

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SPERMINDE KISSPEPTİN VE SPERM KATYON
KANALLARININ (CATSPER) BİRBİRLERİYLE OLAN İLİŞKİSİ**

Seda ANIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL

KONYA- 2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SPERMİNDE KISSPEPTİN VE SPERM KATYON
KANALLARININ (CATSPER) BİRBİRLERİYLE OLAN İLİŞKİSİ**

Seda ANİÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 22202018 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA- 2024

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL yönetiminde hazırlanmıştır.

Tüm eğitim sürem boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her zaman her konuda yanımda olan desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nejat ÜNLÜKAL'a sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tavsiyeleri ile her daim destek olan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ender ERDOĞAN ve Dr. Öğr. Üyesi Duygu DURSUNOĞLU'na, tezimin istatistik aşamasındaki katkı, destek ve ilgisinden dolayı değerli hocam Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Dr. Öğr. Üyesi Muslu Kazım KÖREZ'e

Çalışmama ait örnekleri toplama süresince yardımlarını, desteklerini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliğini çalışanları Rukiye ERDOĞAN ve Özlem ŞAHİN'e,

Tez çalışmamda her zaman yanımda olan desteklerini, tecrübelerini, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Merve SOLMAZ ve Dr. Seda ŞİMŞEK'e,

Desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen Araştırma Görevlileri; Dr. Ümmügülsüm ÖNAL, Dr. Özge ERYİĞİT'e, Dr. Aliye Esma ÖVET'e ve Fatma GÖKTÜRK'e, Anabilim Dalımız yüksek lisans öğrencisi Abdullah ŞENTÜRK'e ve desteklerini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Gösterdiği sabır ve sevgi, verdiği cesaret, destek ve yardımlarıyla her daim yanımda olan, varlığı ile güç bulduğum, gurur kaynağım Dr. Oktay ÖZDEMİR'e,

Hayatım boyunca her zaman destek ve sevgileri ile arkamda duran, her zaman desteklerini gösteren aileme; annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

01/2024
Seda ANIÇ

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
SUMMARY	vii
1.GİRİŞ	1
1.1. Erkek Ürogenital Sistemi Hakkında Giriş	1
1.1.1. Spermin Yapısı.....	3
1.1.2. Spermatogenez	3
1.1.3. Spermiyogenez.....	6
1.1.4. Fertilizasyon sürecinin kısa bir özeti	8
1.2. İnfertilitenin Epidemiyolojisi Tanımlar ve Dünya Geneline İnfertilitenin önemi	11
1.2.1. Erkek İnfertilitesi	12
1.3. Semen Analizi.....	13
1.3.1. Semen (Ejakülat).....	13
1.3.2. Semen Analizinde İncelenen Parametreler	14
1.3.3. Semen Analizi İçin İnceleme Yöntemleri	15
1.3.4. Makroskopik İnceleme.....	16
1.3.5. Mikroskopik İnceleme	17
1.4. Kalsiyumun Fertilizasyondaki Rolü	25
1.5. CATSPER.....	26

1.5.1. CatSper Kanallarının Yapısı ve Özellikleri	26
1.5.2. CatSper Kanalları, Fertilizasyondaki Önemi, İnfertilite ile CatSper Arasındaki ilişki	29
1.6. KISS1 ve KISS1-R	29
1.6.1. KISS1 ve KISS1R Sistemi	29
1.6.2. KISS1R Geni.....	30
1.6.3. KISS1 ve KISS1R İlişkisi	30
1.6.4. KISS1/KISS1-Reseptör Sisteminin Hücre İçi Sinyalizasyon Mekanizması	30
1.6.5. KISS1/KISS1-Reseptör Sisteminin Sperm Fonksiyonları Üzerine Etkisi	32
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
2.1. Çalışma Planı	34
2.2. Semen Örneklerinin Toplanması ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması	34
2.3. Semen Analizi.....	35
2.3.1. Makroskopik Değerlendirme	35
2.3.2. Mikroskopik Değerlendirme	35
2.4. Histolojik Analiz ve Genetik Analiz İçin Örnek Hazırlığı	36
2.5. CatSper3 ve Kiss-Peptin'in Sperm Hareketliliğine Etkisinin İmmunfluoresan Boyama Yöntemiyle Histolojik Analizi	37
2.5.1. CatSper3'ün Sperm Hareketliliğine Etkisinin Floresan Mikroskop ile Analizi	37
2.5.2. Kiss-Peptin'in Sperm Hareketliliğine Etkisinin Floresan Mikroskop ile Analizi	38
2.6. CatSper3 ve KISS1R'nin Sperm Hareketliliğine Etkisinin Genetik Analizi...	40
2.6.1. Uygulanan Genetik Analiz Protokolü	40

2.7. İstatistiksel Analiz Analizi.....	43
3.BULGULAR.....	44
3.1. CatSper3 ve KISS1/KISS1R Ekspresyon Oranlarının Gruplar Arasında Karşılaştırılması	44
4.TARTIŞMA.....	52
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
6.KAYNAKLAR	60
7.EKLER	63
EK-A: Etik Kurul Kararı.....	63
8.TURNİTİN	64
9.ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

ART: Asiste Üreme Teknolojileri (Yardımcı Üreme Teknikleri)

ATP: Adenozin tri fosfat

ATPaz: Adenozin Tri fosfat'az

Ca²⁺: Kalsiyum iyonları

cAMP: Siklik Adenosin Mono-Fosfat

cDNA: Tamamlayıcı DNA

CatSper: Spermin Katyon Kanalları

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

CNG: Siklik Nükleotid Kapılı İyon Kanalı

DAG: Diaçilgliserol

DK: Dakika

DNA: DeoksiriboNükleik Asit

DNase: Deoksiribonükleaz

ERK: Hücre dışı sinyal mekanizmalarıyla regüle edilen kinaz

FSH: Folikül-Stimulan Hormon

GnRH: Gonadotropin-releasing Hormon

GPCR: G-Protein Bağlı Reseptör

Hv1: Voltaj Kapılı H⁺ Kanalı 1

ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

KISS1: Kisspeptin Geni

KISS1R: Kisspeptin Reseptör Geni

LH: Lüteinleştirici Hormon

MAPK: Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz

mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit

miRNA: Mikro RNA

IP3: İnozitol 1,4,5 trifosfat

PBS: Fosfat Buffer Salin Solusyon

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pH: Potansiyel Hidrojen

PI: Fosfotifil inositol

PIP2: Fosfotidilinozitol 4-5-bifosfat

PKA: Protein-kinaz A

PKC: Protein-kinaz C

PKG: Protein-kinaz G

PLC: Fosfolipaz-C

PSA: Prostat Spesifik Antijeni

PTK: Protein Tirozin Kinaz

qPCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAS: G-Proteini bir proto-onkogen ve onu kodlayan gen

RAF: Hızlı ivmelenen fibrosarkom kinaz

RNA: RiboNükleik Asit

RNase: Ribonükleaz

sAC: Çözünür adenilat siklaz

sGC: Çözülebilir Guanilat Siklaz

sNHE: Na⁺ /Ca²⁺ exchanger ve sperm-spesifik Na⁺ /H⁺ exchanger

STK: Serin/Treonin Protein Kinaz

TRPC: Temel Geçici Reseptör Potansiyeli Kanonik

ZP: Zona Pellusida

ZP2: Zona Pellusida Glikoprotein 2

ZP3: Zona Pellusida Glikoprotein 3

WES: Tüm ekzom analizi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SPERMİNDE KISSPEPTİN VE SPERM KATYON KANALLARININ (CATSPER) BİRBİRLERİYLE OLAN İLİŞKİSİ

Seda ANIÇ

Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2024

KISS1R, G proteinin alt biriminden Gq/11α'yla bağlantılı G proteiniyle bağlı reseptördür. KISS1'in KISS1R'ye bağlanmasıyla Fosfatidilinositol (PI) ü uyarıp fosfolipaz C'nin aktivasyonunu sağlar. Aktivasyonu sonucu fosfatidil inositol bifosfatın üzerinden inositol-trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşumunu sağlamaktadır. IP3 Ca²⁺ salınımını sağlamaktadır. Bu döngü ile KISS1'in sperm hareketliliğinde etkisi kabul edilmekle birlikte yeterince bilinmemektedir. Benzer şekilde spermdeki kalsiyum kanallarından CatSper3'ün etkinliği CatSper1 ve CatSper2'ye nazaran yeterince araştırılmamıştır. Çalışmanın, insan sperminde CatSper3 ve KISS1 ekspresyonlarının, sperm motilitesi ile ilişkilerinin değerlendirilerek, erkek infertilitesindeki rollerinin belirlenmesine katkıda bulunması amaçlanmaktadır.

Çalışma kapsamında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Bebek Merkezine rutin spermiyogram testi için başvuran 18-45 yaş aralığındaki 52 erkek birey dahil edildi. WHO'nun belirttiği kriterlere göre semen parametrelerinin; semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, sperm motilitesi, progresif motilite (PM), hızlı progressif motilite, yavaş progresif motilite, değerlendirildi. Çalışmada 2 grup oluşturuldu. Bunlar; birinci grup Normozoospermi Grubu (n=26) sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml'den büyük, sperm motilitesi >39 veya PM >30, ikinci grup olarak da Astenoospermi Grubu (n=26) sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml'den büyük, sperm motilitesi <39 veya PM <30 koşullarını sağlayanlar olarak belirlenmiştir. Semen örnekleri immüno floresan işaretleme ile Anti-CatSper3 ve Anti-Kiss1R primer antikoları ile işaretlendi. Kesitler, flüoresan mikroskop altında değerlendirilerek ekspresyon yüzdeleri belirlendi. Semen örneklerinin genetik analizi yapılarak CatSper3 ve KISS1R gen ekspresyonlarına bakıldı. KISS1R ve CatSper3 ekspresyonları ve gen ifadeleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

Sonuçlarımıza göre CatSper3 ekspresyonlarının, normozoospermi grubunda astenoospermi grubuna göre total boyanma yüzdesinde anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak boyanma bölgeleri değerlendirildiğinde: normozoospermik bireylerde sperm membranı ve boyun bölgesindeki Catsper3 işaretlenme oranının astenoospermik bireylerden daha yüksek olduğu görüldü. Kiss-Peptin işaretlenme düzeyleri incelendiğinde, normozoospermik bireyler ve astenoospermik bireylerdeki ekspresyonlar arasında anlamlı bir istatistiksel fark saptandı. Membran ve baş-kuyruk bölgesinde Kiss-Peptin işaretlenme yüzdelerinin normozoospermik bireylerde astenoospermik bireylere kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü. Öte yandan baş bölgesinde Kiss-Peptin işaretlenme yüzdelerinin normozoospermik bireylerde astenoospermik bireylerden anlamlı bir şekilde düşük olduğu tespit edildi. Yapılan genetik analizler sonucunda ise CatSper3, KISS1R gen ifadelerinde gruplar arası anlamlı fark saptanmadı. Sperm hareketliliği için değerli olan bu yolların molekülleri erkek infertilitesinin belirteçleri olarak kullanılabilir. Tanı ve tedavide yeni hedef ve stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Anahtar Sözcükler: Erkek infertilitesi, Kisspeptin, KISS1/KISS1R, sperm motilitesi, CatSper3

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

THE RELATIONSHIP OF KISSPEPTIN AND SPERM CATION CHANNELS (CATSPER) WITH EACH OTHER IN HUMAN SPERM

Department of Histology and Embryology (Med)

MASTER'S THESIS KONYA-2024

KISS1R is a G protein-coupled receptor associated with the Gq/11 α subunit of G protein. By binding of KISS1 to KISS1R, it stimulates phosphatidylinositol (PI) and activates phospholipase C. As a result of its activation, it provides the form of inositol-triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) from phosphatidyl inositol biphosphate. IP3 provides Ca²⁺ release. Although the effect of KISS1 on sperm motility with this cycle is accepted, it is not known enough. Similarly, the effectiveness of CatSper3, one of the calcium channels in sperm, has not been adequately investigated compared to CatSper1 and CatSper2. The main aim of this thesis is to contribute to determining their roles at male infertility by evaluating the expressions of CatSper3 and KISS1 in human sperm and their relationship with sperm motility.

Within the scope of the study, 52 male individuals who are between 18-42 years old and applied to Selçuk University Faculty of Medicine Hospital, In Vitro Fertilization Center for routine spermiogram test were included. According to the criteria specified by WHO, main parameters of semen; concentration of sperma, volume, motility of semen, total count of sperma, progressive motility (PM), fast progressive motility, slow progressive motility were evaluated. Two groups were created in the study; normozoospermia (n=26) sperm concentration >15 million/ml sperm motility >39 or PM >30 is the first group. Asthenozoospermia (n=26) sperm concentration >15 million/ml, sperm motility <39 or PM <30 are the second group, was determined as. Semen samples were labeled with CatSper3 and Anti-Kiss1R primary antibodies by immunofluorescence staining. The fraction were evaluated under a fluorescent microscope and expression percentages were determined. Genetic analysis of semen samples was performed and CatSper3 and KISS1R gene expressions were examined. KISS1R and CatSper3 expressions and gene expressions of them were compared by groups.

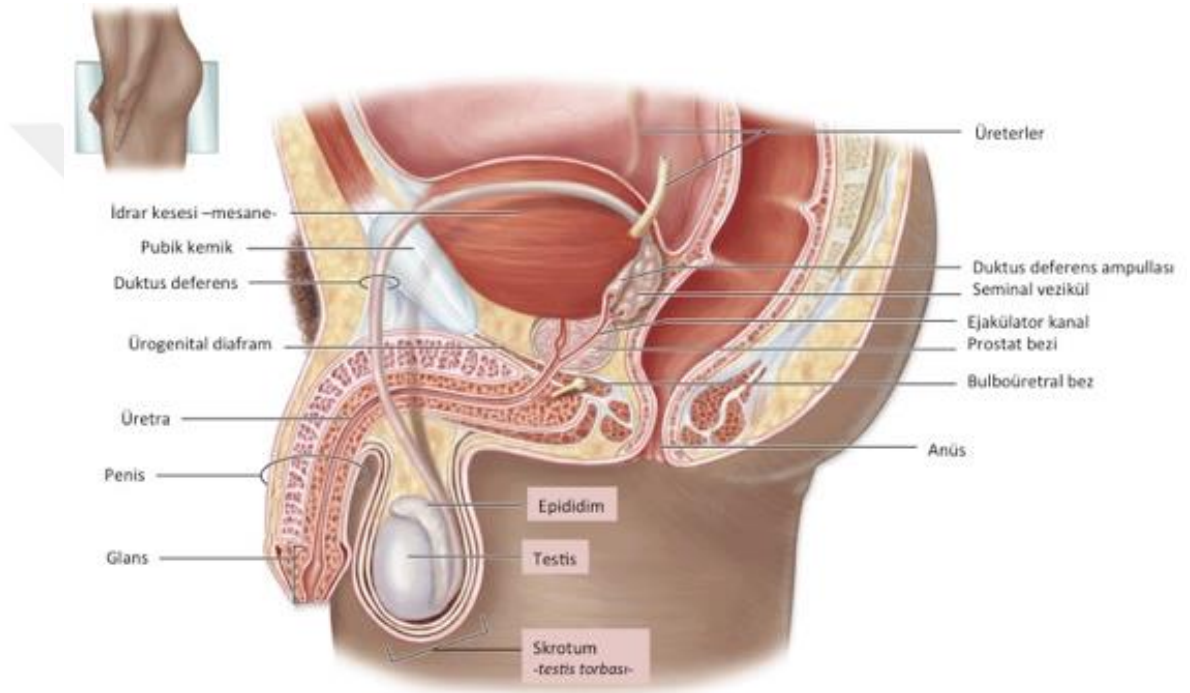
Our results showed that no significant difference was observed in the total labeling percentage of CatSper3 expressions in the normozoospermia group compared to the asthenozoospermia group. However, when the staining areas were evaluated, it was seen that the percentage of Catsper3 staining in the membrane and neck in normozoospermia individuals was higher than in asthenozoospermia individuals. When Kiss-Peptin staining levels were examined, a significant statistical difference was detected in their expression between normozoospermia individuals and asthenozoospermia individuals. It was observed that Kiss-Peptin labeling percentages in the membrane and head-tail region were significantly higher in normozoospermia individuals compared to asthenozoospermia individuals. On the other hand, it was determined that Kiss-Peptin staining percentages in the Head region were significantly lower in normozoospermia individuals than in asthenozoospermia individuals. As a result of the genetic analysis, no significant difference was detected between the groups in CatSper3 and KISS1R gene expressions. Molecules of these pathways, which are valuable for sperm motility, can be used as markers of male infertility. It may contribute to the development of new targets and strategies in diagnosis and treatment.

Key Words: Male infertility, Kisspeptin, KISS1/KISS1R, sperm motility, CatSper3

1.GİRİŞ

1.1 Erkek Ürogenital Sistemi Hakkında Giriş:

Erkek üreme sistemi, üriner sistemden net olarak ayrılamasa da üremeye direkt katkısı olan yapılar itibariyle bir çift testis, üriner sistemle bazı yolları ortak olan genital boşaltım kanalları ve bu kanallara yardımcı ve eksternal genital organ (penis) den ve aksesuar genital bezlerden oluşmaktadır (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1: Erkek Üreme Sistem Anatomisi (uroklinik.com)

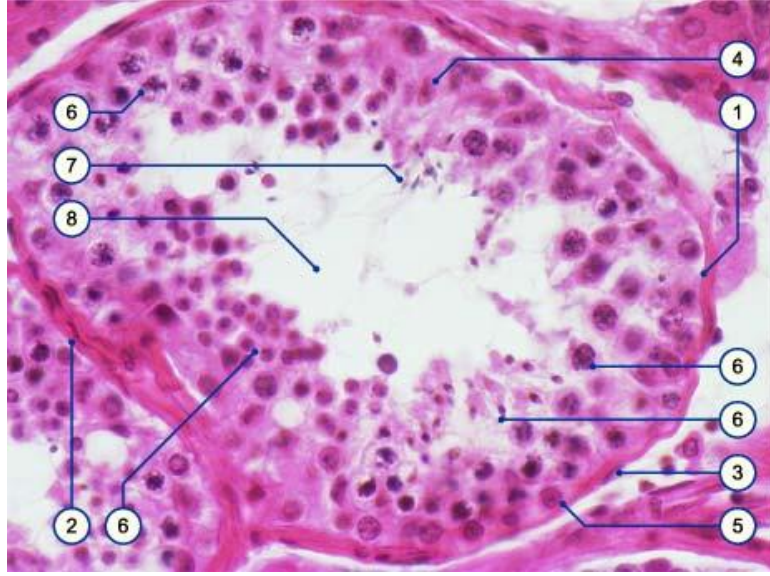
Testisler bir çift olup spermatik kordla asılı halde bulunmaktadır. Ekzokrin ve endokrin işlevlere haiz karma bir bezdir. Endokrin salgısı testosteron, ekzokrin salgısı ise testiküler fluid (sıvı) ve spermatozoondur (Kierszenbaum 2021).

Testisler en dışta tunica albuginea denilen ve histolojik olarak sıkı düzenli bağ dokusu yapısında olan bir kapsülle çevrilidir. Tunica albuginea, mediasten testis isimli kalınlaşmayı oluşturarak testis parankiminin içine doğru kıvrılmaları da oluşturur. Mediasten testisten de yine histolojik olarak sıkı-bağ doku yapılı septula testisler

meydana gelir ve septulalar testiküler parankimi ışınsal olarak yaklaşık olarak 250-300 adet lobüle ayırır. Lobüllerin tepeleri mediastene yönelik olup piramit yapıdadır. Her lobülün içinde yoğun kıvrımlı olan, yaklaşık olarak 1 ila 4 tane seminifer tübül bulunur. Tübüllerin arası intertisyel bağ dokusu yapısıyla doludur. İnterstisyel Leydig hücreleri bu bağ doku içinde bulunmaktadır. Leyding hücreleride seminifer tübül ve sistem için önemli hücrelerdir. (Mescher 2019).

Spermatogenezin merkezini seminifer tübüller oluşturur. Erişkin bireylerde seminifer tübül epiteli; Sertoli hücreleri ve spermatogenetik hücre katlarından oluşur, histolojik olarak çok katlı bir epitelidir. Aşırı kıvrıntılı kanallardan teşekkül eden bu kanalların uzunluğu yaklaşık olarak 30-40 cm ve kalınlığı yine yaklaşık olarak 150-250 mikrometredir. Her testisteki seminifer tübül toplam uzunluğu ortalama olarak 240-250 metredir. Seminifer tübüllerin tamamı rete testise açılır. Bu rete testisler ise bu seminifer tübüllerin salgılarını toplayan konnektör kanallardır. Lamina proprianın bazal laminayla bağlantısını sağlayan iç hücreler yassılaşıp peritübüler kontraktıl hücreleri veya miyoepitelyal hücreleri oluştururlar. Bu hücrelerin oluşturduğu ritimli kontraksiyonlar, seminifer tübüllerde yer alan sıvıların ve spermiyumların tübül kanalları ve genital boşaltım kanalları ile çıkış hareketlerini sağlamakla yükümlüdür. Böylece ejakülasyonda spermlerin atılmasını gerçekleştirir (Mescher 2019). İnterstisyel bağ dokusu lenf ve kan kapiller damarlarını, sinüzoidler ve interstisyel dokunun çevresinde gruplar halinde androjen üreten interstisyel-Leydig hücrelerini barındırır.

Gelişim halinde bulunan spermatogenetik hücreler Sertoli hücreleri tarafından desteklenir ve korunur. Spermiyogenez gerçekleştikten sonra artık hücrelerden kalan atıkları yine Sertoli hücreleri fagosite eder ve spermiyasyon esnasında spermlerin lümenine salınımını sağlar. Ayrıca seminifer tübüllerin lümenine iyon ve protein bakımından zengin bir sıvı salgılar. Bu salgılar spermler için değerlidir. (Kaur ve ark 2014). Spermatogenez sırasında oluşan ve farklı gelişme evrelerinde olan farklı seri ve tipte olan hücreleridir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Testis Kesiti, (Embryology.Ch)

- 1.Bazal lamina, 2. Myofibroblast, 3. Fibroblast, 4.Sertoli hücresi, 5.Spermatogonia A
6. Spermatogenezin çeşitli aşamalarındaki spermatositler, 7. Spermatozoon, 8.Lumen

1.1.1. Spermin Yapısı

Sperm 3 bölümden oluşur; baş, akrozom ve nukleus. Baş düzgün kenarlara sahip, oval, 3-5 mikrometre uzunluk, 2,5-3,5 mikrometre genişlik, en fazla 1,5 mikrometre kalınlıkta, ayrıca uzunluk/en oranı yaklaşık 1.5 olan bir baş oranına sahip olmalıdır. Akrozom ise, baş alanının %40-%70'ini oluşturmaktadır. Tüm genetik kalıtım materyalini, yani çekirdeği baş taşır.

