rep*, 2014, 41: 7053-7062.
115. Arano T Imai Y. Mitophagy regulated by the PINK1-Parkin pathway. *Cell Death: Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, 2015, 113.
116. Dorn GW, Kitsis RN. The mitochondrial dynamism-mitophagy-cell death interactome: multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble. *Circulation Research*, 2015, 116.1: 167-182

117. Trotta AP, Chipuk JE. Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74: 1999-2017.
118. Wakabayashi J, Zhan Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, Lijima M, Sesaki H. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *The Journal of cell biology*, 2009, 186.6: 805-816.
119. Zemirli N, Morel E, Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19.
120. Zhao N, Zhang Y, Liu Q, Xiang W. Mfn2 affects embryo development via mitochondrial dysfunction and apoptosis. *PloS one*, 2015, 10.5: e0125680.
121. Conca Dioguardi C, Uslu B, Haynes M, Kurus M, Gul M, Miao DQ, De Santis L, Ferrari M, Bellone S, Santin A, Giulivi C, Hoffman G, Usdin K, Johnson J. Granulosa cell and oocyte mitochondrial abnormalities in a mouse model of fragile X primary ovarian insufficiency. *Mol Hum Reprod*, 2016, 22: 384-396.
122. Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*, 2017, 391: 42-53.
123. Zhang J, Wang Q, Wang M, Jiang M, Wang Y, Sun Y, Wang J, Xie T, Tang C, Tang N, Song H, Cui D, Chao R, Ding S, Ni B, Chen X, Wang Y. GASZ and mitofusin-mediated mitochondrial functions are crucial for spermatogenesis. *Embo Reports*, 2016, 17: 220-234.
124. Huang H, Gao Q, Peng X, Choi SY, Sarma K, Ren H, Morris AJ, Frohman MA. piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Developmental cell*, 2011, 20.3: 376-387

125. . Cui L, Fang L, Shi B, Qui B, Ye Y. Spermatozoa expression of piR-31704, piR-39888, and piR-40349 and their correlation to sperm concentration and fertilization rate after ICSI. *Reproductive Sciences*, 2018, 25.5: 733-739.
126. Aldridge AC, Benson LP, Siegenthaler MM, Whigham BT, Stowers RS, Hales KG. Roles for Drp1, a dynamin-related protein, and milton, a kinesin-associated protein, in mitochondrial segregation, unfurling and elongation during *Drosophila* spermatogenesis. *Fly (Austin)*, 2007, 1: 38-46.
127. Hwa JJ, Hiller MA, Fuller MT, Santel A. Differential expression of the *Drosophila* mitofusin genes fuzzy onions (fzo) and dmf1. *Mech Dev*, 2002, 116: 213-216.
128. Ramió-Lluch L, Fernández-Novell J, Peña A, Bucci D, Rigau T, Rodríguez-Gil J. “In vitro” capacitation and subsequent acrosome reaction are related to changes in the expression and location of midpiece actin and mitofusin-2 in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 2012, 77: 979-988.
129. Yoeli R, Orvieto R, Ashkenazi J, Shelef M, Ben-Rafael Z, Bar-Hava I. Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2008, 25: 23-28.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Fatma Aksoy
Doğum tarihi:	7 Ağustos 1991
Doğum Yeri:	Erzurum
Medeni Hali:	Bekâr
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, 25240 / ERZURUM
Tel:	0534 252 61 00
Faks:	-
E-mail:	fatmaksoy@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta Derece
İlgi Alanları ve Hobiler	
Ney, Bitkiler, Masa Tenisi Doğa ve kültürel geziler	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ


ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi Osman Nuri Keleş danışmanlığında sunulan "Sperm Drp1 ve Mfn2 Protein Miktarlarının İn Vitro Fertilizasyon Başarısındaki Rolü" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığı, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	2	15
Genel Bilgiler	5	30
Materyal ve Metod	22	35
Bulgular	4	10
Tartışma	13	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 18/06/2019

Öğrenci Adı-Soyadı
İmza

Fatma AKSOY



Danışman Adı-Soyadı
İmza

Osman Nuri KELEŞ

**EK-3. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL ONAY FORMU**



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/176
Konu : Etik Kurul Kararı

16.10.2015

Sayın: Yrd.Doç.Dr.Osman Nuri KELEŞ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz
"Sperm Drp 1 ve Mfn 2 protein miktarlarının in vitro fertilizasyon başarısındaki rolü"
isimli bilimsel tez çalışmaya ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Hülya AKSOY
Etik Kurul Başkanı

Eki :
1 Adet Etik Kurul Kararı



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Osman Nuri KELEŞ	
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI	Sperm Drp 1 ve Mfn 2 protein miktarlarının in vitro fertilizasyon başarısındaki rolü	
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 7 Karar No: 06	Tarih: 16.10.2015
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin Kendisi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Hülya AKSOY
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Mustafa GÜL
Üye

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Doç.Dr. Zeynep ÇAKIR
Üye

Doç.Dr.Atilla ÇAYIR
Üye

Yrd.Doç.Dr.M.Erdem SAĞSÖZ
Üye

Uz.Dr.Sevilay AKALP ÖZMEN
Üye

Op.Dr.Binali FIRINCI
Üye

Arş.Gör.Kamil DURMUŞ
(Hukukçu) Üye

Gülten TEK
Üye