Boyun bir çift sentriol içerir. Kuyruk ise, en içte 9+2 dizilişli mikrotübülden oluşan aksonem yapıyı içermekte olup; 9 kolondan oluşan dış yoğun fibriller ve sarmal mitokondrial kılıf bulunduran orta parça, yoğun fibriller ve fibröz kılıftan oluşan esas parça ve sadece aksonem içeren ince son parçadan oluşup 55 mikrometre uzunluğundadır. Spermin hareketliliğinden sorumludur (Rogers 2010).

1.1.2. Spermatogenez

Temel üreme olgularından biri olarak spermatogenez, non-diferansiye erkek üreme hücreleri, yani spermatogoniumların temel erkek üreme hücresi olan sperme dönüştürülmesidir. Spermatogenez; spermatosiogenez, mayotik bölünme ve spermiogenez aşamalarıyla karakterizedir.

Seminifer tübülün epitelinde prepubertal dönemde çok fazla miktardaki Sertoli h creti varlığına göre primordial germ hücreleri daha az miktarda bulunur. Hipofiz  n lobunda pubertede üretilip hipotalamustan salınan gonadotropin salgılayıcı hormonun (GnRH) etkisiyle gonadotropik hormonlar, yani Lüteinleştirici Hormon (LH) ve Folikül uyarıcı Hormon (FSH) salgılanmasına başlanır. LH ve FSH'ın bir bütün halinde uyarısıyla spermatogonyumlar spermatogonyum tip A'ları oluşturmak üzere mitoz bölünme geçirirler. Spermatogonyum Tip A hücrelerinin bir kısmı, spermatogenezin hayat boyu sürmesi amacıyla kök hücreler olarak varlıklarını devam ettirirler (Komeya ve Ogawa 2015).

Geriye kalan kısımdaki spermlerse tip B spermatogoniumlara farklanırlar ve bu tip spermatogonyumlardan primer spermatositler mitoz bölünmesi ile oluşum gösterir. Primer spermatositler, spermatogenezde mayoz bölünme aşamasının başlangıcını sağlarlar. 46 kromozom sayısına sahip primer spermatositler genetik olarak diploid karakterdedirler. Oluşan hücre hızlı bir şekilde 1. mayoz bölünmenin profaz 1 safhasına girerek bölünmeyi başlatır.

İnsanlarda görülen mayoz bölünmede profaz evresi 22 gün sürer. Hücrelerde ilk olarak DNA replikasyonu gerçekleşir. Replikasyon sonrası kromozom sayısı normal sayısının iki katına çıkar ve DNA miktarları da iki kat artmıştır (Hassa 2003). Metafaz evresinde homolog kromozom çiftleri bu kromozomların yan yana gelmeleriyle oluşur. Sentromer tutunma bölgeleri dışında kromozomlar, birbirlerine sıkıca kenetlenirler. Cinsiyet kromozomları (Y ve X) birbirleriyle homolog olmasalar da X ve Y kromozomlarının kısa kollarının uçlarındaki homolog segmentlerde birer çift oluştururlar. Homolog kromozomlardan oluşan tetratlar arasında homolog kromozomların kardeş olmayan bölgelerinde crossing over gerçekleşir.

Crossing-over olayı, tetrat yapılı homolog kromozomların sinapsis oluşturması sonrasında boyuna açılarak, kromatinlerde meydana gelen enine kırılmalar ve bu kırılma sonucu oluşan gen parçalarının çiftler arasında karşılıklı parça değiştirmesidir. Parça değişimi ile homolog kromozomların birbirlerinden ayrılması gerçekleşir.

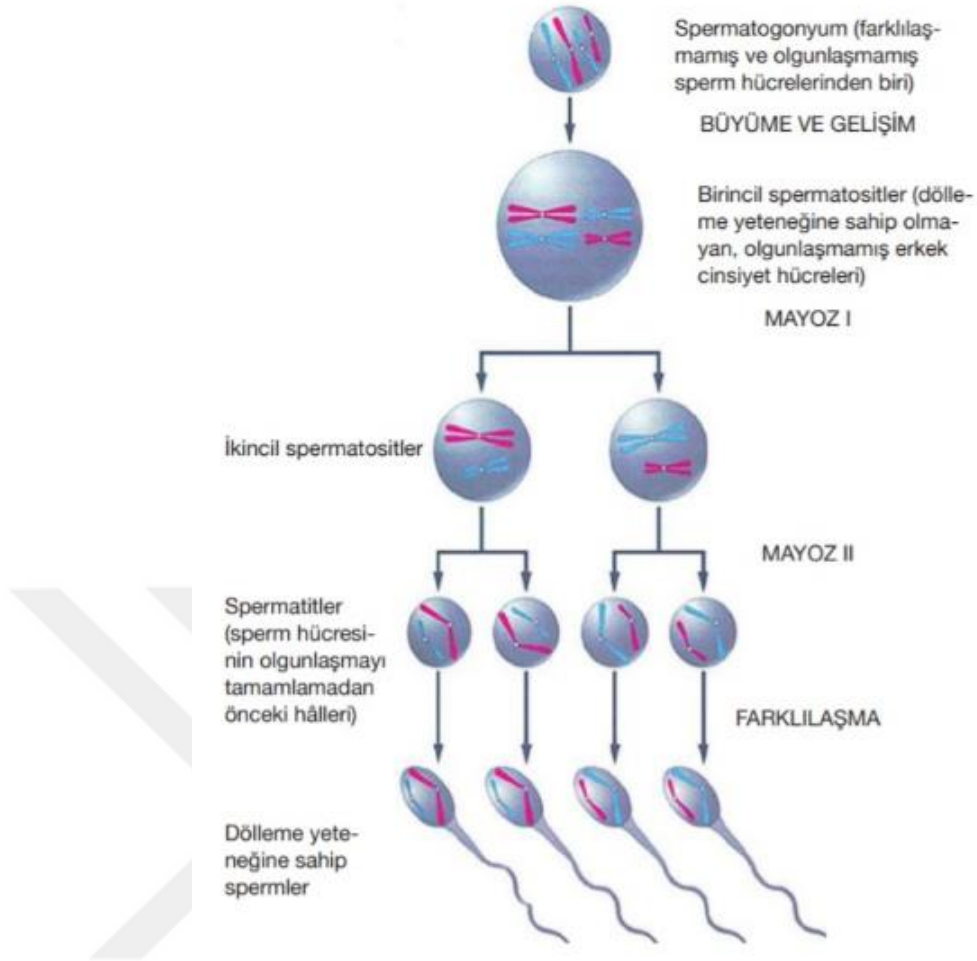
Bu arada çiftler bir süre daha kromatidler arasında değişimin olduğu, yani crossing-over'ın yaşandığı temas bölgelerinde birbirleriyle sinapsis yapmaya ve değişim gerçekleştirmeyi sürdürürler.

Homolog olan kromozomların birbiriyle yaptığı X biçimindeki mikroskobik görünümüne kiazma adı verilir. Kiazmada, crossing-over aşamasına gelmiş homolog kromozomlar arasında, karşılıklı gen kütleleri arasında değişim gerçekleşir, homolog çiftler de bu sırada birbirinden ayrılmaya devam eder. Sonunda, crossing-over ve kiazma aşamalarını tamamlayan homolog kromozomlar birbirlerinden ayrılırlar, tetradlar ayrılarak eski diad haline gelir. Kromozom çiftinin iki parçası, ekvatorial bölgedeki düzenleme ile spindle (bölünme iği), oluştururlar. Sonrasında primer spermatositler zıt (karşı) kutuplara çekilerek ikiye bölünürler (Hassa 2003).

Mayozda birinci bölünmenin sonunda Primer spermatositlerden iki tane yavru hücre oluşur. Bu yavru hücrelerden sekonder spermatosit oluşur. Sekonder spermatositler homolog kromozom çiftlerinden birini bulundurlar. Primer spermatositlere göre hacimsel olarak ufak hücrelerdir. Sekonder spermatositler 23 kromozom bulundurlar Bunlardan 1 tanesi gonozom (cinsiyet) diğer 22 tanesi otozom kromozomdur. Buna göre 1. mayoz bölünme sonunda DNA miktarı $2n$ ve hücreler diploid sayılı kromozoma sahiptir.

Sekonder spermatositler, başka bir hücresel uyaran beklemeksizin ikinci mayoz bölünmenin profaz fazına geçerler. Mayoz bölünmede ikinci aşamada S fazı olmadığından DNA replikasyonu olmaz, mayoz 2 evresinde kromozomlar iki kardeş kromatit barındırır ve kardeş kromatitler sentromer bölgelerinden ayrılırlar. Mayoz 2 sonunda, $1n$ DNA miktarlı $1n$ olan haploit kromozom sayılı 4 yavru hücre oluşur. Bu yavru hücreler spermatit olarak adlandırılır (Şekil 1.3.).

Gerçekleşen iki mayoz bölünmede 1 tane primer spermatosit, 4 tane haploid kromozomlu spermatid meydana gelir. Bu spermatidlerden iki tanesi $22 + Y$ diğer iki tanesi $22 + X$ kromozom bulundurur (Ross 2017).

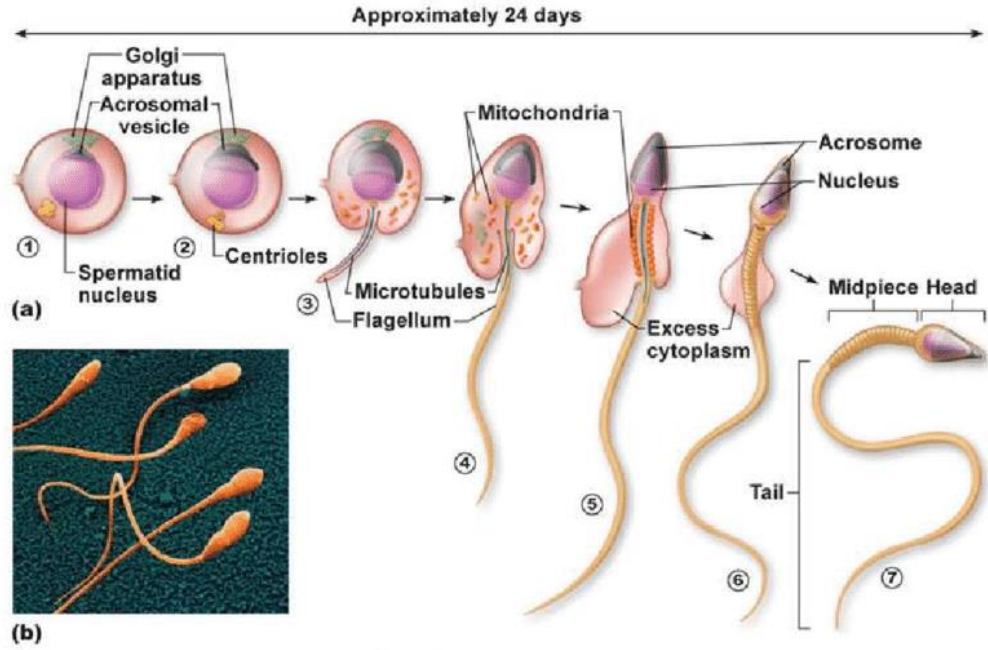


Şekil 1.3. Spermatogenez (yenibiyoloji.com)

1.1.3. Spermiyogenez:

Bir spermin mayoz bölünme ile efektif fertil bir hücreye dönüşmesinin söz konusu olamayacağı bugün bilinen bir gerçektir. Bir spermin fertil bir hücreye dönüşebilmesi için gereken adımlar toplamı spermiyogenez olarak tanımlanır. Bu dönüşme için gerekli olayda, spermatidte gelişen değişimler şunlardır:

1. Akrozom oluşumu
2. Boyun ve flagellum oluşumu
3. Çekirdek şekil ve büyüklüğünün değişimi ve kromatin yoğunlaşması
4. Artık spermatid sitoplazmasının atılması.



Şekil 1.4. Spermiyogenezis sırasında spermin maturasyonu için gereken değişimler. (Parihar, 2019) Şekil genel itibariyle 4 temel spermiyogenezis aşamalarını detaylı olarak özetlemektedir.

Spermiyogenez, çoğunlukla seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerin apikal sitoplazma kıvrımlarında geçmektedir. Bu sırada spermler spermiyasyon denilen işlemi gerçekleştirirler. Spermiyasyon işlemi spermlerin Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine geçmelerine denir. Lümeneye gelen ve burada serbest kalan spermler boşaltım yollarına yavaş yavaş geçerler. Spermiyasyon sırasında atık olan cisimleri hücreler arası köprüler oluşturur. Bu kalıntılar Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir.

Spermatogenezin başlamasından 72 gün sonra ise spermler kaudal epididime ulaşır. Spermler, epididimal maturasyon sonunda olgunluklarını, yani motilite ve fertilizasyon yeteneklerini epididimdeki taşınma ve hareketleri sırasında kazanırlar. Epididimal maturasyon sırasında spermler ileri hareketlilik, yani progresif motilite özelliğini kazanır. Çekirdekte kromatin stabilizasyonu oluşur. Ayrıca membranlarında yeni reseptörler kazanarak hücre membran molekül ve yapılarını değiştirir ve fertilizasyona hazır hale getirirler (Şekil 1.4).

1.1.4. Fertilizasyon Sürecinin Kısa Bir Özeti:

Fertilizasyon, insan üreme ve neslini devam ettirme açısından önem arz eder. Süreç ise 3 temel basamakta incelenir; Bunlar spermilerin kumulus hücreleri arasında ilerlemesi, zona pellusidaya bağlanması ve penetrasyonu ve spermle oosit membranlarının birleşmesi sonrasında spermin belli bölgelerinin oosit sitoplazması içine girmesidir.

Oositin sitoplazmasına giren sperm, bir dizi reaksiyon ile özellikle hücre içine fosfolipaz C salgısıyla oosit sitoplazmasında kalsiyum artışına neden olur, kalsiyum artışı ise hücre içi kalsiyum kanallarını aktive ederek oositin aktivasyonuna yol açar. Yalnız ve yalnızca aktive olmuş oosit, ikinci mayoz bölünmesini tamamlayabilir, böylece ikinci mayozunu tamamlamış oosit, ovuma dönüşebilir ve erkek ve dişi pronukleuslarının oluşumu yalnızca böylelikle gerçekleşebilir.

Spermilerin fertilizasyon yeteneklerini kazanmaları, tüm bu basamakları başarılı bir şekilde gerçekleştirebilmelerine bağlıdır. Kapasitasyon süreçlerini tamamlamaları, spermin başarılı bir fertilizasyonu başarması için gerekmektedir.

Sperm Kapasitasyonu:

İnsan dişi üreme sistemi içinde spermier servikte depolanır, buradan da follikül sıvısı ve oosit kaynaklı birçok maddenin uyarısı ile motiliteleri artarak fertilizasyon bölgesine yönelirler. Uyarılar spermier iki mekanizmayla oosite yaklaştırır. Bunlar kemokinezis, yani sperm motilitesini ve metabolizmasını arttırmak ve kemotaksis, yani spermier aracılıksız, yani doğrudan olarak oosite yönlendirmektir.

Spermier dişi genital kanallarında, vajen, uterus ve tuba uterinadaki sekresyonların kimyasal uyarısıyla kapasitasyona uğrarlar. Kapasitasyon, spermin akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmesi, yani yumurtaya girebilmesi ve başka spermierin yumurtaya girmesinin engellenmesi ve dolayısıyla fertilizasyon kapasitesini kazanması için geçirmesi gereken temel modifikasyondur, dişi genital sisteminin başında başlar, oositin içinde tamamlanır.

Kumulus hücrelerinden kapasitasyonu sağlamak için yine önemli miktarlarda glikoprotein salgılanır. Kapasitasyon süreci, genel olarak spermelerde belirgin yapısal değişikliklere neden olmasa da kapasitasyon sürecinde sperm membranında bulunan bazı intramembranöz moleküllerin remodelling'i, üstteki yüzeyel tabakanın uzaklaştığı ve sperm zarındaki negatif yükün genel olarak azaldığı görülür.

Böylelikle sperm reseptör bölgelerinin, oositin özelleşmiş reseptörleriyle karşılaşması, oositin gelen kimyasal ve mekanik uyarıları alması kolaylaşır.

Kapasitasyon sonunda sperm, akrozom reaksiyonunu oluşturabilecek konuma gelir, zona pellusidaya bağlanma ve hiperaktivasyon gibi temel fertil özellikleri kazanır. Sperm kapasitasyonu sonucunda oosit aktivasyonunda gerçekleşir (WHO 2021).

Spermin Kumulus Hücrelerini Geçmesi:

Spermilerin kapasitasyon sürecini tamamladığını anlamak açısından bakılabilecek en önemli parametre motilite parametrelerinin değişip değişmediğidir. Kapasitasyon sürecini tamamlamış olan sperm hiperaktivasyon özelliğini kazanırlar ve bu özellik hareket kabiliyetini önemli ölçüde artırır. Darbeli matkap veya burgu olarak tanımlanabilen, sperme özgü hareketi kapasitasyon sonunda sperm kazanmış olur. Bu hareketin en önemli özelliği sperm kuyruğundaki açılanmayı genişleterek lateral hareketleri artırmak ve kumulus hücreleri arasındaki hareketi mekanik olarak kolaylaştırmasıdır.

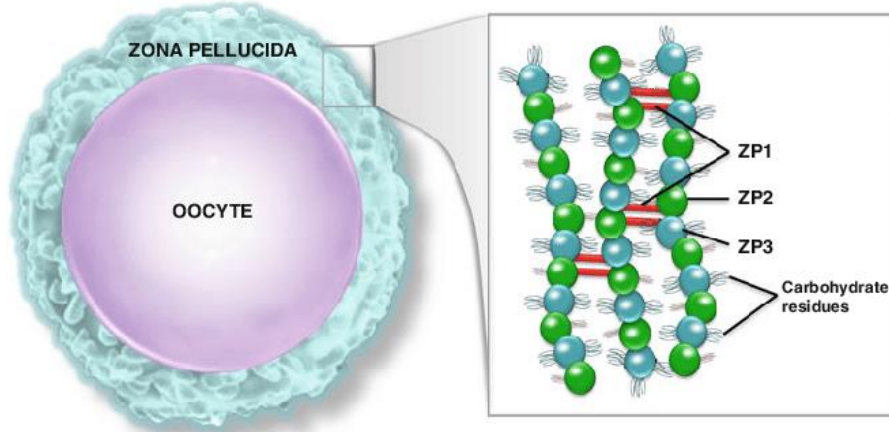
Spermilerin kumulus hücreleri arasında ilerlemesi, iki yolla gerçekleşmektedir. Mekanik yol ile spermeler kazanmış olduğu hiperaktivasyonla kumulus hücreleri arasında kendine yol açar. Enzimatik yol ile ise spermeler hyalüronidaz salgılayarak ekstraselüler matriksi eriterek kumulus hücreleri arasında ilerlemeye devam ederler.

Spermin Akrozom Reaksiyonu ve Zona Pellusidaya Penetre Olması:

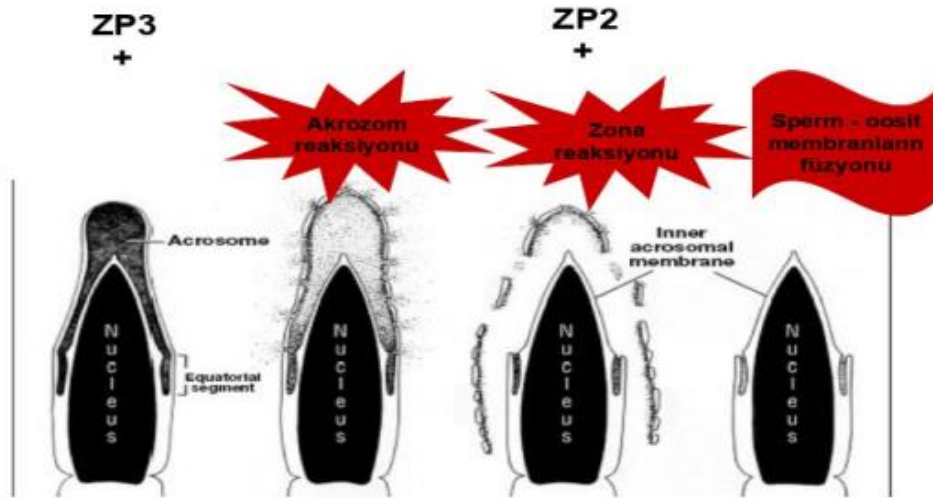
Zona pellusida içinde hücre bulunmayan glikoproteinlerden oluşmuşlardır ve yapılarında ZP1, ZP2, ZP3 molekülleri bulunur (Şekil 1.5). Spermeler kumulus hücrelerini geçtikten sonra zona pellusidaya temas ederler.

Spermilerin zona pellusidayı geçebilmesi için önce akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmeleri gerekir. Spermeler penetrasyon için, oositte bulunan ZP

reseptörlerinden ilk olarak ZP3'e primer olarak bağlanırlar ve akrozom reaksiyonunu tamamlamış olurlar. (Şekil 1.6).



Şekil 1.5. Zona Pellusida ve molekülleri (Dun, 2010).



Şekil 1.6. Akrozom reaksiyonu (Doğan, 2008).

Bu bağlanma ile akrozomal enzimler (akrozin, hyalürinidaz) salgılanır ve zona pellusidayı eritir. Böylece sperm perivitellin aralığına geçmiş olur. Daha sonra sperm ZP2'ye sekonder bağlanır ve zonaya penetre olur. Ardından ise oositteki integrin ve spermdeki disintegrin moleküllerinin de birleşmesi ve spermin ivmesi sonucu membranların deforme olması sonucunda sperm ve oosit membranları füzyona uğrar.

Sperm ile oositin füzyonu, tam olarak ekvatoryal segmentten olur ve bu segmentte spermden salgılanan oscillin, zona reaksiyonunda ve oositin aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Oosit hücre membranının altında bulunan

kortikal granüller kortikal reaksiyon olarak adlandırılan bir reaksiyon ile perivitellin aralığa salınır. Kortikal reaksiyon, zonada zona reaksiyonu adı verilen bazı yapısal değişikliklere neden olur. Bu reaksiyon ile oosite başka başka spermilerin bağlanmaları, yani polispermik reaksiyon engellenmiş olur.

1.2. İnfertilitenin Epidemiyolojisi: Tanımlar ve Dünya Geneline İnfertilitenin Önemi:

İnfertilite, WHO tanımına göre en az 1 yıl süreyle düzenli bir yöntemle, korunmasız ve bilinçli cinsel ilişki olmasına rağmen kadında fertil bir gebeliğin olmaması kliniğidir. İnfertilite, embriyogenetik süreçlerde, çeşitli travmatik veya non-travmatik süreçlerde veyahut henüz bilinmeyen çeşitli aksaklıklar sonucunda ortaya çıkabilir. WHO'nun infertiliteyi bir sağlık sorunu olarak tanımlaması, çiftlere gerek çocuk yapma sürecinde gerekse tıbbi danışmanlık süreçlerinde destek olma amacına hizmet eder.

Kadınlarda infertilite yaygınlığının, gelişmekteki ülkelerde dört çiftten birinde, gelişmiş ülkelerde ise yedi çiftten birinde görüldüğü düşünülmekte, dünyanın bazı araştırma yapılamayan bölgelerinde -ki buna en iyi örnek Afrika kıtası olarak gösterilebilir- infertilite %30'lara kadar ulaşmaktadır. Erkeklerin, infertilite vakalarının %20-30'unda çeşitli defektif yapılar sebebiyle sebep olabildiği, ancak tüm vakaların %50'sine katkıda bulunduğu veya herhangi bir tanı konulamadığı için öyle olduğu düşünüldüğü bildirilmiştir. Dünya genelinde fertilizasyon çağındaki çiftlerin %8-%15'inin infertiliteden etkilendiği öngörülmektedir.

Fertilite tarihte soyun devamının sağlanabilmesi amacıyla önemli bir yer tutmuştur. Öyle ki; bilinen yazılı tarihi belgelerin çoğunda buna ilişkin kıssadan hisseler, deneyimler, deneyler ya da öyküler sunulmuştur. Erkek infertilitesine küresel açıdan bakıldığında hala tartışılabilir sperm sayısının giderek azaldığı göz önündedir. 1992 yılında yayımlanan Carlsen ve ark. yaptıkları bir araştırmada sperm sayısı ve konsantrasyonunda 1938-1990 yılları içine alan süreçte bir azalma olduğunu bildirmişlerdir (Loughlin, 2012). Yapılmaya devam edilen çalışmalarda yıllar geçtikçe sperm konsantrasyonunun daha da düştüğü bildirilmeye devam edilmektedir.

20. Yüzyılın son yıllarına bakıldığında ise sosyal ve yapısal değişimlerin infertilite miktarını biraz kötü bir yönde olsa da değiştirdiği bilinmektedir. Ülkemizde ise ilk nüfus sayımı olan 1990'da infertilite oranı %8,5 olarak tespit edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 verilerine göre ise 25-49 yaş aralığındaki erkeklerde primer infertilite oranının %9, ayrıca sekonder infertilitenin ise %19 olduğu tebliğ edilmiştir.

İnfertilite nedenleri dört ana kategoriye ayrılabilir:

- 1) Kadın faktörü
- 2) Erkek faktörü
- 3) Birleşik faktörler
- 4) Açıklanamayan infertilite.

Bu kategorilerin her birine kesin yüzde vermek zor olsa da fikir vermesi açısından vakaların yaklaşık %35'inde infertilitenin esas olarak bir kadın faktörüne, %20-30'unun bir erkek faktörüne, %20'sinde de her iki partnerde de tespit edilen anomalilere bağlı olduğu ve vakaların %15'inde günümüz teknolojisi ile tanı konamayacağı bildirilmektedir (Vander Borcht, 2018).

1.2.1. Erkek İnfertilitesi:

Erkek infertilitesine sebep etkenler bazen yapısal olabilir ancak çoğunlukla sonradan ortaya çıkmış olan enfektif, travmatik, patolojik veya toksik maruziyetler erkek infertilitesinde daha yaygın ve önem arz etmektedir. Mesleki çevre ve meslek hastalıkları, infertilitede en az önceki sayılan faktörler kadar önemli bir sebeptir. Özellikle radyolojik faktörler göz ardı edilmemelidir.

Erkek infertilitesinde patofizyolojik olarak neden olan faktörler üç ana gruba ayrılabilir: psikolojik faktörler, fiziksel faktörler ve kimyasal ajanlar. Bu faktörleri anlamak için çeşitli ve insan soyuyla patofizyolojik benzerlikler gösteren deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar birçok çevresel etkenin erkek üreme sistemini olumlu veya olumsuz etkileyeceği gerçeğini ortaya koymuştur.

Erkek infertilitesi dünya çapında yükselen bir sorundur. Genellikle erkek infertilitesinin nedeni belirsizdir, yani soruna yönelik net bir etyopatogeneze ortaya konamaz ve bu etyopatogeneze öngörüsünün olmayışı yine çoğunlukla tanı ve tedaviyi engeller. Spermatogenez, testise ve erkek üreme sistemine özgü birçok gen tarafından düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Kısırlık, çiftlerin %10-15'ini etkiler, bu da onu üreme çağındaki bireyler için en sık görülen sağlık bozukluklarından biri haline getirir.

İnfertil bir çiftin araştırılmasında en az bir semen analizi her zaman zorunludur ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından (WHO) önerilen prosedür ve teknik koşullara göre yapılması elzemdir. Normal değerler, fertilizasyon kapasitesine sahip hastaları tanımlamaya yardımcı olur; bununla birlikte, ciddi bir oligozoospermi veya azospermi olmadıkça, subnormal meni değişkenlerinin prediktif değeri sınırlıdır (Dündar, 2013).

İz metallerin seviyelerindeki bozuklukların erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu ve semen kalitesini tahmin etmede yararlı araçlar olabileceği de bildirilmektedir. Spermatozoa, epididimden geçişi sırasında maturayona uğramakta ve motilite ve fertilizasyon yeteneğini kazanmaktadır. Ayrıca, ejakülasyondan sonra sperm, dişi üreme sisteminde kapasitasyon geçirmekte ve hiperaktivasyon özelliği kazanmaktadır, bu da yine spermin fertilizasyon yeteneğini kazanması, yani bir yumurtayı fertilize edebilmesi için gereklidir.

Epididimal matürasyon ve sperm hiperaktivasyonu, cAMP (siklik adenosin monofosfat), protein kinazlar ve fosfatazlar yoluyla etki eden kalsiyum ve pH değişikliklerini içerir. Bu bulgular erkek infertilitesinin temelini daha iyi biyokimyasal olarak anlamaya ve erkek doğum kontrol yöntemlerine yeni yaklaşımlar getirmelidir. Erkek infertilitesi genellikle idiyopatik veya bilinmeyen nedenleri içerir ve bu da yardımcı üreme teknolojilerine (ÜYTE) artan bir talebe yol açar (Dündar, 2013).

1.3. Semen Analizi ve Semen Analizinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Kriterleri

1.3.1. Semen (Ejakulat)

Testislerin işlevi, post-testiküler boşaltma kanalları ve aksesuar bezlerin salgılarından oluşan sıvıdır. Ejakülasyon ile dışarı atılır. Fertil bireylerde semen, ml'de en az 15 milyon sperm içerir. Semen hacmi 1,3 - 4 ml'dir ve semen hafif alkalidir

(pH 7.2 –7.7). Beyazımsı renktedir. Ejakülatın %10'dan azını spermiumlar, geri kalan kısmını da seminal plazma meydana getirir.

Ejakülatın seminal plazma ürünlerini seminal veziküllerde, prostat bezinde ve bulboüretal bezlerde üretilen sıvılar oluşturur.

Seminal veziküllerde üretilen sıvılar seminal sıvı hacminin %60'ını oluşturur. Bu sıvı visküz ve alkali yapıda bir sıvıdır. Fruktöz, prostaglandinler ve pıhtılaşma proteinleri içerir. Prostat bezinden salgılanan sıvı prostat sıvısı olarak adlandırılır. Bu sıvı seminal sıvı hacminin %25'ini oluşturur. Prostat sıvısı sütümsü, hafif asidik bir sıvıdır. İçerisinde sitrik asit (ATP yapımı için), asit fosfatazlar ve birçok diğer enzimleri (prostat-spesifik antigen; PSA, lizozim, pepsinojen vs.) bulundurur. Bulbo-üretal bez ise alkaline mukusu üretir. Bu mukus üretranın kayganlaşmasında önemli bir salgıdır.

1.3.2. Semen Analizinde İncelenen Parametreler

1902 yılında Edward Martin infertilitenin tanımlanması için semen analizini öneren ilk kişidir. Devam ede yıllarda Semen analizinde değerlendirilen parametreler genişletilmiş ve detaylandırılmıştır. 1980 yılında Semen analizi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kılavuz hazırlanarak semen parametreleri standart hale getirilmiştir. WHO semen analiz kılavuzunu en son 2021 yılında revize etmiştir.

Günümüzde infertilite şikayetiyle gelen çiftlerde infertilite sebebinin %40 oranında erkeğe bağlı olduğu tespit edilmiştir. Erkek infertilitesinin teşhisinde en önemli etmen semen analizidir. Semen analizi erkekten alınan ejakülatın farklı parametrelerce incelenmesine dayanan bir testtir. Semen analizinde incelenen parametreler başlıca semen içinde bulunan sperm sayısı, motilite (sperm hareketliliği), sperm morfolojisidir.

Bu incelemeler sonucunda WHO'nun semen analizi kılavuzunda belirttiği referans değerlerine göre semen parametreleri değerlendirilir (Tablo 1.1)

PARAMETRELER	MİN. REF. DEĞERİ
EJAKÜLAT HACMİ (mL)	1,4 (1,3- 1,5)
SPERM KONSANTRASYONU (10^6 /mL)	16 (15-18)
TOTAL SPERM SAYISI (10^6)	39 (35-40)
TOTAL HAREKETLİLİK (“İLERİ HAREKETLİ” VE “YERİNDE HAREKETLİ” SPERM SAYISI, %)	42 (40-43)
“İLERİ HAREKETLİ” SPERM SAYISI (%)	30 (29-31)
CANLILIK ORANI (%)	54 (50-56)
SPERM MORFOLOJİSİ (%)	4 (3,9-4)
PEROKSİDAZ + LÖKOSİT (10^6 /ml)	< 1,0
Ph	>7.2

Tablo 1.1 Semen Analiz Kılavuzunun Önerilerince Semen Analiz Değerleri (WHO 2021)

Spermiyogram analiz testi için öncelikle 2-5 günlük bir cinsel perhiz süresi gereklidir. Cinsel erhiz süresi 2 günden az olması durumunda semende sperm sayısının azalması, sperm hareketliliğinin artmasına sebep olurken perhiz süresinin 5 günün üstünde olmasında ise bu durumun tersi gözlenir.

Semen analizi için verilen ejakülat, ortam sıcaklığından etkilenmemesi için analiz laboratuvarına yakın bir odada verilir. Semen analizi için verilen sperm örnekleri mastürbasyon ile elde edilmektedir. İşlem öncesi idrarın tamamen uzaklaştırılmış olması gerekir. Penisin ve ellerin yıkanıp sonra iyice kurulması ve herhangi bir kayganlaştırıcı madde kullanılmadan, steril semen kaplarının kapak ve iç kısmına temas etmeden ve kabın dışına taşırılmadan ejakülatın tamamının kabın içine boşaltılması gerekir.

1.3.3. Semen Analizi İçin İnceleme Yöntemleri

Semen analizinin incelenmesinde iki yöntem kullanılır. Bu yöntemler Makroskobik inceleme ve mikroskobik incelemelerdir.

1.3.4. Makroskopik İncelemeler

Semen Analizi makroskopik incelenmesi; şu aşamalar ile gerçekleştirilir, Semen beyazımsı ve viskoz yapıdadır. Bu sebeple örneklerin likefaksiyonu için direkt inkübatöre (37°C) yerleştirilir. likefiye olması için 20-60 dk kadar beklenir. Likefiye olan semende ilk değerlendirilme makroskopik olarak yapılır. Semen in likefaksiyon süresi, kokusu, görünümü, rengi, hacmi ve viskozitesi değerlendirilir ve kaydedilir.

Likefaksiyondan sonra ejaküle semen, tek kullanımlık steril pastör pipetiyle aspire edilerek damlama yöntemiyle ejakülatın vizkozitesi belirlenir. Viskozitesi normal olan semen, pipetten damlalar halinde düşer. Semen vizkozitesi anormal ise damlalar uzun iplikler oluşturarak akar durumdadır. Yüksek viskozite sperm motilitesini, konsantrasyonunu, spermin antikorla ekspres edilmesini etkileyebilir (WHO 2021).

Likefaksiyon sonrası ejakülat normal bir şekilde likefiye olmuş ise semen homojen, yarı opak bir görünümde olur. Ejakülat rengi; hastanın semeninde eritrosit varsa (hemospermi) kırmızı-kahverengi, vitamin ve ilaç kullanımı ya da hiperbilirubine sebep olan bir hastalığı varsa sarı olarak gözlenebilir (WHO 2021).

Semenin hacim ölçümü ise steril kaptan semen örneğinin enjektöre çekilmesi ile ölçülür ve kaydedilir.

Makroskopik incelemeler sonrasında semen mikroskopik olarak değerlendirilir. Mikroskopik değerlendirmede semenin konsantrasyonu, motilitesi, canlılığı, morfolojisi ve aglütinasyonu, pH'sı ve sperm olmayan hücreler incelenir ve bu parametreler yapılan sayımlar ile kaydedilir.

Ejaküle spermin pH'sı 7,2 ile 7,7 arasında bir değere sahiptir ve hafif baziktir. Ölçüm pH kağıtları ile yapılır. pH, semen numunesinin verilmesini takiben en geç 45 dakika 1 saat içinde kesinlikle ölçülmelidir (WHO 2021).

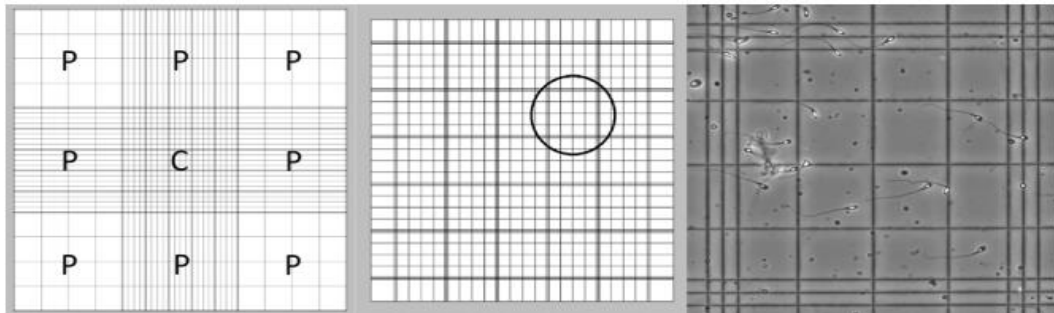
1.3.5. Mikroskopik İnceleme

Semen örneğinin değerlendirilmesi için faz-kontrast mikroskobu kullanılır. Semen konsantrasyonu için 10x10 kareden oluşan Maklar^R sayım kamarası (Sefi Medical Instruments, İsrail) kullanılır (Şekil 1.7). Makler kamaraya 10 ul kadar damlatılan semen, 3 ayrı 10 karedeki (totalde 30 kare) sperm hücreleri sayılır ve sayımın ortalaması alınarak sperm konsantrasyonu hesaplanır. Sperm hücreleri mikroskopta X20 objektif büyütmesinde sayılır. Semen örneğinde ml’de bulunan sperm sayısı sperm konsantrasyonunu, total spermium sayısı ise semenin tamamındaki sperm sayısını belirtir.



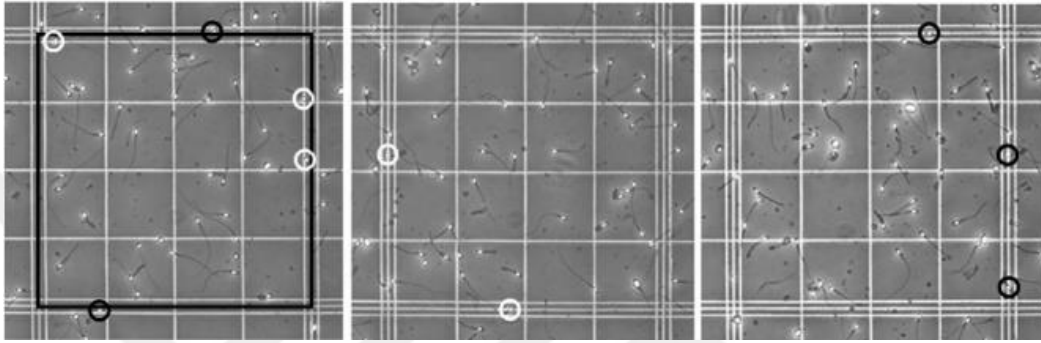
Şekil 1.7. Maklar^R sperm sayım kamarası

Makler kamarası ile sayım yaparken çok az sperm saymak hatalı sonuca ve yanlış teşhise ve tedaviye sebep olur. Bu sebeple toplamda en az 200 sperm hücresi sayılmalıdır (Şekil 1.8.) (WHO 2021).



Şekil 1.8. Makler kamarası sayım kareleri. (Courtesy of L. Björndahl).

Spermin sayılıp-sayılmayacağı başının lokasyonu ile belirlenirken kuyruğunun bulunduğu alan önemli değildir. Kamarada bulunan 3 kenar çizgisinden ortancası kamaranın sınırını belirler. Baş bölgesi iç sınırlar içinde bulunan sperm sayıma dahil edilmelidir. Bu şekilde yapılmayan sayımlar hatalı sonuçlara sebebiyet verebilir. Baş kısmı iç sınırlar içinde bulunan sperm (beyazla gösterilen daireler) sayıma dahil edilir, dış sınırlardaki (siyah gösterilen daireler) sperm sayıma dahil edilmezler. (Şekil 1.9) (WHO 2021).



Şekil 1.9. Makler Kamarası sperm sayma alanları. (Courtesy of C. Brazil).

Sperm sayımı sırasında doğru sonuç için sadece olgun (baş ve kuyruk bulunan) sperm sayılır. Sperm konsantrasyonu sayılan sperm sayısının sayım yapılan kare sayısına bölünmesi ile bulunur.

$C = N/n$ formülü ile hesaplama yapılır. Bu hesaplamada n: sayılan kare sayısını, N: sayılan sperm sayısını, C: ml'deki sperm sayısını ifade eder. Total spermium sayısı ise bulunan sperm konsantrasyonunun ejakülat hacimin çarpımı ile hesaplanır. (WHO 2021)

Sperm Motilitesi:

Sperm motilitesi ejakülat alındıktan 30 dk sonra likefiye olması durumunda tetkik yapılmalıdır. Makler kamarasına damlatılan 10µl semen faz- kontrast mikroskobunda 20X- 40X büyütmede (200 veya 400 büyütme) incelenir. İnceleme sırasında lamenin kenarına yakın alanların değerlendirilmesinden kaçınılması gerekir (WHO 2021).

Hareketlilik değerlendirilirken dikkat edilen bazı noktalar bulunur. Bunlar: alan seçimi rastgele olmalıdır, sperm sayısına göre alan seçimi yapılmamalıdır, spermilerin alana gelmesi beklenmemelidir. Aynı olan alanın tekrar sayılmasını engellemek için lamel ve kareler sistematik olarak sayılmalıdır.

En az 200'den fazla spermin yapılması değerlendirme için daha uygundur. Sperm motilitesi hareketlilik kategorisine göre yavaş ilerleyenden başlayarak hızlı ilerleyenlere doğru sistematik olarak sayılmalıdır. (WHO 2021)

Hem sperm motilitesinin manuel değerlendirilmesi hem de bilgisayar destekli sperm analizinden elde edilen verilerde hızlı ilerleyen spermiler önem arz eder. Bu sebeple hareketliliğin değerlendirilmesi için dört farklı kategori önerilir. Bu kategoriler şunlardır (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. WHO Sperm motilite kategorileri (WHO 2021)

Hızlı Progresif	Sperm doğrusal olarak büyük bir daire içinde aktif hareket eder. Sperm 1 saniyede en az 25 µm (½ kuyruk uzunluğunda) ilerler.
Yavaş Progresif	Sperm doğrusal olarak aktif hareket eder. Sperm 1 saniyede 5 µm-25 µm uzunluğunda ilerler.
Non-progressive motilite (NM):	İlerleyici olmayan harekettir. Spermde aktif kuyruk hareketi görülür. Kuyruğun etkisi ile baş kısmında çok küçük hareketler görülür.
İmmotilite (IM):	Spermde hiç hareket görülmemesidir.

Tablo 1.2. WHO 2021 kriterlerine göre sperm hareketliliğini gösteren kategoriler.

Ayrıca sperm parametreleri ile yapılan analizler sonucunda sperm konsantrasyonu, total sayısı, toplam motilitesi ve canlılık durumlarına göre gruplandırmalar oluşturulmuştur. Bu gruplar aşağıdaki tabloda gösterildiği gibidir (Tablo.1.3.).

Tablo 1.3. WHO Semen parametreleri analizi sonucuna göre tanımlar. (WHO 2021)

Normozoospermi	≥ 15 milyon/ml sperm konsantrasyonu, %40 ve daha fazla toplam motiliteye veya ≥ 30 progresif sperm motiliteye sahip olması. ≥ 4 (Kruger Strict kriteri) normal sperm morfolojisine ve ≥ 58 sperm canlılığı olmalıdır.
Astenozoospermi	Toplam sperm motilitesinin %40'ın altında ve/veya sperm progresif motilitesinin %30'un altında olması durumudur.

Oligozoospermi	ml deki sperm sayısının 15 milyon altında olması veya toplam sperm sayısının 39 milyonun altında kalması durumudur.
Oligoasteno-teratozoospermi	15 milyon/ml altında sperm konsantrasyonuna ve/veya 39 milyonun altında toplam sperm sayısının olmasıdır. %40'ın altında total sperm motilitesinin ve/veya %30'un altında progresif sperm motilitesi olmasıdır. %4 (Kruger Strict kriteri)'den az normal sperm morfolojisinin olmasıdır.
Teratozoospermi	Kruger Strict kriterlerine göre normal sperm morfolojisi en az %4 olmalıdır.
Azoospermi	Ejakülatta hiç sperm bulunmamasıdır.
Lökospermi (Lökositospermi)	Ejakülatta normal sınırın üzerinde (≥ 1 milyon) lökosit bulunmasıdır.
Aspermi:	Ejakulat olmamasıdır.
Nekrozoospermi	Ejakülatta canlı sperm yüzdesi (vitalite) $< \%58$ olmasıdır.

Sperm Vitalitesi:

Canlı sperm oranını ifade eder. Sperm hareketliliği ve motilite değerlendirilmesinde önemlidir. Hücrelerin membran bütünlüğü değerlendirilerek tahmin edilir. Tüm ejakülatlarda rutin olarak belirlenmelidir. Fakat sperm total motilitesinin %40'ın altında olduğu durumlarda önem taşır. Sperm canlılığının referans alt sınırı ise %58'dir. (WHO 2021)

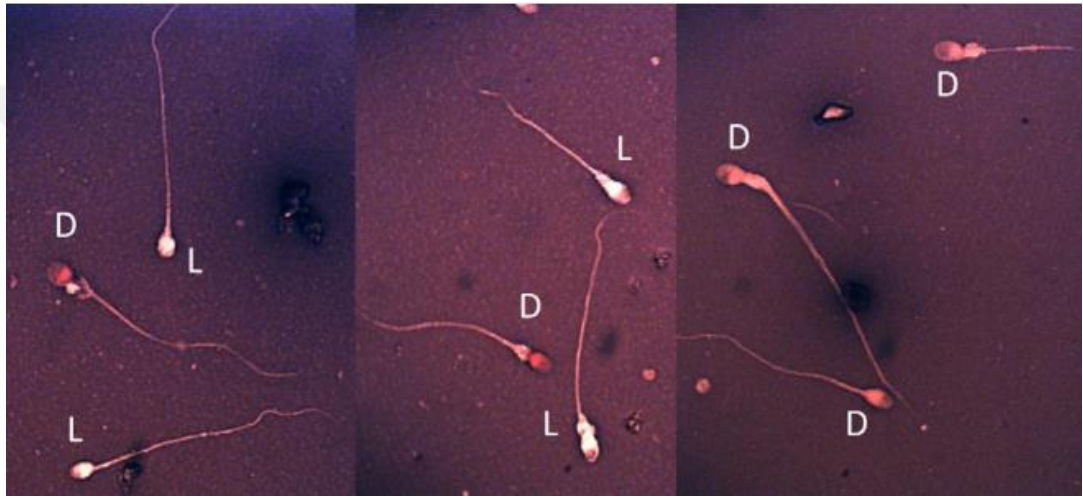
Canlı spermelerin yüzdesi, sağlam spermatozoalar belirlenerek değerlendirilir. Canlı spermelerin değerlendirilmesi birden fazla yöntemle belirlenebilir. Bu yöntemler; Spermin boya tutumu, hipotonik şişme yolu ile hücre zarının sağlamlığının tespit edilmesidir.

Boya Tutma Metodu:

Boyalar ile hücre zarının sağlamlığının tespitine dayanır. Hasar görmüş hücre zarının bazı boyaları içine alarak boyanmasıdır. Bu yöntemdeki boyalar; Eosin boyası veya Eozin-nigrosin boyalarıdır (WHO 2021).

Eosin- Nigrosin Boyama Metodu: Plazma zarı hasar görmüş ölü spermilerin boyayı içine alması yöntemidir. Bu boyama yönteminde spermilerin fark edilmesi için arka plan ve sperm başları renklerinin arasındaki kontrastı arttırmak için nigrosin kullanılır. Böylece bu da onları ayırt etmeyi kolaylaştırır. Zarı hasar görmüş cansız spermier pembe renge boyanırken, canlı spermier boyayı içine almadıkları için renksizdir (WHO 2021) (Şekil 1.10).

Eosin Boyama Metodu: Bu yöntemde sadece eosin Y kullanılır. Ölü sperm hücreleri pembe boyanırken, canlı spermier boyanamazlar, renksizdirler (WHO 2021).

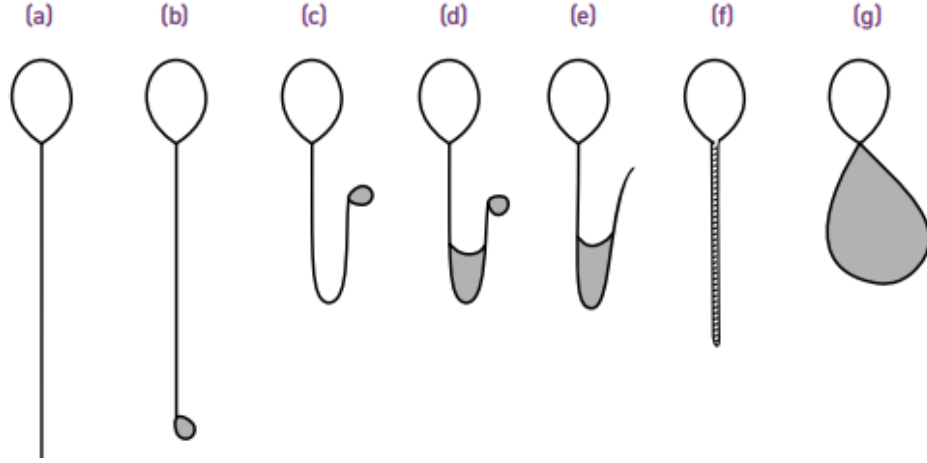


Şekil 1.10. Eosin-Nigrosin Boyama Metodu: Kırmızı veya koyu pembe başlı spermatozoa ölü (D) olarak kabul edilirken, beyaz başlı spermatozoa (L) canlı kabul edilir. (WHO 2021)

Hipoozmotik Şişme Metodu:

Spermin boyanmasının istenmediği durumlarda kullanılan yöntemdir. Hipoozmotik şişme testi, yalnızca sağlam zarlara sahip hücrelerin (canlı hücreler) hipotonik solüsyonlarda şişebilme özelliğine dayanır.

Zarları sağlam spermier 5 dakika içinde şişer. Tüm kamçı şekilleri 30 dakika içinde hareketsizleşir. Spermierin kuyruklarının sarmal şeklinde olması, şişmiş spermier olarak tanımlanır (WHO 2021) (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 Hipoozmotik şişme metodu uygulanmış spermlerdeki morfolojik değişiklikler. (a)= değişiklik yok, (b)–(g) = kuyruk değişiklikleri çeşitleri. Kuyruktaki şişlikler taranmış yani gri alanlarla gösterilmiştir. (WHO 2021)

Sperm Morfolojisi:

İnfertilite tanısında erkek üreme sisteminin değerlendirilmesi için normal spermatozoa oranının belirlenmesi yeterli değildir.

Bu sebeple sperm morfolojisinin değerlendirmesi de önemlidir.

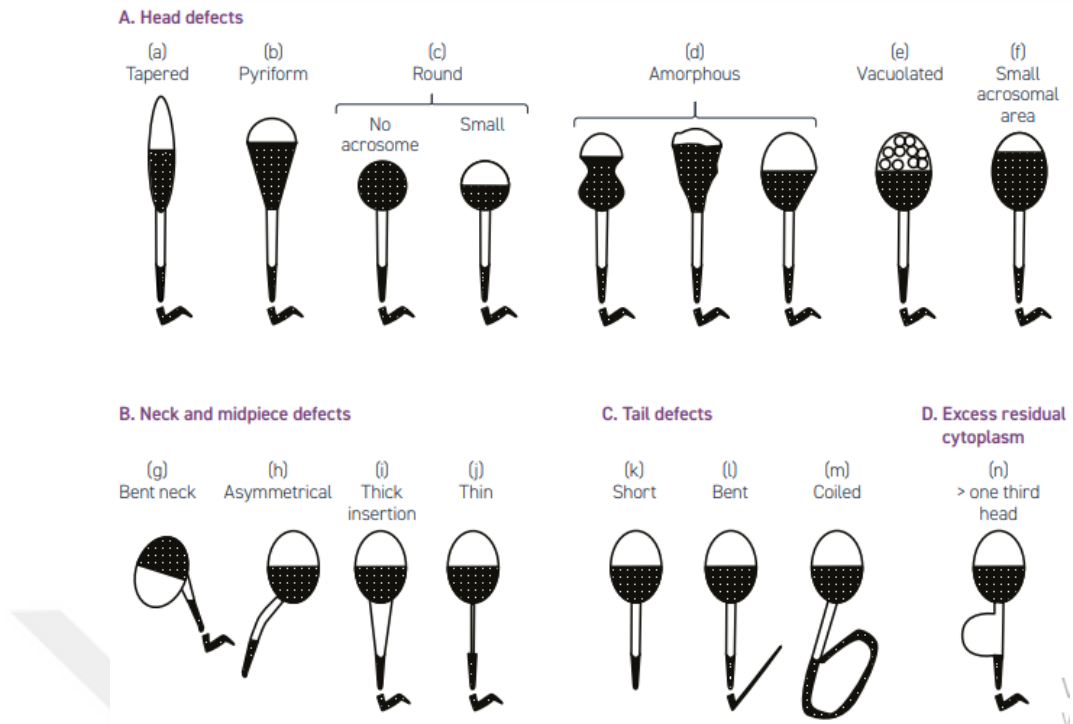
Spermde morfoloji değerlendirilmesi için; başın, boynun, orta parçanın ve kuyruğun spesifik morfolojisini değerlendirmek spermin dölleme yeteneği gösteren en önemli parametredir.

Sperm morfolojisinin değerlendirmesi aşağıdaki adımlardan oluşur:

- Ejakülat yayma preparat hazırlanır.
- Preparat hava ile kurutulur ve sabitlenir.
- Hazırlanan preparat özel boyalar ile boyanır. Preparat ışık mikroskopunda inmersiyon yağı kullanılarak 100x objektif büyütmesinde incelenir.
- Yaklaşık 200 sperm değerlendirilir. (WHO 2021)

Anormal sperm morfolojisi:

Anormal morfolojiye sahip sperm, genel olarak düşük fertilizasyon potansiyeline sahiptir. Anormal morfoloji için baş defektleri, boyun defektleri, kuyruk defektleri bulunması gerekir. Spermin anormal morfolojiye sahip olduğunu söyleyebilmek için; Baş, boyun, kuyruk bölgelerinde kusurlar olmalıdır (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. İnsan sperminin bazı anormal formlarının şematik çizimleri (WHO 2021)

Sperm Baş Anomalisi;

Normal baş oranından küçük ya da büyük yapıda olması, başın sivri ya da armut yapısında, yuvarlak, amorf yapıda olması, spermelerde çift başlılık bulunması veya bu defektlerin kombinasyonları bulunmalıdır.

Baş defektleri değerlendirilirken post-akrozomal bölgeye de bakılır ve bu bölgede vakuoller bulunması, akrozom alanlarının küçük veya büyük olması defekt kabul edilir.

Boyun ve orta parça anomalileri;

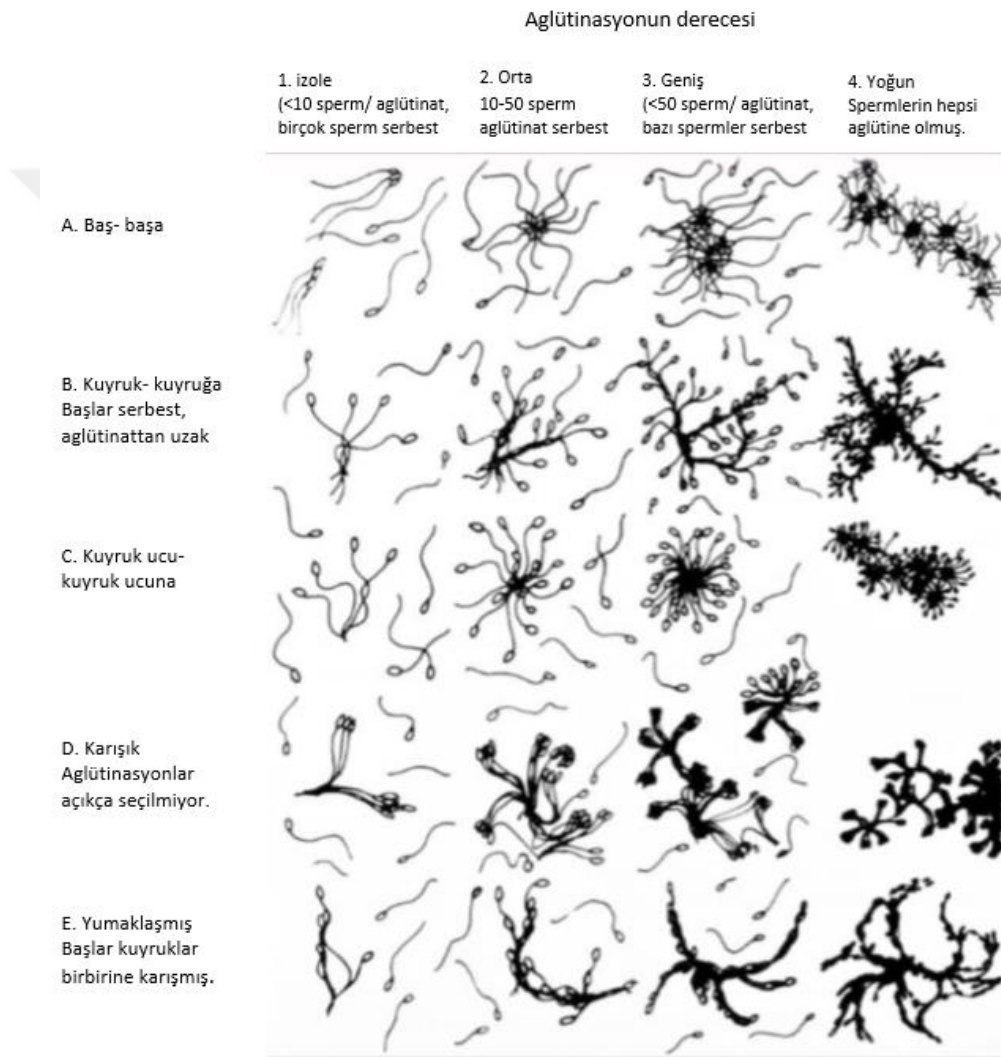
Spermin orta parçasının başa bağlandığı yerin normalden kalın veya düzensiz olması, normal olmayan derecede ince olması, bağlantı noktasının keskin bir şekilde kıvrılmış olması veya bunlardan birkaç tanesinin birlikte görülmesi.

Ana parça defektleri:

Ana parçanın normalden kısa, birden fazla sayıda olması (çift), kırık, keskin açılı bükülmelerin olması, sarmal yapıda bulunmasıdır.

Sperm aglütinasyonu:

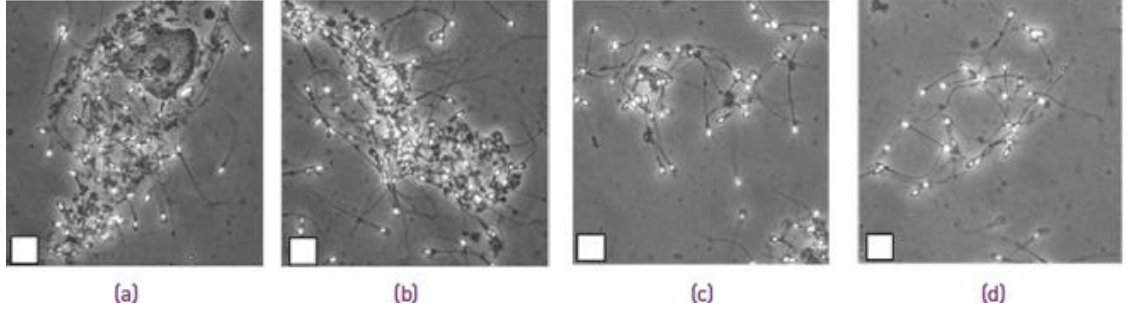
Semende aglütinasyon özellikle motil spermelerde görülür. Motil spermelerin baş-başa, kuyruk-kuyruğa ya da spermilerin karışık bir şekilde birbirine yapışmasını ifade eder. Bazı durumlarda aglütinasyon çok yoğun olur ve hareketli spermelerin hareketleri kısıtlanır. Bu arada hareketli spermelerin hareketleri mutlaka kaydedilmelidir (WHO 2021) (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Sperm aglütinasyon derecelerin gösterimi (WHO 2021).

Sperm Agregasyonu:

Hareketsiz (immotil) spermelerin birbirine yapışması ya da hareketli spermiumların, sperm dışı hücrelere, mukus ipliklerine ve kalıntılara yapışmasıyla kümeleşme oluşturması ile tanımlanır (WHO 2021) (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Semende spermlerin agregasyonu. (a): Epitel hücresi (b): veya bir spermatazoa, (c,d): ile kümeleşmiş sperm görüntüler (WHO 2021).

1.4. Kalsiyumun Fertilizasyondaki Rolü:

Fertilizasyon sürecinde önceki bölümde anlatıldığı üzere 3 temel olayın gerçekleşmesi muhakkak beklenir. Bunlar;

- Akrozom reaksiyonu
- Spermin zona pellusidadaki ZP3 proteinine primer olarak bağlanması
- Sperm ile oositin sekonder bağlanmadan sonra füzyonu.

Zona pellusidayı geçmiş olan sperm, oosit membranıyla füzyona uğrar ve membranın hemen altında bulunan kortikal granüllerin kalsiyum-bağımlı ekzositozunu uyarır. Ca^{+2} , hiperaktivasyon, kemotaksi, kapasitasyon ve akrozomal reaksiyon gibi sperimde fertilizasyon açısından gerekli olduğu bugün bilinen fizyolojik olayları tetikler. Fertilizasyonun gerçekleşmesinde Ca^{+2} iyonları sinyal molekülleri olarak işlev görmektedir. Kalsiyum spermatozoaya girdiğinde, enzimler ve birçok protein üzerinde allosterik düzenleyici etki gösterir.

Bugün, Ca^{+2} 'nin moleküler sinyalleşmeye katkıda bulunduğu, bilinen bir gerçektir. Kalsiyumla fertilizasyon açısından üç temel olay, hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu, düzenlemektedir. Ca^{+2} iyonu, sperm-ZP3 primer bağlanması ve spermin akrozomal reaksiyona geçmesinde en önemli rollerden birine sahiptir. Ayrıca kalsiyum iyonu, spermin baş kısmındaki zar G-proteinlerini aktive eder ve bu aktivasyon zona pellusida (ZP) reseptörlerini uyarır. Aktive olan G-proteinleri, H^{+} taşıyıcı kanallarını, hücre içi pH'ı arttırmak için uyarır, böylece akrozomal enzimlerin katalizasyonunu sağlayarak akrozom reaksiyonunu ve hiperaktivasyonu indükler.

Siklik adenosin monofosfat (cAMP), çözünür adenilat siklaz (sAC) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP), çözünür guanilat siklaz (sGC) tarafından olgun spermde üretilir. Bikarbonat sAC'yi kimyasal olarak aktive ettikten sonra foliküler sıvı, Ca^{+2} 'nin CatSper kanal yoluyla serbest bırakılması ile sAC'yi uyarır. Bu uyarının sonucunda, G-protein aracılı sinyal transdüksiyonu, tirozin fosforilasyonuna neden olan sAC ve fosfolipaz-C'yi (PLC) aktive eder. Bu olay kapasitasyon, akrozomal reaksiyon, oosit aktivasyonu gibi temel olaylardan sorumludur. cGMP seviyesindeki artışlar, PDE3'ü inhibe ederek cAMP'de eşzamanlı bir artışa neden olur. Bununla birlikte, artan Ca^{+2} cAMP'yi doğrudan da katalize edebilir.

Aktive durumdaki sAC, sGC ve PLC, ikinci haberciler ile inositol trisfosfat (IP3) cAMP, cGMP üretimini uyarır. IP3 reseptörü (IP3R) ile IP3 bağlanmasını sağlamak için, Ca^{+2} aracılığıyla Ca^{+2} salımı depolama iyonları eşzamanlı olarak, protein kinazları (PKA, PKC ve PKG) aktive ve stimüle eder, sırayla T-tipi kalsiyum kanalları, siklik-nükleotid kapılı iyon kanalı (CNG) ve benzerleri yoluyla kapı iyonları, proteinin aktivasyonu ile birlikte tirozin kinazlar (PTK) ve serin / treonin protein kinaz (STK) protein fosforilasyonunun artmasına neden olur. Ek olarak, Ca^{+2} , akrozom reaksiyonu esnasında kalmodulin, fosfolipaz-A ve fosfolipaz-D'yi aktive eder. Ca^{+2} , artan protein fosforilasyonu ile kapasitasyonu da tetikler.

Hem hiperaktivasyon hem de akrozom reaksiyonu, flagellar atımını artırır ve sonuçta spermin yumurta dış kısmına penetrasyonunda ve daha sonra olgun ovumun fertilizasyonunda görev alır (Abraham L.,2006).

1.5. CATSPER (Sperm Katyon Kanalları)

1.5.1. CatSper Kanallarının Yapısı ve Özellikleri:

İnsan spermine kalsiyum girişinin hangi kanallarca düzenlendiği uzun zamandır araştırılan, infertilite açısından da önem arz eden bir çalışma konusudur. Testiküler dokuda, spermatogenik hücre serilerinde ve olgun spermatozoalarda bir dizi kalsiyum iyon kanalı tanımlanmış olsa da sperme kalsiyumun girebilmesi için temel yolun, sperm üzerinde en fazla yerleşim gösteren kalsiyum kanalı CatSper'in, yani spermlere özgü kalsiyum kanalının temel yol olduğu gösterilmiştir.

CatSper kanalları, kalsiyum iyonunun hücre içine girişini denetleyip düzenleyen, sperm-özgü voltaj kapılı kalsiyum kanallarıdır. CatSper kanalları spermin fertilizasyon için dişi üreme kanalındaki birçok engeli aşmasını sağlar (Singh and Rajender, 2015).

CatSper kanalları; 4 ayrı alt biriminden oluşan CatSper α ve yardımcı 3 alt birim olan CatSper β , CatSper γ ve CatSper δ alt birimlerinden oluşmaktadır.

Fizyolojik olarak, CatSper üyeleri kalsiyum için geçirgendir. Bu protein kompleksleri membran potansiyel enerjisinin ve hücre içindeki iyon dengesinin düzenlenmesiyle birlikte çeşitli hücresel süreçlerde, özellikle de fertilizasyon süreçlerinde önemli bir rol oynar.

Bu kanallar yoluyla sperme kalsiyum iyon akışı, sonuç olarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda bir artışa yol açar, bu artış sperm hareketlerinin daha güçlü ve hızlı olmasını kolaylaştırır (Xiang- hong Sun, 2017). Ayrıca CatSper kanal sınıfı spermin depolanmış olduğu dişi genital yolların epitelinden ayrılması, zona pellusidaya primer ve sekonder penetrasyonu ve bir bütün olarak fertilizasyonda mutlaka gereklidir.

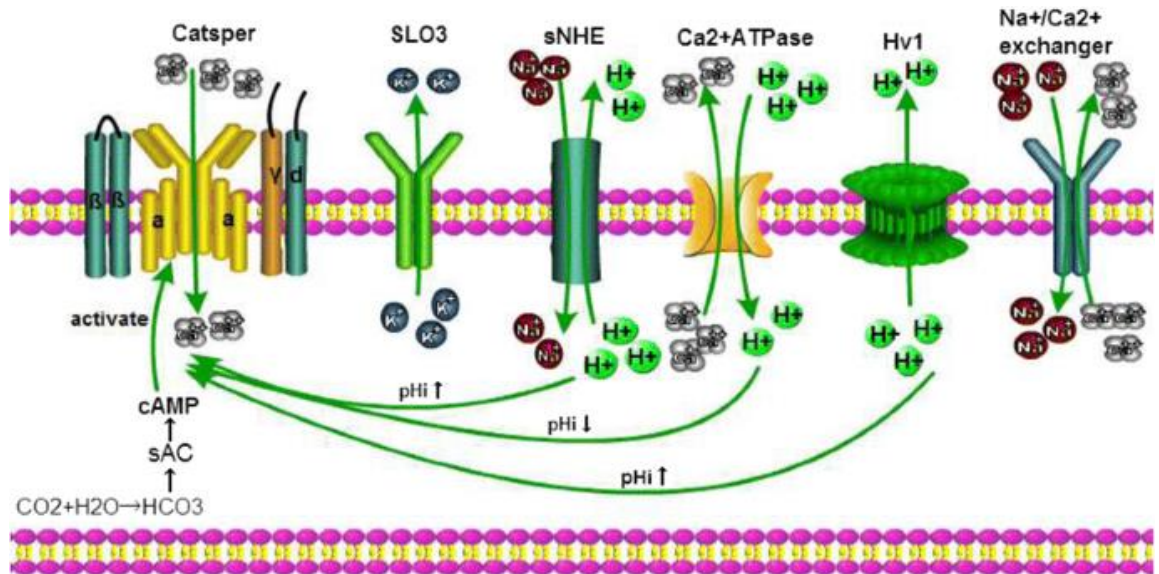
CatSper aktivasyonu progesteron tarafından güçlü bir şekilde düzenlenir. İnsan sperminde nanomolar düzeyde progesteron konsantrasyonunun bile CatSper aracılığıyla kalsiyum akımını önemli derecede artırdığı gözlenmiştir (Darszon, A ve ark, 2011).

Spermde voltaj kapılı H^+ kanalı 1 ($Hv1$), K^+ kanalı ($K_{sper}/SLO3$) gibi bazı iyon kanallarının ve plazma zarında bulunan Ca^{2+} adenosin trifosfataz (ATPaz), Ca^{2+}/Na^+ değiştirici ve sperm-spesifik H^+/Na^+ değiştirici (sNHE) gibi bazı iyon pompalarının, CatSper kompleksiyle birlikte çalıştığı da bilinmektedir.

CatSper kanal genleri de erkek infertilitesinin araştırılması ve tarama testi olarak kullanılabilmesi için potansiyel bir hedeftir. Bazı idiyopatik infertilite nedenleri Catsper kanallarındaki mutasyonlarla açıklanmıştır. Araştırmalar, özellikle alt üniteleri CatSper'in sperm hiperaktivitesi ve erkek üremesinin önemli bir parçası

olduğunu göstermiştir (Zheng, L.ve ark,2013). Bunun yanında CatSper alt birimlerinden herhangi birinin eksikliği de infertilite ile ilişkilendirilmiştir (Qi, ve ark, 2007). Özellikle, Catsper δ , CatSper kanal kompleksinin işlevselliği için mutlaka gereklidir. Bazı nakavt ve susturma çalışmaları, CatSper (1- 4) alt biriminden veya CatSper δ 'den herhangi birinin mutlak kaybının, spermde motilite kaybıyla sonuçlandığını göstermiştir (Chung, 2011). Aynı şekilde sperm kuyruğuna özgü Catsper δ 'den yoksun farelerin infertil olduğu ve spermatozoalarının hem Ca^{2+} akımı hem de hiperaktif hareketlilikten yoksun olduğu rapor edilmiştir (Chung, 2011). 37 Tüm bu çalışmalar işlevsel bir CatSper kompleksinin oluşumu için CatSper δ alt biriminin gerekliliğini ortaya koymaktadır. CatSper (1-4) kanalları ve yardımcı ek ünitelerinin fizyolojik fonksiyonları göz önüne alındığında erkek infertilitesinin tanı ve tedavisinde önemli bir potansiyele sahip olduğu açıktır.

Catsper kanal ekspresyonu insanda doğumdan sonra 18. günden itibaren başlar ve yetişkin bireylerin testislerinde maksimum seviyeye ulaşır. CatSper kanallarının hem testiste hem de ejakülatta üretiminin olduğu ve sperm membranı ve flagellumun ana parçasında da CatSper kanallarının bulunduğu gösterilmiştir (Gillian ve ark,2017). CatSper1, CatSper3 ve CatSper4'ün ürünlerinin ekspresyonu, geç germinal sperm hattının hücreleriyle sınırlıyken, CatSper2 ise spermatogenezin (pakiten spermatogonia) erken aşamasında eksprese edilmektedir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. CatSper kanal fonksiyonları ve düzenlenmesi (Xiang- hong Sun, 2017).

1.5.2. CatSper kanalları, Fertilizasyondaki Önemi, İnfertilite ile CatSper Arasındaki ilişki:

Catsper kanallarından kalsiyumun girmesi hiperaktivasyonu tetikler. Yine farelerde yapılan bir çalışmada kalsiyum girişinin spermde kuyruktan baş kısmına doğru kalsiyum iyonu yayılımını tetiklediği gösterilmiştir (Liu, J., Xiaet al., 2007). CatSper kanalları ve kalsiyum spermin hiperaktivasyonunu sağlayarak oosit penetrasyonunu etkiler. CatSper genleri ve bu genin ürünleri, erkek infertilitesinde tarama testi geliştirmek açısından potansiyel bir hedeftir. Bazı açıklanamayan infertilite sebeplerini açıklamakla birlikte CatSper kanal alt birimlerini herhangi birinin ekspresyonunda hata veya diğer bozukluklar infertilite sebebidir (Zheng, et al., 2013).

Araştırmalar, CatSper 1, 2, 3 ve 4 alt ünitelerinin sperm hiperaktif motilitesinin ve erkek fertilitésinin önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (Qi, et al., 2007). Catsper kanalları özellikle progresif motilite olmak üzere sperm hareketi ile ilişkilendirilmiştir. Hiperaktif motilite, spermin oosite ulaşması ve penetrasyonunun vazgeçilmez parçasıdır. Dolayısıyla Catsper α alt birimlerinden herhangi birinde bir aksaklık olması ve bu kanalların heterodimer yapısının bozulmasıyla erkek infertilitesi meydana gelir.

1.6. KISS1 (Kiss-Peptin) ve KISS1-R

1.6.1. KISS1 ve KISS1R Sistemi

KISS1 pubertede ve erişkinlik çağında, HPG aksamının regülasyonunda mutlak bir etkiye sahiptir. KISS1R ise puberteye girişte GnRH salgısının sağlanması için gereklidir. Reseptörler ile aktivasyonu sağlanan transdüksiyon yollarının analizleri sonucunda, fosfolipaz-C'ye bağlanıp bu bağlanmanın akabinde intrasellüler kalsiyumun sekresyonun da KISS1R'in rolünün önemli olduğu sonucuna varılmıştır. (Min, ve ark, 2014).

1.6.2. KISS1R Geni:

KISS1R geninin ürünü olan KISS1 reseptörü ilk sıçan beynine ait cDNA'dan çoğaltılmıştır fakat o dönemde asıl işlevi tespit edilememiştir (Lee, vd., 1999). Ancak yaklaşık 5 yıl sonra KISS1 geninin işlevi bağımsız araştırmacılar tarafından oluşturulan grup sayesinde tanımlanabilmiştir (Kotani ve ark, 2001; Muir ve ark, 2001; Ohtaki ve ark, 2001).

1.6.3. KISS1 ve KISS1R İlişkisi:

KISS1 reseptörü KISS1R'yi bağlanarak uyarmasıyla fosfolipaz C aktivasyonu sağlar ve sonrasında fosfatidilinositol 4,5-bifosfat hidrolizini sağlar. Sonrasında inositol trifosfat ile DAG sinyal hattında birikmesi gerçekleşir. Bu yolak kalsiyumun salınımı gerçekleşir (Constantin ve ark, 2009; Liu ve ark, 2008).

1.6.4. KISS1/KISS1R Sisteminin Hücre İçi Sinyalizasyon Mekanizmaları:

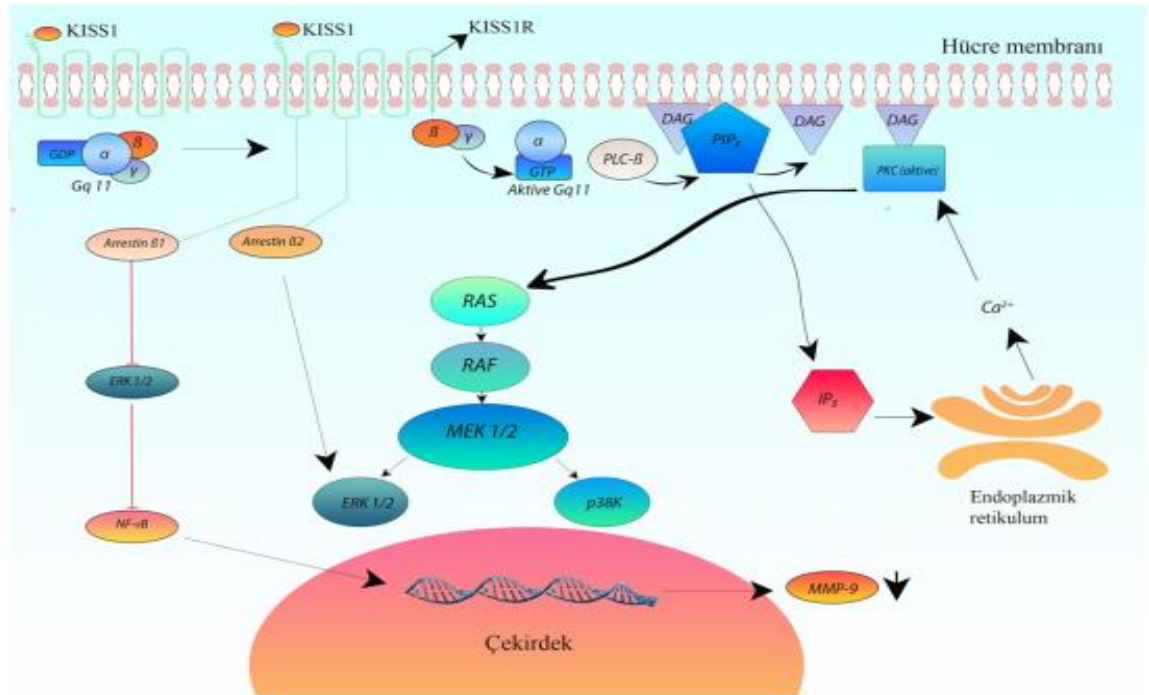
Kiss-Peptin'in anlaşılabilmesi için gerçekleştirilen ilk araştırmalar KISS1 reseptör aracılığıyla aktivasyonu sağlanan hücre içindeki sinyal yollarının heterolog olan hücrelerde incelenmesini kapsıyordu (Kotani ve ark, 2001; Muir ve ark, 2001; Ohtaki ve ark, 2001). Yapılan çalışmalar, tüm Kiss-Peptin derivelerinin KISS1R ile bağlandığını ve yine KISS1-Reseptörünü aktifleştirdiğini göstermiştir. (Castano ve ark, 2009). Gq/11 α (G protein alt birimi) ile bağlı G protein-bağlı reseptörlerinden (GPCR) biri olan KISS1R (Kotani ve ark, 2001; Muir ve ark, 2001). Kiss-Peptin Reseptörüne bağlanarak yollardan fosfatidil inositol (PI) döngüsünü uyarır (Stafford ve ark, 2002). KISS1R'ye KISS1'in bağlanmasıyla Gq/11 alt birimi fosforile olarak fosfolipaz C- β 'yı aktifleştirir.

PLC- β ile hidrolize olan hücre membranında fosfolipid fosfatidil inositol bifosfatın (PIP2)'yle inositoltrifosfat (IP3) ve (DAG) oluşumu sağlanır. DAG varlığı ile protein kinaz C (PKC) aktive olurken, Endoplazmik retikulum (ER) zarı üzerinde bulunan bir kalsiyum kanal reseptörüne IP3 bağlanmasıyla reseptör aktifleşir. Sonuçta ER üzerinden sperm hücresi içine kalsiyumun geçişi sağlanır (Kotani ve ark, 2001; Muir ve ark, 2001; Pampillo ve ark, 2009; Ringel ve ark, 2002; Stafford ve ark, 2002).

Yolakların gerçekleştirdikleri sistem, hücre ile ilişkileriyle birçok işlevi sağlayan hücre içi kalsiyum sinyal yolları çok yönlü ikincil haberci olarak görev yaparlar. Kalsiyum düzeyinin yükselmesi, erkek üreme sisteminde hücre düzeyinde genel olarak hormon salınımını uyarır. (Lamprecht ve Lipkin 2001; Stafford ve ark, 2002). KISS1 potasyum kanallarının içe doğru geçişini geçici reseptör potansiyeli kanonik (TRPC) gibi kanalları aktifleştirerek DAG ve kalsiyumu ile azaltarak hücre içindeki kalsiyum düzeyini artırabileceği ve GnRH salgılanmasını sağlayacağı düşünülmektedir (Zhang ve ark, 2008).

KISS1R'nin PLC aktivasyonu ile sağlanan kalsiyum sinyal yolundan başka Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz (MAPK) yollarıyla da etkileşim sağladığı tespit edilmiştir (Tng, 2015). Bu yollarla β -arrestin ve IP3 aktivasyonu sağlanır. Bu aktivleştirme MAPK'ların fosforillenmesi ile gerçekleştirilir. (Oakley ve ark, 2009; Tng 2015).

PKC'lar birçok ikincil haberciler (MEK 1-2, RAS dahil) sayesinde hücre dışı sinyal mekanizmalarıyla regüle edilen Kinaz (ERK) 1 ve 2'nin fosforile olmasını sağlar. KISS1R, ERK 1 ve 2'nin aktive olmasını ayrıca β 2-arrestin yolağıyla da sağlar (Wahab ve ark, 2016) (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. KISS1 ve KISS1R'nin Hücre içi sinyal mekanizması (Wahab ve ark, (2016)'dan uyarlanmıştır.

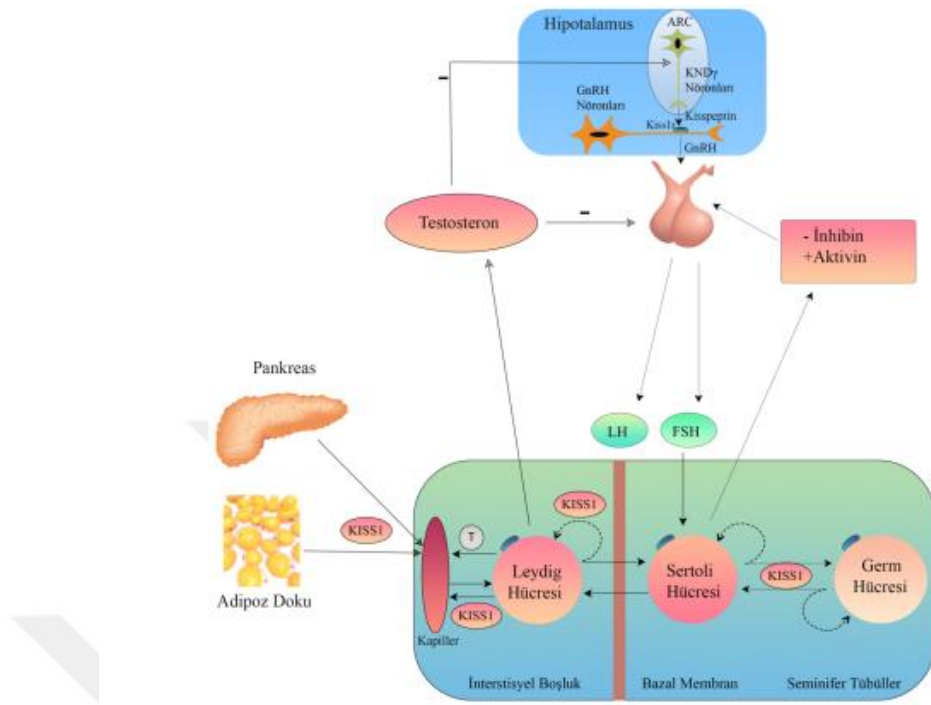
1.6.5. KISS1 (Kiss-Peptin) /KISS1R'nin Sperm Fonksiyonlarına Etkisi

Daha önceki bulgular, KISS1'in uterusun belli başlı kısımlarında bulunduğu ve hücre yüzeyinde yoğun olarak eksprese edildiğini göstermiştir (Gaytan ve ark, 2007).

Veriler, KISS1'in spermin tuba uterinada kazandığı hiperaktivite ve fertilizasyon vb. olaylarda önemli faaliyetleri olacağını göstermiştir (Chang ve Suarez, 2010; Visconti, 2009). İnsan testisinindeki Sertoli hücrelerinde ve spermatosit, spermatid ve sperm gibi farklı germ serilerinde hem KISS1, hem de KISS1R genlerinden protein eksprese edildiği saptanmıştır (Hsu ve ark, 2014; Mei ve ark, 2013; Pinto ve ark, 2012). Verilere göre spermatogenezde, KISS1R/KISS1 reseptörün parakrin ve/veya otokrin rolünün olduğu ortaya koyulmuştur (Wahab ve ark, 2016). Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, KISS1'in sperm motilitesinin düzenlenmesinde mutlak tesiri olduğu savunulmuştur (Pinto ve ark, 2012).

KISS1R ve KISS1 için insan sperminde yapılan karakterizasyon araştırmalarında bu moleküllerin lokalizasyonlarının spermin baş, kuyruk, boyun kısımlarında olduğu bildirilmiştir (Pinto ve ark, 2012). Spermde bulunan kalsiyumun aktivitesini saptamak amacıyla yapılan spektroflluometre çalışmaları ve konfokal mikroskop görüntülemeleri sonucunda, KISS1 verilen spermelerde hücre içindeki kalsiyum miktarının arttığı, spermin progresif motilitesini artırdığı ve hipermotil faza geçişi sağladığı saptanmıştır (Pinto ve ark, 2012). İnsan spermiumunda KISS1R ve KISS1'in ekspresyonunun ve spermdeki yerleşim dağılımının çalışıldığı bir araştırmada immünfloresan boyama ile her iki molekül içinde en kuvvetli boyanma, sperm-oosit füzyonu için çok önemli bölgede yani ekvatorial segmentte gösterilmiştir (Bedford ve ark, 1979; Flesch ve Gadella, 2000).

Flagellar aktivasyonunun sağlanmasında önemlidir. Kalsiyum depolarının ve hareketin kontrolünde, enerji gereksinimi içinde önemli görevi olan orta bölümde de KISS1'in ve KISS1R'nin ekspresyonu gösterilmiştir (Bedu-Addo ve ark, 2008; Publicover ve ark, 2008; Suarez ve Pacey, 2006) (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. KISS1'in testisteki etkileşim mekanizması (Wahab ve ark, (2016)'dan uyarlanmıştır).

Bugüne dek infertil bireylerde KISS1 ve KISS1-Reseptörünün sperm motilite üzerine etkisini gösterdiği yolların neler olduğuna dair belirgin bir sonuç literatüre geçmemiştir. Yapılan bir deneyde, biyokimyasal yöntemler kullanılarak örneklerin semen ve kan plazmalarında KISS1 düzeyinin, sperm parametreleri ile özellikle total sperm sayısı, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm motilitesi ile ilişkili olabileceğine ilişkin veriler sunulmuştur.

Bu çalışma, henüz evlenmemiş ve cinsel aktif olmayan 18-23 yaş arasındaki erkeklerden elde edilen örneklerle gerçekleştirildiğinden infertilite tanılı erkek vakalara ilişkin semen sıvısında KISS1 düzeylerine ilişkin net ve somut bir sonuç bulunamamıştır (Zou ve ark, 2019).

Sperm motilitesinin değerlendirilmesi için hücre içi kalsiyum yollarının araştırılması ve anlaşılabilmesi; gerekli, önemli değerlerden bir diğeridir. Fertilizasyon başarısında ve sperm kapasitasyonunda kalsiyum yolları ve kalsiyum kanallarının önemli rolü vardır. CatSper ile spermin hücre içi kalsiyum seviyelerinin yükselmesi sonucu spermde akrozom reaksiyonu, kapasitasyon ve motilite artışı sağlanır (Hildebrand, vd., 2010). KISS1'in CATSPER gen ekspresyonları üzerine olası etkilerine ilişkin bir bulgu bugüne dek literatürde paylaşılmamıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Çalışma Planı

- Rutin spermiyogram için örnek toplanması
- Semen analizi
- Çalışma için uygun ve gönüllü bireylerin örneklerinin çalışmaya dahil edilmesi
- Histolojik Analiz (İmmunoflouresan boyama)
- Genetik Analiz

2.2. Semen Örneklerinin Toplanması ve Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmaya, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarına rutin semen analiz testi yaptırmak için başvuran, 18-45 yaş aralığındaki çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul eden 52 erkek dahil edildi.

Tüm hastalar çalışma ile ilgili bilgilendirilerek gönüllü olduklarına dair onam formu alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen erkekler üreme döneminde (18-45 yaş arasında) olup, sigara içmeyen, kalsiyum takviyesi almayan varikosel, çocuklukta ateşli bir hastalık ya da sistemik bir rahatsızlık, testis travması gibi üremeyi etkileyen bir hastalık geçirmemişlerdir.

Semen örnekleri 2-5 (en az 72 saat en fazla 300 saat) günlük cinsel perhiz süresi sonrası steril bir ortamda masturbasyon yolu ile elde edildi. Örnek verildikten 20-30 dk sonra hastaların rutin semen analizleri yapılarak semen parametreleri kaydedildi. Dünya Sağlık Örgütü (WHO; 2021)'nın analiz kriterlerine göre değerlendirilen semen parametreleri; semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, toplam sperm motilitesi (WHO class A+B+C), immotilite ve normal sperm morfolojisini kapsamaktadır.

WHO normal sperm parametrelerini; sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml'den fazla, total sperm motilitesini %40'tan fazla veya progresif motilitesinin %30'dan fazla ve normal sperm morfolojisi $\geq$ %4 olarak belirlemiş olup tüm değerlendirmelerini bu parametrelere göre gerçekleştirmiştir.

WHO anormal sperm parametrelerini ise; sperm konsantrasyonu <15

milyon/ml, total sperm motilitesi %40'tan az ve/veya progresif motilite %3'dan az ve normal sperm morfolojisi %4 (Kruger Kriteri)'den az olarak belirleyip, değerlendirmiştir.

Yapılan çalışmada azospermik, oligospermik, şiddetli oligospermik bireyler çalışma dışı tutuldu. Çalışmaya dahil edilen bireyler 2 gruba ayrıldı; Grup 1: Normozoospermi (n=26); sperm konsantrasyonu ≥ 15 milyon/ml, Grup 2: Astenozoospermi (n=26); sperm konsantrasyonu > 15 milyon/ml, sperm motilitesi; total motilite $< 40\%$ ve/veya progresif motilite $< 30\%$.

2.3. Semen Analizi

2.3.1 Makroskobik Değerlendirme

Semen örneklerinde makroskopik olarak aşağıdaki maddeler değerlendirildi.

- Renk,
- Görünüm,
- Koku,
- Viskozite,
- Likefaksiyon süresi,
- pH ve
- Semen hacmi ölçülerek kaydedildi.

Hastalardan elde edilen semen örnekleri ilk olarak likefiye olmaları için 37°C inkübatörde 20-60 dk arasında bekletildi. Likefaksiyon süreleri kaydedildi. Likefiye olan örneklerin mikroskopik değerlendirmesi yapıldı.

2.3.2. Mikroskobik Değerlendirme

Semen rnekleri mikroskopik olarak sperm sayısı, sperm motilitesi, vitalitesi ve morfolojisi açısından faz-kontrast mikroskobunda Makler sperm sayma lamı üzerine 10 μl koyularak, 20X objektif büyütmesinde değerlendirildi ve sonuçları kaydedildi. Sperm konsantrasyonu (1 milimetredeki sperm sayısı) ve total sperm sayısı

(sperm konsantrasyonu x semen volümü) için Makler lamında 3 farklı 10'lu alan toplamda 30 kare sayılarak hesaplandı.

Spermilerin motilite özellikleri ve motilite yüzdeleri hesaplandı. Sperm motiliteleri; +4 motilite (WHO class A): Hızlı lineer progresif motilite, +3 motilite (WHO class B): Yavaş (geniş dairesel hareketli) progresif motilite, +2 (WHO class C): Non-progresif (yerinde hareketli) motilite ve +1 motilite: İmmotilite (hareketsiz) (WHO class D) olarak değerlendirildi.

Spermilerin canlılık (vitalite) oranlarını değerlendirmek için Eosin boyama testi uygulandı. Eosin boyası ile boyanan semen örnekleri faz- kontrast mikroskop altında incelendi. Hücrenin boyayı alıp almaması yasasına dayanarak, canlı ve cansız sperm belirlendi. Cansız sperm hücreleri plazma membran bütünlüğü bozulduğu için boyayı hücre içine aldıkları için pembeye boyandı, canlı sperm hücreleri ise boyayı almadığı için renksiz görünümde oldu. Test sonrası semen canlılığı (vitalitesi) yüzdelik olarak; Canlı sperm sayısının total sperm sayısına bölünmesiyle belirlendi.

Normal sperm morfolojisinin belirlenmesi ve sperm morfolojik anomalilerinin tespiti için semen örneklerinden 10-15 µl yaklaşık 1-2 damla lamlara yayılarak sperm yayma preparatları oluşturuldu. Yayma preparatların fiksasyonundan sonra preparat boyamaları (Spermac boyası; Fertipro, Belgium) yapıldı ve 40X büyütmede faz-kontrast mikroskopunda incelendi. Her preparatta en az 200 hücre sayıldı. Normal morfolojiye sahip spermilerin total sperm sayısına bölünmesiyle normal morfoloji yüzdeleri hesaplandı. Spermilerin baş, kuyruk ve boyun bölgesinde bulunan morfolojik anomalileri detaylı olarak değerlendirildi.

2.4. Histolojik Analiz ve Genetik Analiz için Örnek Hazırlığı

Rutin semen analizi yapıldıktan sonra atılacak semen örnekleri histolojik analiz ve genetik analizde kullanıldı.

İmmünohistokimyasal işaretleme

Histolojik incelemede immunfluoresan yöntemi kullanıldı. İmmunfluoresan analiz için; semen örnekleri lizinli lamalar üzerine yayıldı. Oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat kurumaya bırakıldı. Sperm yayma preparatları -20°C’de soğutulmuş absolu metanol’de 15 dk boyunca fikse edildi.

Yayma preparatların boyanmasında indirekt immunofluoresan işaretleme yöntemi protokolüne uygun olarak işaretlendi. İmmunofluoresan işaretlemede anti-CatSper3 ve anti-KISS1R primer antikörleri ve anti-rabbit Sekonder antikör kullandı.

Genetik Analiz

Genetik analiz için spermiyogram testi sonrası atılacak olan örnekler karyotüplere alındı ve -80 °C de donduruldu.

Dondurulma sonrası semen örneklerinden Total mRNA izolasyon kiti ile mRNA izolasyonu yapıldı.

İzole edilen mRNA’lardan cDNA izolasyon kiti ile cDNA elde edildi.

cDNA’ların referans gen yönünden amplifikasyonunu sağlamak ve hedef- referans bölgeleri belirlemek için Faststart Essential Sybrgreen Master Mix (Thermo^R) ticari kiti kullanılarak Real Time PCR yapıldı.

2.5. CatSper3 ve Kiss-Peptin’in Sperm Hareketliliğine Etkisinin İmmunfluoresan Boyama Yöntemiyle Histolojik Analizi

2.5.1. CatSper3’ün Sperm Hareketliliğine Etkisinin Floresan Mikroskop ile Analizi

Çalışma gruplarında CatSper 3’ün sperm hareketliliğine etkisinin belirlenmesi için indirekt immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılmıştır. Boyamada iki grup (Normozoosper ve astenozoosperm) için sperm hücreleri CatSper-3 polyclonal primer antikoru (Rabbit polyclonal Antibodies – bs-7136R non conjugated) ile immunfluoresan olarak işaretlendi. Sekonder antikör olarak Donkey anti-rabbit IgG-FITC (sc-2090, Santa Cruz Biotechnology, USA) kullanıldı. Uygulanan İmmünofluoresan boyama protokolü Tablo 2.1 de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. CatSper3 primer antibody İmmünfloresan boyama protokolü

Sperm yayma preparatları oluşturuldu.
Preparatlar -20 °C de soğutulmuş absolü metanol ile fikse edildi.
PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
%0,25 Triton X-100 içeren PBS’de 10 dakika inkübasyon. (Sperm hücrelerinde Permeabilizasyonu arttırmak için)
PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
Preparatta boyanacak bölgeler hidrofobik kalem (Pap-Pen) ile çizildi
Blok solüsyonunda (Ab 64226, Abcam, UK) 10 dk inkübe edildi. (non-spesifik boyanmaları önlemek için kullanıldı).
Blok solüsyonu yıkama yapmadan pipet ile uzaklaştırıldı.
CatSper 3 (Rabbit polyclonal Antibodies – bs-7136R non conjugated) (1/100 dilüe edilmiş) antikorunda + 4 °C’de 24 saat muamele edildi.
PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
Preparatlar Donkey anti-rabbit IgG-FITC: (sc-2090, Santa Cruz Biotechnology, USA) (1/200 dilüe edilmiş) sekonder antikor ile 2 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletildi.
PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
Preparatlar DAPI içeren kapatma medyumunu kullanılarak kapatıldı.

Normozoospermi ve astenozoospermi için yapılan boyamalarda tüm preparatlar, 40X objektif büyütmesinde Olympus BX51 Trinoküler flüoresan mikroskopta incelendi. Her preparatta rastgele 10 farklı alanda seçilerek DP72 dijital kamera ile görüntüleri alındı ve bilgisayara kaydedildi. CatSper3 molekülünün iki farklı grupta ekspresyonun karşılaştırılması için fotoğraflanan her alanda CatSper-3 eksprese eden sperm sayısı sayıldı ve total sperm sayısına bölündü. CatSper3 ekspresyon oranı iki farklı grup içinde değerlendirildi ve ekspresyon oranı karşılaştırıldı.

2.5.2. Kiss-Peptin’in Sperm Hareketliliğine Etkisinin Floresan Mikroskop ile Analizi

Çalışma gruplarında Kiss-peptin’in sperm hareketliliğine etkisinin belirlenmesi için indirekt immunhistokimyasal boyama yöntemi kullanılmıştır. Boyamada iki grup (Normozoosper ve Astenozoosperm) için sperm hücreleri Anti-KISS1R polyclonal primer antikor (Rabbit polyclonal Antibodies – STJ93845 non conjugated) ile immünfloresan olarak boyandı.

Sekonder antikor olarak Donkey anti-rabbit IgG-FITC (sc-2090, Santa Cruz Biotechnology, USA) kullanıldı.

Uygulanan immünfloresan boyama protokolü Tablo 2.2 de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Anti-KISS1R primer antibody İmmünfloresan boyama protokolü

Sperm yayma preparatları oluşturuldu.
Preparatlar -20 °C de soğutulmuş absolü metanol ile fikse edildi.
PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
%0,25 Triton X-100 içeren PBS’de 10 dakika inkübasyon. (Sperm hücrelerinde Permeablizasyonu arttırmak için)
PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
Preparatta boyanacak bölgeler hidrofobik kalem (Pap-Pen) ile çizildi
Blok solüsyonunda (Ab 64226, Abcam, UK) 10 dk inkübe edildi. (non-spesifik boyanmaları önlemek için kullanıldı).
Blok solüsyonu yıkama yapmadan pipet ile uzaklaştırıldı.
Anti- KISS1R polyclonal primer antikor (Rabbit polyclonal Antibodies – STJ93845 non conjugated) (1/100 dilüe edilmiş) antikorunda + 4 °C’de 24 saat muamele edildi.
PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
Preparatlar Donkey anti-rabbit IgG-FITC: (sc-2090, Santa Cruz Biotechnology, USA) (1/200 dilüe edilmiş) sekonder antikor ile 2 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletildi.
PBS ile 3X5 dakika yıkandı.
Preparatlar DAPI içeren kapatma medyumunu kullanılarak kapatıldı.

Normozoospermi ve astenozoospermi için yapılan boyamalarda tüm preparatlar, 40X objektif büyütmesinde Olympus BX51 Trinoküler flüoresan mikroskopta incelendi. Her preparatta rastgele 10 farklı alanda seçilerek DP72 dijital kamera ile görüntüleri kaydedildi. Kiss-peptin molekülünün iki farklı grupta ekspresyonun karşılaştırılması için fotoğraflanmış her alanda Kisspeptin eksprese eden sperm sayısı sayıldı ve total sperm sayısına bölündü.

Kisspeptin ekspresyon oranı iki farklı grup içinde değerlendirildi ve ekspresyon oranı karşılaştırıldı.

2.6. CatSper3 ve KISS1R'nin Sperm Hareketliliğine Etkisinin Genetik Analizi

Sperm örneklerinden genetik analizi için kullanılan kimyasal malzemeler şunlardır;

Total mRNA izolasyon kiti; mirnaextractor, RPE solüsyon, kloroform, RNase free distile su ve etil alkol

cDNA izolasyon kiti ve mRNA'dan qPCR Master-mixi

Referans gene ait primerler ve hedef mRNA'nın primerleri (*CatSper3* ve *KISS1R*)

2.6.1. Uygulanan Genetik Analiz Protokolü;

Prosedür 1- mRNA izolasyonu:

Sperm örneklerini (miRNA Extractor ile) tamamen parçalanmasını sağlamak için 5-10 dakika inkübe edildi.

Örneklere 0.2ml kloroform eklendi. 30 saniye vortekslendi. 10 dakika boyunca 4 ° C'de 12.000 × g'de santrifüjlendi. (santrifüj sonrası çalışılan örnek 3 farklı faza ayrılır.

Bu fazlardan üstteki faz, renksiz faz, sulu faz RNA'yı içeren fazdır.)

Süpernatant temiz RNase içermeyen 1,5 ml'lik santrifüj tüpü'ne aktarıldı, 1,5 hacim %100 etil alkol ilave edildi ve birkaç kere pipetaj işlemi yapıldı.

Oluşan Çözelti Spin Column TR'ye aktarıldı, 2 dakika 12.000 X g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası sıvı atıldı. Spin Column TR'ye hacimce 0,5 ml RPE Solüsyon eklendi, 12,000 × g'de tekraren 30 saniye santrifüjlendi, sıvısı uzaklaştırıldı (x2). Kolon 30 saniye boyunca 12.000 × g'de santrifüjlendi (Etanolün tamamen uzaklaştırılması için yapılır).

Yeni bir 1,5 ml santrifüj tüpüne kolon yerleştirildi. Yaklaşık 50 µl içinde RNaz bulunmayan su eklenerek ve 2 dk bekletildi. 30 sn boyunca 12.000xG'de santrifüjlendi.

Protokolün uygulanması sonrasında mRNA'lar elde edildi ve -80° C'ye kaldırıldı.

Prosedür 2- mRNA'dan cDNA sentezi

mRNA'lar thermo-cDNA sentez kitiyle birlikte komplementer DNA'ya dönüştürüldü.

Kit içinde bulunan tüm bileşenler her bir numune için Tablo 2.3'te belirtilmiş olan hacimlerde hazırlandı. Total volüm 20 µl olmak üzere kit, kullanım klavuzunda

yazan protokollere uygun olarak kullanıldı.

mRNA'ların, UVS spektrum-fotometrede kantitatif analizleri gerçekleştirildi. Ölçümlere göre her sentezlenecek cDNA için eşit miktarda 1 µg mRNA ilavesi yapıldı.

Tablo 2.3: cDNA mix solüsyon içeriği

RNA	1 µg
DNAz ve RNAz içermeyen su	İlave edilen RNA'ya miktarına göre ayarlandı.
cDNA master buffer	4 µl
Revers-transkriptaz enzimi	1 µl
Hacim Toplamı	20 µl

Yapılan bu işlemlerin ardından ısı protokolü tablo 2.4' de belirtilen şekilde Biorad marka Thermal-cycler cihazında uygulandı.

Tablo 2.4: cDNA sentez reaksiyonunda inkübasyon için gereken süreler

5 dk boyunca 37° C'de inkübe edilir.
20 dk boyunca 46° C'de inkübe edilir.
1 dk boyunca 95° C'de inkübe edilir.
Uzun müddet 4° C'de inkübasyonu sağlanır.

Uygulanan protokol sonrasında cDNA'lar elde edildi ve -20° C'ye kaldırıldı.

Prosedür 3- Real Time PCR

Referans gen bakımından cDNA'ların amplifikasyonunu sağlamak, hedef-referans bölgelerini belirlemek amacıyla Faststart Essential Sybrgreen Master Mix (Thermo^R) kiti kullanılarak Real Time RT-PCR Kitinde verilen protokoledeki (tablo 2.5) hacimlerde mix hazırlandı.

Tablo 2.5. Real Time PCR mix içeriği

Sybrgreen -Master -Mix-	10µl
500 nM - Forward -Primer-	1µl
500 nM - Reverse - primer	1 µl
Komplementer DNA-	5 µl
Su	3 µl
Toplam Hacim	20 µl

Referans genler hazırlandıktan sonra Real time PCR karışımı ve CatSper3 ve KISS1R genleri Real time PCR karışımları uygun cDNA'lar ile LightCycler 96 sistemine ait 96 kuyucuklu plate'lerde bir araya getirildi. Tablo 2.6' da uygulaması yapılacak ısı protokolü verilmiştir. İşlemler Lightcycler 96 sisteminde real time PCR cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 2.6: Real time PCR ısı protokolü

Denaturasyon	10 dk boyunca 95° C
Amplifikasyon Bu işlem 40 kez tekrarlanır. (40 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi)	20 sn kadar 95° C 20 sn kadar 60° C 20 sn kadar 72° C
Melting (erime) Curve	30 sn kadar 95° C 1 dk boyunca 50° C 90 °C (Acquisitions Three per/°Celsius)
Soğutma aşaması	1 dk boyunca 40 °C de

Genetik analiz sonrası istatistik analiz

Roche Lightcycler 96 cihazının quantification analiz programından her numunenin referans- hedef genlerin CT değerleri alındı.

Delta delta CT formülü üzerinden hesaplamalar ile elde edilen sonuçlar istatistik analiz için kaydedildi.

2.7. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler, R version 4.1.2. (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <https://www.r-project.org>) istatistik programının yardımıyla gerçekleştirildi. Analizler öncesinde verilerin normalliği Shapiro-Wilk'in normallik testi ve Q-Q grafikleri yardımıyla; grup varyanslarının homojenliği ise Levene'nin homojenlik testi ile kontrol edildi. Çalışmada yer alan sayısal değişkenlere ait bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. Normozoospermik ve Astenozoospermik bireylerde toplam CatSper3 ve Kiss-Peptin Boyanma Yüzdeleri (%) ile baş, kuyruk, membran, baş-kuyruk, boyun, boyun-baş, boyun-kuyruk boyanma yüzdeleri ve gen ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığının değerlendirilmesi Mann-Whitney *U* testi ile yapıldı.

İstatistiksel hipotezlerin değerlendirilmesinde anlam seviyesi %5 alındı.

3. BULGULAR

3.1. CatSper3 ve KISS1 Ekspresyon Oranlarının Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Çalışmaya 18-45 yaş aralığında 52 erkek hasta dahil edildi.

Normozoospermik ve Astenozoospermik bireylerde Catsper-3 ve Kiss-Peptin Düzeylerinin çalışma gruplarına göre kıyaslamalı olarak Tablo 3.1’de verilmiştir.

CatSper-3 toplam boyanma yüzdeleri incelendiğinde, normozoospermik bireylerde 95.00 ± 8.79 , astenozoospermik bireylerde 94.58 ± 6.33 olarak elde edildi. Ancak boyanma yüzdeleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı ($p=.169$, Şekil 3.1). Ancak boyanma yüzdeleri bölgesel olarak incelendiğinde normozoospermik bireylerde membran (4.84 ± 4.59 vs. 2.15 ± 2.22 , $p=.022$) ve boyunda (1.04 ± 1.34 vs. 0.21 ± 0.42 , $p=.005$) CatSper3 boyanma yüzdesinin astenozoospermik bireylerden daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 3. 2). Öte yandan baş, kuyruk, baş-kuyruk, boyun-baş ve boyun-kuyruk CatSper3 boyanma yüzdeleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı ($p>.05$).

Kiss-Peptin’in tüm hücredeki total boyanma yüzdeleri incelendiğinde, Normozoospermik bireylerde 96.39 ± 6.82 , astenozoospermik bireylerde 59.89 ± 13.91 olarak elde edildi. Normozoospermik ve astenozoospermik bireyler arasında oluşan farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<.001$, Şekil 1). Ayrıca, Normozoospermik bireylerde, membran (4.08 ± 4.38 vs. 1.69 ± 2.29 , $p=.005$) ve baş-kuyruk (46.22 ± 19.05 vs. 23.54 ± 23.59 , $p<.001$) bölgesinde Kiss-Peptin boyanma yüzdelerinin astenozoospermik bireylere kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü. Öte yandan Normozoospermik bireylerde baş bölgesinde Kiss-Peptin boyanma yüzdelerinin Astenozoospermik bireylere göre anlamlı bir biçimde düşük olduğu tespit edildi (40.12 ± 12.46 vs. 62.51 ± 22.08 , $p<.001$, Şekil 3.3). Kuyruk, boyun ve boyun-baş Kiss-Peptin boyanma yüzdelerinin ise Normozoospermik ve astenozoospermik bireylerde benzer olduğu görüldü ($p>.05$).

Histolojik analizde immunfloresan işaretleme yönteminde bakılan KISS1 ve CatSper3 moleküllerinin çalışma gruplarında ekspresyon lokalizasyonlarının belirlenmesi için işaretleme yapılan preparatlar floresan mikroskop ile incelenmiştir.

CatSper3 ekspresyonu normozoospermi bireylerde ve astenozoospermi bireylerde Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’ de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

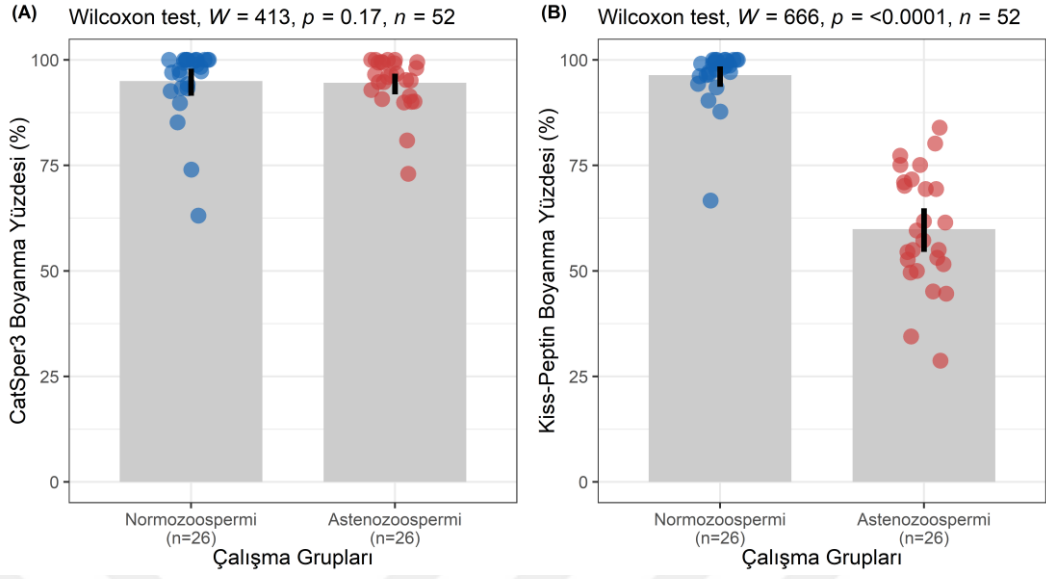
KISS1 ekspresyonu; normozoospermi bireylerde ve astenozoospermi bireylerde Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Genetik analizde CatSper3 (1.72 [IQR, 0.13 – 25.39] vs. 1.14 [IQR, 0.15 – 47.44]) ve KISS1R (68.02 [IQR, 17.98 – 195.32] vs. 88.84 [IQR, 30.38 – 403.13]) gen ifadeleri düzeylerinin normozoospermik ve astenozoospermik bireylerde benzer olduğu görüldü ($p>.05$).

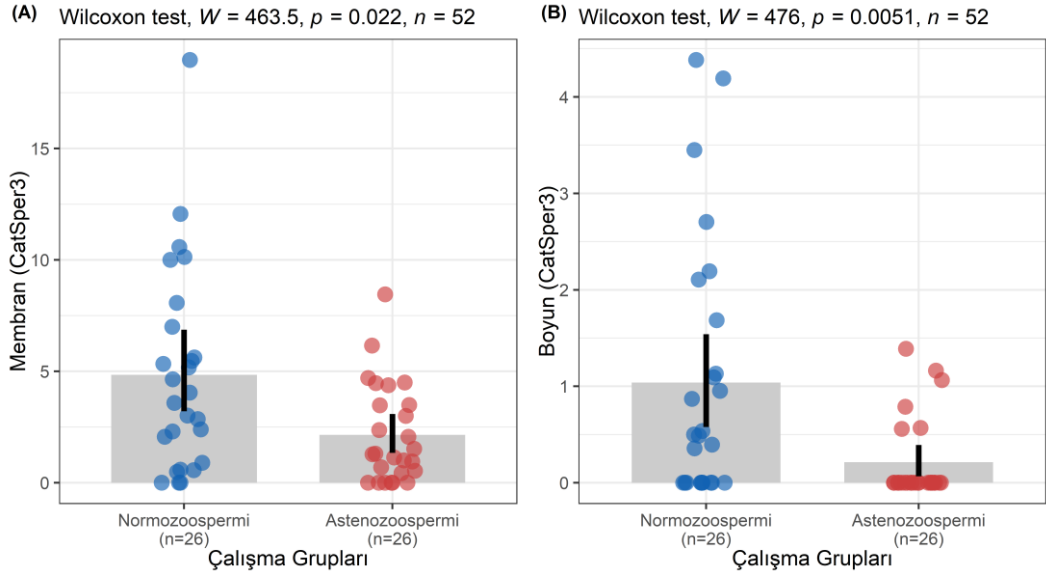
Tablo 3.1. Normozoospermi ve Astenozoospermi Bireylerde Catsper-3 ve Kiss-Peptin Düzeyleri

	Normozoospermi (n=26)	Astenozoospermi (n=26)	p- değeri
Sperm H. Sayısı	222.08 ± 93.68	182.15 ± 49.70	
Catsper3 işaretlenme (%)	95.00 ± 8.79	94.58 ± 6.33	.169
Baş	38.90 ± 21.32	42.61 ± 16.28	.255
Kuyruk	13.21 ± 16.07	10.27 ± 13.07	.905
Membran	4.84 ± 4.59	2.15 ± 2.22	.022
Baş ve Kuyruk	43.97 ± 20.14	44.24 ± 19.72	>.999
Boyun	1.04 ± 1.34	0.21 ± 0.42	.005
Boyun ve Baş	0.10 ± 0.28	0.05 ± 0.22	.629
Boyun ve Kuyruk	0.06 ± 0.33	0.00 ± 0.00	.336
Kiss-Peptin işaretlenme (%)	96.39 ± 6.82	59.89 ± 13.91	<.001
Baş	40.12 ± 12.46	62.51 ± 22.08	<.001
Kuyruk	8.82 ± 12.26	12.29 ± 13.57	.148
Membran	4.08 ± 4.38	1.69 ± 2.29	.005
Baş ve Kuyruk	46.22 ± 19.05	23.54 ± 23.59	<.001
Boyun	0.50 ± 0.96	1.38 ± 2.56	.336
Boyun ve Baş	0.29 ± 1.37	0.15 ± 0.63	>.999
Boyun ve Kuyruk	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-
CatSper3 gen ifadesi (×1000)	1.72 [0.13 – 25.39]	1.14 [0.15 – 47.44]	.964
KISS1R gen ifadesi (×1000)	68.02 [17.98 – 195.32]	88.84 [30.38 – 403.13]	.234

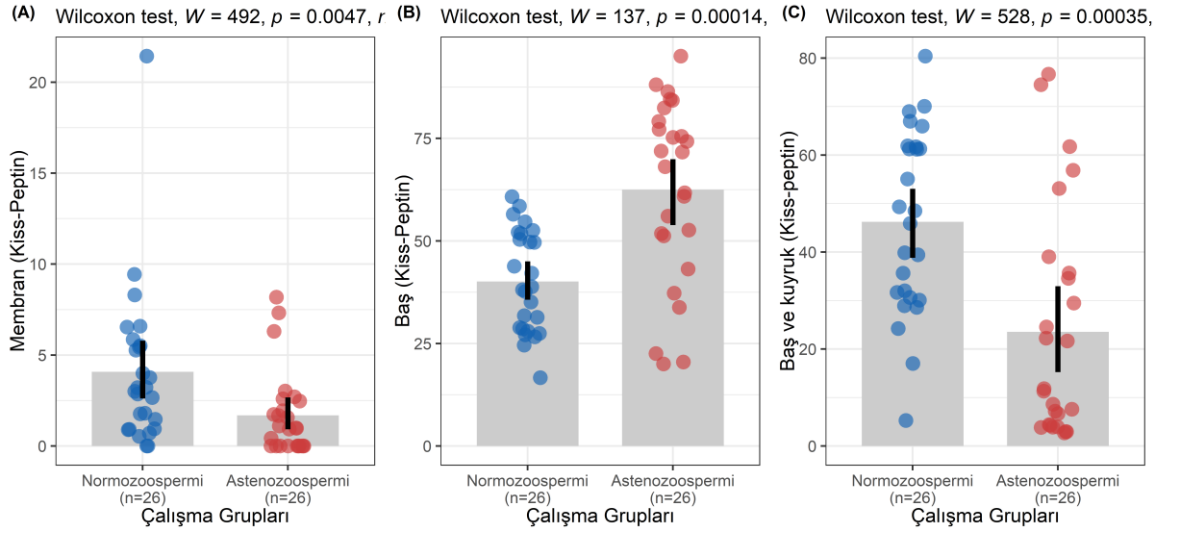
Veriler ortalama ± standart sapma veya medyan [çeyreklikler] olarak sunuldu.



Şekil 3.1. Çalışma gruplarında CatSper3 ve Kiss-Peptin boyanma yüzdelerinin dağılımını gösteren bar ve hata grafiği. Grafikteki siyah çizgiler ortalama ve %95 güven aralığı şeklinde sunulmuştur. Mavi noktalar normozoospermik kırmızı noktalar astenoospermik bireylere ait (A) CatSper3, (B) Kiss-Peptin düzeylerini gösterir. Wilcoxon testi eşleştirilmemiş Mann-Whitney *U* testini gösterir.



Şekil 3.2. Çalışma gruplarında CatSper3'ün membran ve boyunda boyanma yüzdelerinin dağılımını gösteren bar ve hata grafiği. Grafikteki siyah çizgiler ortalama ve %95 güven aralığı şeklinde sunulmuştur. Mavi noktalar normozoospermik kırmızı noktalar astenoospermik bireylere ait (A) CatSper3, (B) Kiss-Peptin düzeylerini gösterir. Wilcoxon testi eşleştirilmemiş Mann-Whitney *U* testini gösterir.



Şekil 3.3. Çalışma gruplarında Kiss-Peptin'in membran, baş ve baş-boyunda boyanma yüzdelерinin dağılımını gösteren bar ve hata grafiğı. Grafikteki siyah çizgiler ortalama ve %95 güven aralığı şeklinde sunulmuştur. Mavi noktalar normozoospermik kırmızı noktalar astenozoospermik bireylere ait (A) CatSper3, (B) Kiss-Peptin düzeylerini gösterir. Wilcoxon testi eşleştirilmemiş Mann-Whitney U testini gösterir.

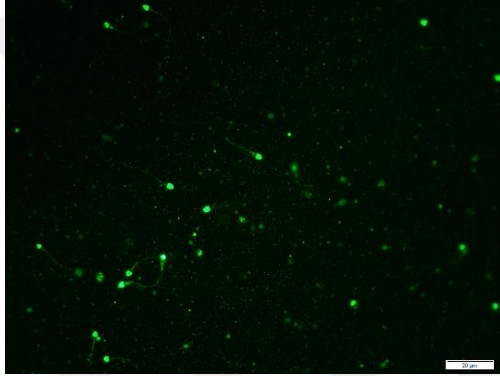
CATSPER 3

1. Grup Normozoospermi

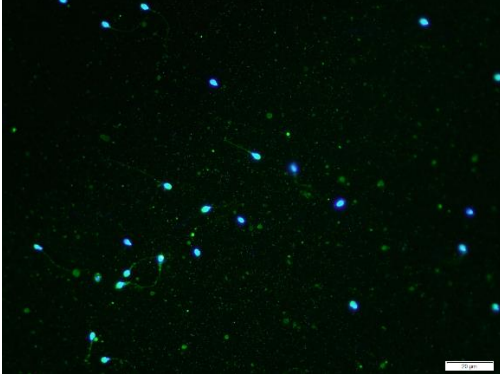
A.



B.



C.

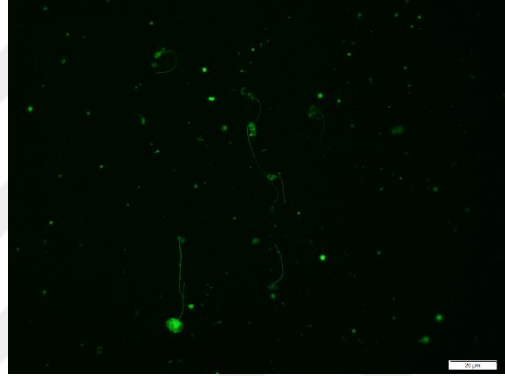


2. Grup Astenozoospermi

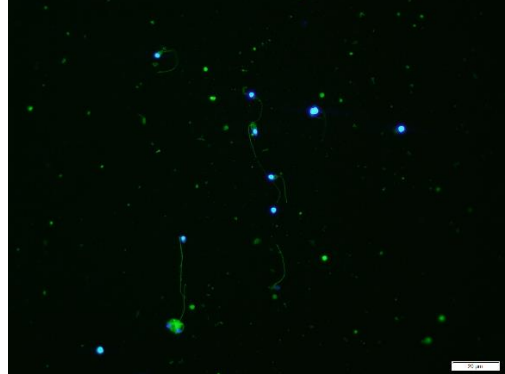
D.



E.



F.

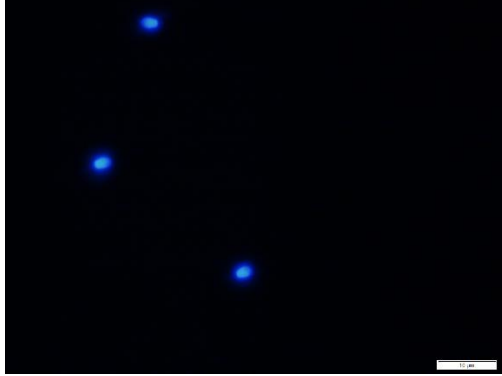


Şekil 3.4. Normozoospermi ve astenozoospermi gruplarında Catsper3 ekspresyonu: (A) Yeşil floresan izotiyosinat (FITC); sperm baş ve kuyrukta ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile işaretlenmiş sperm nükleusu. (C) A ve B görüntülemelerinin kombinasyonu. (D) Yeşil floresan (FITC); sperm baş ve kuyrukta ekspresyon görülmektedir. (E) DAPI ile işaretlenmiş sperm nükleusu. (F) D ve E görüntülemelerinin kombinasyonu. X40 büyütme (Ölçek 20 μ m).

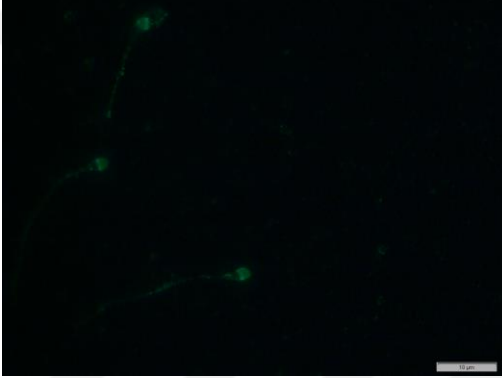
CATSPER3

1. Grup Normozoospermi

A.



B.

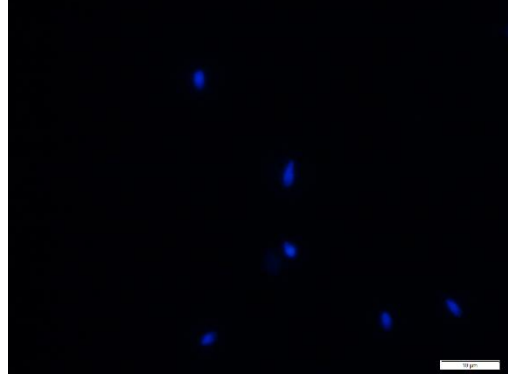


C.

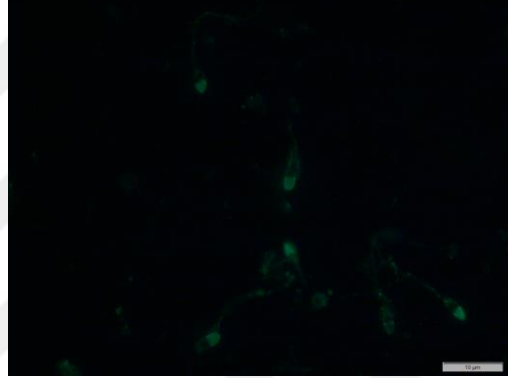


2. Grup Astenozoospermi

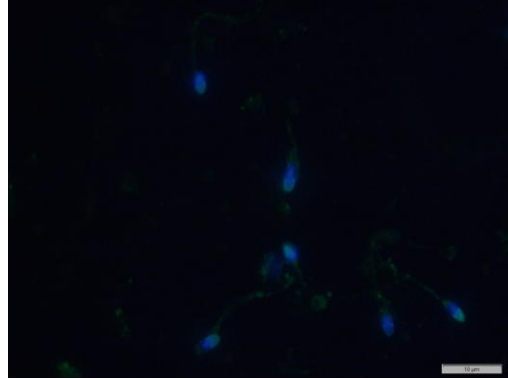
D.



E.



F.



Şekil 3.5. Normozoospermi ve astenozoospermi gruplarında Catsper3 ekspresyonu: (A) Yeşil floresan izotiyosinat (FITC); sperm baş ve kuyrukta ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile işaretlenmiş sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülemelerinin kombinasyonu. (D) Yeşil floresan (FITC); sperm baş ve kuyrukta ekspresyon görülmektedir. (E) DAPI ile işaretlenmiş sperm nukleusu. (F) D ve E görüntülemelerinin kombinasyonu. X100 büyütme (Ölçek 10 µm).

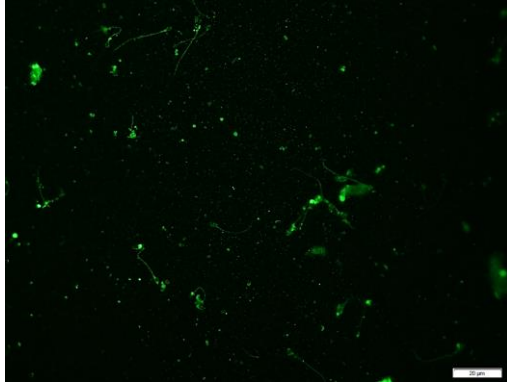
KISS 1

1. Grup Normozoospermi

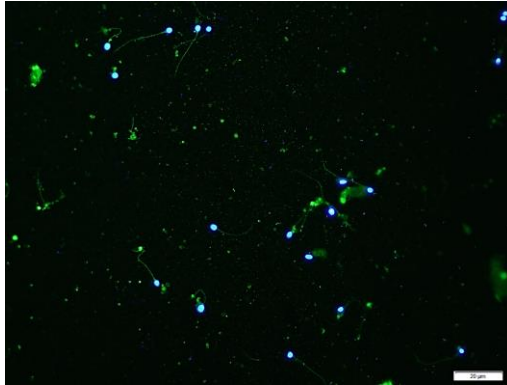
A.



B.



C.

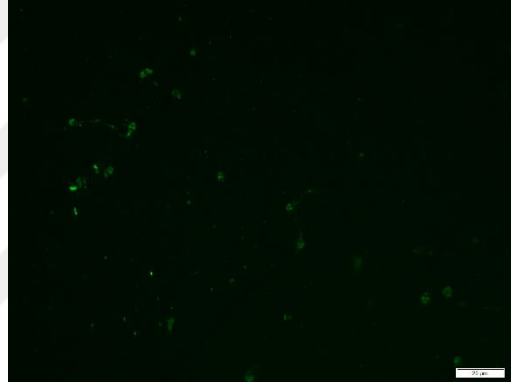


2. Grup Astenozoospermi

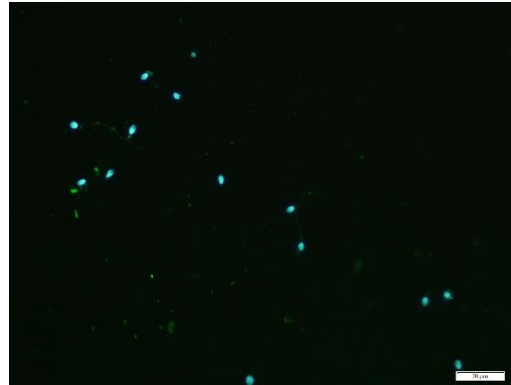
D.



E.



F.

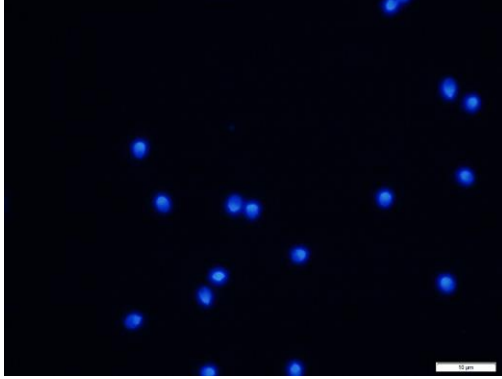


Şekil 3.6. Normozoospermi ve astenozoospermi gruplarında KISS1(Kiss-Peptin) ekspresyonu: (A) Yeşil (FITC); sperm baş ve kuyrukta ekspresyon görülmektedir. (B)DAPI ile işaretlenmiş sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülemelerinin kombinasyonu. (D) Yeşil floresan izotiyosinat (FITC); spermin baş, kuyrukta ekspresyonu görülmektedir. (E)DAPI ile işaretlenmiş sperm nukleusu. (F) A ve B görüntülemelerinin kombinasyonu X40 Büyütme (Ölçek 20 µm).

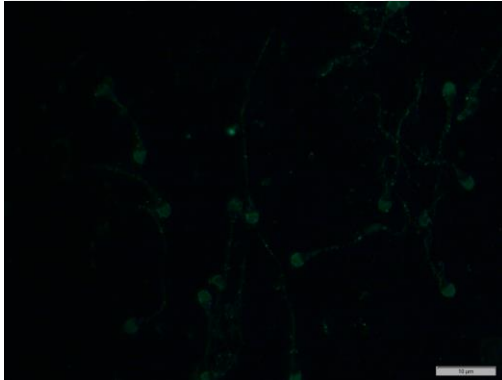
KISS 1

1. Grup Normozoospermi

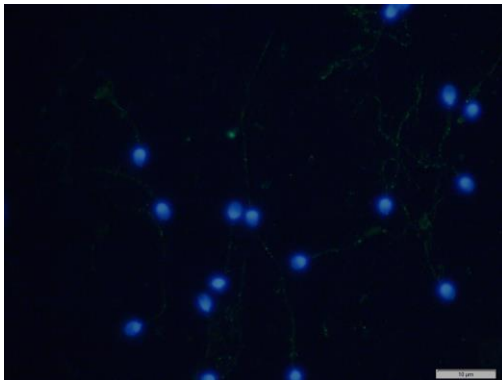
A.



B.



C.

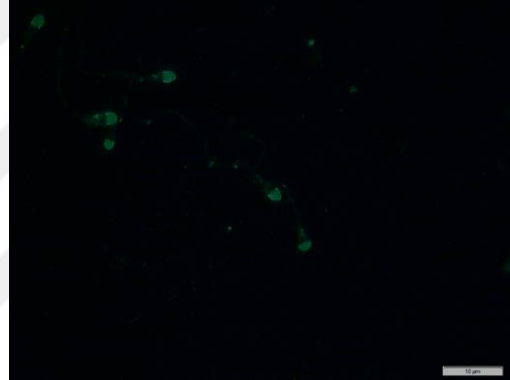


2. Grup Astenozoospermi

D.



E.



F.



Şekil 3.7. Normozoospermi ve astenozoospermi gruplarında KISS1 ekspresyonu:

(A) Yeşil floresan izotiyosinat (FITC); sperm baş ve kuyrukta ekspresyonu görülmektedir. (B) DAPI ile işaretlenmiş sperm nükleusu. (C) A ve B görüntülemelerinin kombinasyonu. (D) Yeşil floresan izotiyosinat (FITC); spermin baş bölgesinde ekspresyonu görülmektedir. (E) DAPI ile işaretlenmiş sperm nükleusu. (F) D ve E görüntülemelerinin kombinasyonu. X100 Büyütme.

4. TARTIŞMA

CatSper kanal ailesinden olan CatSper-3, erkek infertilitesinin araştırılmaya değer bir konusu olup, erkek infertilitesinin taranmasında bir potansiyele sahip olma yolunda önemli bir proteindir. (Tamburrino,2014) CatSper alt birimlerinin herhangi birinin dahi infertiliteye sebep olabileceği de bilinmektedir (Qi, H.,et al, 2007). Ayrıca Qi ve arkadaşları, fare ve insanlar arasındaki 4 CatSper alt ünitesinin genomik dizilimlerinin benzer olduğunu da göstermişlerdir. Bu bilgi, insan ve fare üzerinde yapılan çalışmaların birbiriyle kıyaslanabilmesini kolaylaştırmaktadır.

İnsanlarda CatSper kanallarının herhangi birinde meydana gelen mutasyonlar erkek infertilitesiyle ilişkilendirilmiştir (Avenarius, et al., 2009). Ancak bugüne kadar CatSper3 ve erkek infertilitesi hakkında yapılan çalışma sayısı çok azdır.

Qi ve arkadaşları, CatSper3 geni tarafından eksprese edilen proteinlerin hücre içi etkilerini bulmak adına CatSper3 içermeyen ayrı fare serilerini homolog rekombinasyonla silerek gözlemlemişlerdir. Bu gözlemleri sonucunda sadece CatSper-3 geninin yalnızca sperme spesifik olduğunu değil, ayrıca sperm hipermotilitesi için CatSper 4 alt ailesinin de ekspresyonunun gerekli olduğunu da bulmuşlardır. Bu gözlemlerinde CatSper3 olmayan spermelerde sperm hiperaktivitesinin kaybolduğunu in-situ hibridizasyon yoluyla tespit etmişlerdir. Biz de insan spermeleriyle yapmış olduğumuz çalışmamızda insanlarda sperm hareketinde bozukluk olan bireylerde özellikle CatSper3 proteininin eksik boyandığını ve yine genetik ekspresyonunun da az olduğunu gözlemledik.

Jin ve arkadaşları yine fare testis ve spermelerinde tüm CatSper alt aile protein ekspresyonlarını değerlendirmiş, diğer tüm kanal ekspresyonlarına ilaveten CatSper3 protein eksikliğinde sperm hiperaktif motilitesinde doğrudan azalma ve dolayısıyla erkek infertilitesinde artış gözlemlemişlerdir. Bu çalışmayı CatSper3 ve CatSper4 genleri susturulmuş farelerin analizi ve histolojik olarak da hematoksilin-eozin boyama ile hazırlanan testis ve epididim dokularında yapmışlardır.

Bu çalışma sonucunda CatSper3 susturulmuş olan farelerde spermatogenezin normal şekilde işlediği ancak oluşan spermelerde motilite kusurları olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızla kıyaslandığında paralel sonuçlar vermektedir. Nitekim çalışmamızda da motilite kusuru olan bireylerde CatSper3 ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

Nikpoor ve arkadaşlarının fare testisinde ve insan sperminde yaptığı çalışmada ise CatSper gen ekspresyonunun yokluğunda spermin motilitesinde bozukluklar gözlenmiştir. Çalışma testis dokusunun alınmış biyopsilerinin materyallerinin genetik olarak RT-PCR ile incelenmesi üzerinedir. Çalışmada iki temel sonuç bulunmuş olup bunlardan ilki fare seksüel olgunlaşması ile CatSper ekspresyonlarının gelişimsel olarak direkt ilişkili olduğu yönündedir. Diğer önemli bir sonuç ise sperm motilitesinde sorun olan bireylerde CatSper ekspresyonunun 3,5 kat daha az olduğu yönündedir. Yine bizim çalışmamız da bu sonuçları doğrulamaktadır. Çalışmamızda sperm motilitesi az olan erkek bireylerin spermelerinde daha az CatSper3 ekspresyonu gözlenmiştir.

Wang ve arkadaşları ise bir ailedeki infertilite nedeni olarak CatSper3 ekspresyon yetmezliğini düşünmüş, bu amaçla WES yapmış ve CatSper3 eksikliğine yönelik ICSI planlayarak sağlıklı bir gebelik elde etmeyi başarmıştır. İnfertiliteye 28 yaşında bir erkek sahip olmakta olup, herhangi başka bir genital defekti veya kromozomal anomalisi mevcut değildir. Ancak bireyde homozigot CATSPER3 mutasyonu gözlenmiştir. Çalışma sonucunda sağlıklı bir fertilizasyon ve gebelik sağlanmış olup, bu çalışma CATSPER3'e yönelik ilk ICSI çalışması olarak kayıtlara geçmiştir. Her ne kadar çalışma ICSI için net bir endikasyon olmadan yapılmış ve yine popülasyonu çok dar ve bir bireyle sınırlandırılmış olsa da bu çalışma CatSper3 ekspresyon eksikliği olmayan spermelerin ICSI ile fertilizasyonunun olması açısından değerli bir çalışma olup yine çalışmamızı destekler niteliktedir.

Hildebrand ve arkadaşları 2010'da yayımladıkları çalışmada kalsiyum yolaklarını, kalsiyum kanallarını ve bu yapıların sperm motilitesi ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmada kalsiyumun; kalsiyum kanallarının ve yolakların aktivasyonu arttırması ile sperm motilitesini arttırdığını ve böylece kalsiyum kanallarının ve yolaklarının sperm motilitesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kalsiyum kanallarından biri olan CatSper3'ün ekspresyonunu inceledik ve sperm hareketliliğine ilişkisini araştırdık. Sperm hareketlilik kusuru olan bireylerde CatSper3'ün, normal sperm hareketliliğine sahip bireylerden daha düşük ifade edildiğini saptadık. Bu doğrultuda Hildebrand ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada her ne kadar sadece CatSper3 bakmamış olsalarda bu molekülünde bir kalsiyum kanalı olması göz önünde bulundurulduğunda elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda, kalsiyum kanallarının sperm motilitesi ile ilişkili olabileceği konusunda çalışmamızı destekler niteliktedirler.

KISS1-R geninin proteini olan KISS1 reseptörü, testiste eksprese olmakta olup, bir çalışmada KISS1 reseptörünün esas olarak salgı epitelyal hücrelerinde ve myoid hücrelerde olmasının ortaya çıkmasıyla, sadece hipotalamo-hipopitüiter aksta değil, aynı zamanda sperm matürasyonunda ve motilitesinde de rol oynadığını düşündürmektedir (Gloria ve ark., 2021).

Ancak yine Catsper3 proteini ve motilite arasındaki ilişkide olduğu gibi KISS1R ve semen motilitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen makaleler de literatürde çok kısıtlıdır.

Zou ve arkadaşları, seminal plazmada KISSPeptin oranının yüksekliği ile semen kalitesi arasında yüksek bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. 666 örnekte yaptıkları çalışmada özellikle sperm motilitesi ile KISSPeptin seviyeleri arasında yüksek bir korelasyon gözlemlemişlerdir. İnsan sperminde yaptığımızda çalışmada bizde bu çalışma ile paralel sonuçlar elde ettik. Verilerimize göre motilitesinde düşüklük olan bireylerde KISSPeptin ekspresyonunun normal motiliteye sahip olan bireylere oranla daha düşük olduğunu gözlemledik.

Mele ve arkadaşları, epididimde spermatozoaların transit trafiğiyle ilgili olarak ratlarda yaptıkları çalışmada testis ve epididimisi diseke edip elde ettikleri materyali hem total protein ekstraksiyonu yoluyla hem Western Blot yoluyla hem de hematoksinle ve eozinle boyayarak immünohistokimyasal yolla incelemişlerdir. Bu çalışmada kaput ve kauda kısımlarında spermde kisspeptin ve KISS1 reseptörünü izole etmiş ve görüntülemişlerdir. Bu çalışma ayrıca sperm matürasyon ve motilitesinin sağlanmasında KISS1 ve KISS1R ekspresyonlarının önemli olduğunu açığa çıkarmıştır. Nitekim bizde çalışmamızda immunfloresan ve gen ifade analizleri ile motilite kusuru olan bireylerde normal motiliteye sahip bireylere oranla KISS1 ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

Geng ve arkadaşları ise KISS1R defektif varyantlarını araştırmış, bu çalışmada ekzom Sanger dizimi ile 3 tane heterozigot missense varyant tanımlamışlardır. 200 hastayla yapılan bu çalışmada bu 3 varyant sekans veri tabanlarınca muhtemelen patojen olarak yorumlanmış, bu sonuçla KISS1R'nin defektinin yine patolojik sonuçlara yol açarak motilitede defektler oluşturabileceği savunulmuştur. Çalışmamızda sperm hareketliliği az olan bireylerde özellikle hareket için önemli olan bölgelerde, normal bireylere oranla ekspresyon azlığını gözlemledik.

Yine Hsu ve arkadaşları, KISS1R'nin nerede lokalize olduğunu, immünohistokimyasal ve immünofloresan boyama metotlarıyla araştırmış, KISS1R'nin spermatitler ve olgun spermatozoanın akrozomunda eksprese edildiğini bulmuştur. Ayrıca fluo-4 yüklü spermde kisspeptin-10 tedavisinde yanıt olarak sperm içinde kalsiyum konsantrasyonlarının önemli ölçüde arttığını gözlemlemişlerdir. Böylece çalışmada hem KISS1R'nin spermde eksprese edildiğini hem bu ekspresyonun eksikliğinde kisspeptin analogları verilerek spermin tedavi edilebileceğini ve böylece IVF ihtiyacının daha da azalabileceğini, hem de bu sistemin motilite ve matürasyonda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. İncelenen konu alanında değerli ve önemli bir araştırmadır. Yaptığımız çalışmamızda ise KISS1'in özellikle baş bölgesinde ekspre olması ve sperm azlığı bulunan bireylerde daha az ekspre olmasını gözlemlememiz yönüyle çalışmalar birbirini destekler niteliktedirler.

Bedford ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; insan sperminde KISS1-KISS1R'nin ifadesini ve spermdeki yerleşimlerinin dağılımını incelemişlerdir. İmmünofloresan işaretleme yöntemi ile incelemesi yapılan moleküllerin en çok ekvatorial segmentte olduğunu saptamışlardır. Ekvatorial segment spermin baş bölgesinde bulunmaktadır.

Çalışmamızda spermde bu molekülün baş bölgesinde özellikle fazlaca ifade edildiğini göstermiştir. Bu bilgiler ışığında Bedford ve ark. yaptığı çalışmada, çalışmamızı desteklediği görülmektedir.

Yine Flesh ve Gadella ise yaptıkları çalışmalar sonucunda KISS1-KISS1 Reseptörünün spermin ekvatorial segmentinde bulunduğunu belirtmişlerdir. Baş bölgesinde ekspresyonunun özellikle fazla olduğunu saptadığımız KISS1 için bu çalışmada bizim çalışmamızı destekler veriler sunmaktadır.

Bedu-Addo ve diğerkleri yayımladıkları çalışmaları KISS1 ve KISS1-reseptörünün Sperm hareketinin kontrolünde görevli bölge olan orta segment yani flagellum bölgesinde ekspre olduğunu belirtmişler.

Aynı şekilde Puplicove ve diğerkleri aynı yıl içinde yayımladıkları çalışmada KISS1'in flageller aktivasyon için önemli bölgelerinde olan spermin orta bölgesinde ifade edildiğini saptamışlardır. Yapılan bu iki çalışmada, çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ile paralellik göstermektedir.

Pinto ve arkadaşlarının yaptığı çalışma KISS1 ve KISS1 Reseptörünün gen ekspresyonuna baktıkları bir karakterizasyon çalışmasıdır. Araştırmalarda KISS1 ve KISS1-R; Sertoli hücrelerinde, spermin diğerk germ serilerinde gen ifadelerinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca spermdeki kalsiyum seviyelerini de incelemişlerdir.

Çalışma sonucunda bu moleküllerin spermin özellikle baş, boyun ve kuyruk kısmında lokalize olduğunu saptamışlardır. Yaptığımız çalışmamızda KISS1 için insan sperminde yerleşim dağılımının özellikle baş ve kuyruk bölümünde ekspre olduğunu saptadık. Bu yönden bu çalışma yine çalışmamızı desteklemektedir.

Yine Pinto ve arkadaşları çalışmalarında örneklere KISS1 uygulaması yapmışlardır ve uygulama sonucunda spermin progresif motilitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Bizde çalışmamızda astenozoospermi yani sperm hareketlilik kusuru bulunan bireylerde; KISS1 ifadesinin, normozoospermi birey yani normal sperm hareketliliğine sahip bireylere göre daha az ekspre olduğunu saptadık. Böylelikle bu çalışma iki araştırma yönünden de çalışmamızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda son olarak elde edilen verilere bakıldığında CatSper3 ve KISS1'in ekspresyonlarının, sperm motilitesi ile ilişkili olduğu tespit edildi. İki grup açısından bakıldığında CatSper3'ün özellikle boyun ve membran bölgesinde az ekspre olduğunu gözlemledik.

KISS1'in ekspresyonunun incelenmesinde sperm motilitesi düşük olan bireylerde total boyanma yüzdesi bakımından anlamlı bir azalma tespit ettik. Lokalizasyon açısından yapılan incelemede; KISS1 ekspresyonunun spermin baş bölgesinde, sperm hareket kusuru olan bireylerde normal motiliteye sahip bireylere göre daha fazla olduğunu gözlemledik. Bunun yanı sıra Astenozoospermi bireylerde

spermin baş-kuyruk bölgesinde ekspresyonunda normal motiliteli spermlere oranla anlamlı olarak bir azalma olduğunu tespit ettik. Motilite azlığı olan bireylerde normozoospermi bireylere göre baş bölgesinde KISS1'in ekspresyonunun fazlalığının ise; spermin hareketinde önemli yeri olan bu molekülün; kuyruk bölgesinde az ekspresyonu olması ve bundan dolayı baş bölgesine gönderilen bir sinyal mekanizmasıyla baş bölgesinde bu molekülün üretim uyarıları sonucunda oluşan bir feedback mekanizması olabilir mi sorusunu akıllara getirmektedir.

Bu alanda yapılan çalışmaların kısıtlı olması sebebiyle hem CatSper3 hem de KISS1'in sperm motilitesindeki görevinin ve oynadığı rolü tam anlamak için özellikle, insan sperminde yeni ve detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız G proteine bağlı bir reseptör olarak fosfolipaz C'nin aktivasyonu aracılığı ile Ca^{2+} salınımını sağlayan KISS1 ve onun etkinliğine aracılık eden reseptörü olan KISS1R'nin aynı zamanda spermdeki kalsiyum katyon kanallarından CatSper3'ün insan sperminde varlığını ve lokalizasyonu ortaya koydu. KISS1 proteinin ve CatSper3'ün özellikle spermiumun baş kısmında ve kuyruk bölgesinde bulunduğunu tespit ettik.

Catsper-3 toplam boyanma yüzdeleri incelendiğinde, bölgesel işaretlenmelerde normozoospermik bireylerde membran ve boyunda CatSper3 ekspresyonunun astenozoospermik bireylerden daha yüksek olduğu görüldü.

KISS1 toplam boyanma oranlarının semen parametrelerinden motilite ile ilişkili olduğunu; astenozoospermi bireylerde KISS1'in normozoospermi bireylere göre baş-kuyruk lokalizasyonunda ekspresyonunun anlamlı düzeyde azaldığını, öte yandan baş bölgesinde Kiss-peptin boyanma yüzdelerinin normozoospermik bireylerde astenozoospermik bireylere göre anlamlı şekilde düşük olduğunu tespit ettik.

Bu sonuçlar ışığında KISS1'in astenozoospermik bireylerde baş bölgesinde normozoospermi bireylere göre daha fazla ekspre olmasının nedeninin kuyrukta hareketlilik için yeterli miktarda Kiss-peptin proteini eksikliğinden, baş bölgesinde üretimin arttırılmasına yönelik bir feedback mekanizmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. KISS1'in hareketlilik sağlayan kuyruk kısmında daha az ekspre olmasına bağlı olarak düşük motiliteye neden olduğunu gözlemledik. Ancak sperm sayısı ile bir ilişkisini tespit etmedik.

Ancak literatürde CatSper3 ile ilgili yayınların çok az olması sebebiyle özellikle sperm motilitesine etkisinin inceleneceği çalışmaların; CatSper3 yolunun sperm parametrelerinin incelendiği daha çok çalışma gerekmektedir. Ayrıca yine az sayıda olan Kiss-Peptin'in ile ilgili semen kalitesi alanında yapılan çalışmaların oldukça değerli olduğu, özellikle sperm motilitesine yönelik yapılan çalışmaların sperm hareketliliğine etki eden mekanizmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak çalışmamız kalsiyum kanallarından CatSper3'ün spermin baş, kuyruk, boyun bölgelerinde ekspre olduğunu ve sperm motilitesinde rolünün olduğunu göstermektedir. KISS1'in insan sperminde ekspresyonunun baş, boyun ve kuyruk kısmında ifade edildiğini ve kaliteli sperm motilitesi açısından gerekli olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır. Bütün bu bilgilerden yola çıkarak CatSper3 ve KISS1 sperm hareketliliği için gerekli olmakla birlikte, erkek infertilitesinin belirlenmesinde temel moleküller olarak kullanılabilirler. Ayrıca erkek infertilitesinde ilgili tanı için uygulanacak yeni tedavi ve yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.



6. KAYNAKLAR

- Abraham L. Kierszenbaum., 2021 Çev. Ed. Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye giriş. Ankara, Palme Yayıncılık. P.660-611
- Bedford, J.M., Moore, H.D., ve Franklin, L.E. (1979). Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp Cell Res.* 119 (1), 119- 126.
- Bedu-Addo, K., Costello, S., Harper, C., Machado-Oliveira, G., Lefievre, L., Ford, C., Barratt, C., ve Publicover, S. (2008). Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm--a mechanism for regulation of flagellar activity. *Int J Dev Biol.* 52 (5-6), 615- 626.
- Castano, J.P., Martinez-Fuentes, A.J., Gutierrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., ve Malagon, M.M. (2009). Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides.* 30 (1), 10- 15.
- Chung, Navarro,et.al , A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa, 2011.Nature Communications, 11: 2: 153
- Constantin, S., Caligioni, C.S., Stojilkovic, S., ve Wray, S. (2009). Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology.* 150 (3), 1400-1412.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., Trevino, C.L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev.* 91:1305-55.
- Gadella, B.M. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci.* 107 (3-4), 229-236.
- Geng D, Zhang H, Liu X, et al., 2020. Identification of KISS1R gene mutations in disorders of non-obstructive azoospermia in the northeast population of China. 34, 4.
- Gillian P. Johnson, Anne-Marie English, Sinead Cronin, David A. Hoey, Kieran G. Meade5and Sean Fair,2017. Genomic identification, expression profiling, and functional characterization of CatSper channels in the bovine. 15:128
- Gloria, A.; Contri, A.; Mele, E.; Fasano, S.; Pierantoni, R.; Meccariello, R. 2021. Kisspeptin Receptor on the Sperm Surface Reflects Epididymal Maturation in the Dog. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 10120.
- Hassa H, 2003. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. In: Spermatogenez. Eds. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi yayınları OGÜ Basımevi. 1, 418.
- Hildebrand, M.S., Avenarius, M.R., Fellous, M., Zhang, Y., Meyer, N.C., Auer, J., Serres, C., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Beckmann, J.S., ve Smith, R.J. (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet.* 18 (11), 1178- 1184.
- Hsu, M.-C., Wang, J.-Y., Lee, Y.-J., Jong, D.-S., Tsui, K.-H., & Chiu, C.-H. (2014). Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. *Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. SRF*, 147:6, 835–845.
- Jean-Ju Chung^{1,2}, Betsy Navarro^{1,2}, Grigory Krapivinsky^{1,2}, Luba Krapivinsky^{1,2} & David E. 2011. Clapham^{1,2} A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. 15-25.
- Jin, J., N. J. (2007). Catsper3 and Catsper4 Are Essential for Sperm Hyperactivated Motility and Male Fertility in the Mouse. *Catsper3 and Catsper4 Are Essential for Sperm Hyperactivated Motility and Male Fertility in the Mouse. SSR*, 77(1),37–44.
- Kaur G, Thompson LA, Dufour JM, 2014. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 30, 36-44.
- Kotani, M., Dethoux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyllesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., ve Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. 276 (37), 34631-34636.

- Lamprecht, S.A., ve Lipkin, M. (2001). Cellular mechanisms of calcium and vitamin D in the inhibition of colorectal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 952, 73-87.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., ve Welch, D.R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 88 (23), 1731-1737.
- Liu, J., Xia, J., Cho, K. H., Clapham, D. E. & Ren, D., 2007. CatSper β , a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. *J.* 282.
- Loughlin KR, 2012. Changes in male fertility in the last two decades. *The Urologic Clinics of North America*, 39, 1, 33-6.
- Mei, H., Doran, J., Kyle, V., Yeo, S.H., ve Colledge, W.H. (2013). Does Kisspeptin Signaling have a Role in the Testes? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4, 198.
- Mele, E.; D'Auria, R.; Scafuro, M.; Marino, M.; Fasano, S.; Viggiano, A.; Pierantoni, R.; Santoro, A.; Meccariello, R. 2022. Differential Expression of Kisspeptin System and Kisspeptin Receptor Trafficking during Spermatozoa Transit in the Epididymis.13, 295.
- Mescher, Anthony, L.2019. Çev. Ed. Solakoğlu S., Erdoğan A., Mutlu H.S. *Junqueira Temel Histoloji. Güneş Tıp Kitabevleri*, (14), 574.
- Min, L., Soltis, K., Reis, A.C., Xu, S., Kuohung, W., Jain, M., Carroll, R.S., ve Kaiser, U.B. (2014). Dynamic kisspeptin receptor trafficking modulates kisspeptin-mediated calcium signaling. *Mol Endocrinol.* 28 (1), 16-27.
- Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., ve Harrison, D.C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 276 (31), 28969-28975.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., ve Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a Gprotein-coupled receptor. *Nature.* 411 (6837), 613-617.
- Pampillo, M., Camuso, N., Taylor, J.E., Szereszewski, J.M., Ahow, M.R., Zajac, M., Millar, R.P., Bhattacharya, M., ve Babwah, A.V. (2009). Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and β -arrestin. *Mol Endocrinol.* 23 (12), 2060-2074.
- Parvaneh Nikpoor, S. Javad Mowla, Mansoureh Movahedin, S. Amir-Mohsen Ziaee and Taki Tiraihi, 2004. CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deicient sperm motility, *Human Reproduction Vol.19, No.1, 124±128.*
- Pinto, F.M., Cejudo-Roman, A., Ravina, C.G., Fernandez-Sanchez, M., Martin-Lozano, D., Illanes, M., Tena-Sempere, M., ve Cadenas, M.L. (2012). Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *Int J Androl.* 35 (1), 63-73.
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., ...&Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4)1219-1223.
- Ringel, M.D., Hardy, E., Bernet, V.J., Burch, H.B., Schuppert, F., Burman, K.D., ve Saji, M. (2002). Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 87 (5), 2399.
- Rogers K, 2010. *The Reproductive System*, Britannica Educational Pub., P. Rommerts F, Brinkman A, 1981. Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells. *Molecular Cellular Endocrinology*, 21, 1, 15-28.
- Ross, Michael H. WP, 2017. Çev. Ed. Baykal B. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas Palme Yayınevi.* 6, 972.
- Singh, A.P. and S. Rajender, CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online*, 2015. 30(1): p. 28-38.

- Stafford, L.J., Xia, C., Ma, W., Cai, Y., ve Liu, M. (2002). Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res.* 62 (19), 5399-5404.
- Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., ve Diekman, A.B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 53 (1-2), 133-150.
- Wahab, F., Atika, B., Shahab, M., ve Behr, R. (2016). Kisspeptin signalling in the physiology and pathophysiology of the urogenital system. *Nat Rev Urol.* 13 (1), 21-32.
- Wang J, Tang H, Zou Q, et al., 2021. Patient with CATSPER3 mutations-related failure of sperm acrosome reaction with successful pregnancy outcome from intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Mol Genet Genomic Med.* 9, 1579.
- WHO, 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. (5).
- WHO, 2021. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. (6).
- Zhang, C., Roepke, T.A., Kelly, M.J., ve Ronnekleiv, O.K. (2008). Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. *J Neurosci.* 28 (17), 4423-4434.
- Zheng, L. P., Wang, H. F., Li, B. M., & Zeng, X. H. (2013). Sperm-specific ion channels: targets holding the most potential for male contraceptives in development. *Contraception*, 88(4), 485-491.
- Zou, P., Wang, X., Chen, Q., Yang, H., Zhou, N., Sun, L., . . . Cao, J. (2019). Kisspeptin Protein in Seminal Plasma Is Positively Associated with Semen Quality: Results from the MARHCS Study in Chongqing. 9-1.

7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı



8. TURNİTİN

İnsan Sperminde Kisspeptin ve Sperm Katyon Kanallarının (Catsper) Birbirleriyle Olan İlişkisi

ORJİNALLİK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**4**

2

acikerisim.omu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

3

acikerisim.erbakan.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

4

jag.journalagent.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

journals.plos.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

Fatma Zehra Erbayram, Esmâ Menevse, Duygu Dursunoglu. "Semen testis expressed protein 101 and spermatid-specific thioredoxin reductase 3 levels may be biomarkers in infertile male", Turkish Journal of Biochemistry, 2021

Yayın

<%**1**

7

www.hastane.selcuk.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
9	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
10	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
11	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
12	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
13	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
14	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
15	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<% 1
16	Herrero, M.B.. "Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization", Developmental Biology, 20050801 Yayın	<% 1
17	www.jinekolojivegebelik.com İnternet Kaynağı	<% 1

www.picmonic.com

18	İnternet Kaynağı	<% 1
19	Adiba Aasif, Roshan Alam, Haseeb Ahsan, Mohammad Mustufa Khan, Arshiya Khan, Saba Khan. "The role of kisspeptin in the pathogenesis of a polycystic ovary syndrome", Endocrine Regulations, 2023 Yayın	<% 1
20	openaccess.iste.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
21	Zhe Zhang, Yuzhuo Yang, Han Wu, Hongliang Zhang et al. "Sodium-Hydrogen-Exchangerexpression in human sperm and its relationship with semen parameters", Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2017 Yayın	<% 1
22	acikerisim.demiroglu.bilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
23	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
24	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
25	emissc.org İnternet Kaynağı	<% 1
26	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1

9. ÖZGEÇMİŞ



