

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ASTENOZOOSPERMİK İNFERTİL ERKEKLERDE SİGARA
İÇİCİLİĞİNİN AKAP4, SEMG1-2, KLK2 PROTEİNLERİNE
ETKİSİ

Dr. Özgür ÖZBEK

Üroloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2022

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ASTENOZOOSPERMİK İNFERTİL ERKEKLERDE SİĞARA
İÇİCİLİĞİNİN AKAP4, SEMG1-2, KLK2 PROTEİNLERİNE ETKİSİ

Dr. Özgür ÖZBEK

Üroloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI

Doç. Dr. İyimser ÜRE

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Projeleri
Koordinasyon birimi tarafından TTU-2021-1602 nolu proje kapsamında
desteklenmiştir.

ESKİŞEHİR

2022

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

**ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĐI'NA**

Dr. Özgür ÖZBEK'e ait "Astenozoospermik erkeklerde sigara içiciliğinin AKAP4, SEMG1-2, KLK2 proteinlerine etkisi" adlı çalışma jürimiz tarafından Üroloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:/..../....

Jüri BaŐkanı

Doç. Dr. İyimser ÜRE
Üroloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Yunus Saim Cavit CAN
Üroloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Aydın YENİLMEZ
Üroloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun/...../.....
Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıŐtır.

Prof.Dr.Atilla Özcan ÖZDEMİR
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı'nda asistanlık eğitimime başladığım günden bu yana, bana bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Cavit CAN'a, Prof. Dr. Aydın Yenilmez'e, Doç. Dr. İyimser ÜRE'ye, Dr. Öğr. Üyesi Ata ÖZEN'e, Uzm. Dr. Mete ÖZKIDIK'a teşekkür ederim. Asistanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalanma şansını bulduğum, daha sonra emekli olan Prof. Dr. Turgut DÖNMEZ'e teşekkürü borç bilirim. Asistanlık eğitimim boyunca hem eğitimden sorumlu hocalığımı hem tez danışman hocalığımı yeri geldiğinde de abi gibi yaklaşan ve benden desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. İyimser ÜRE'ye minnetlerimi sunarım. Yine asistanlık eğitimim boyunca eğitim ve öğretim vazifesi dışında dertlerimizi dinleyen, çoğu zaman hocadan çok abi olarak bizlerle konuşan, yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi. Ata Özen'e ayrıca teşekkür ederim. Tez sürecimde kilit rol oynayan Üreme Sağlığı Merkezi çalışanlarına özellikle Filiz GÜNAL'a, projenin oluşturulmasında büyük katkıları olan ve her türlü yardımı sağlayan ESOGÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi. Evin KOCATÜRK'e ve Arş. Gör. Dr. Betül CAN'a, ayrıca tez sürecimde, istatistik bilgisi ile katkıda bulunan ESOGÜ Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Ertuğrul ÇOLAK'a ve tabi ki projenin başlamasını sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimine teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini her zaman arkamda hissettiğim, tüm zorluklarda sabırla yanımda olan sevgili ailem, eşim ve değerli ekip arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

ÖZET

Özbek, Ö. Astenozoospermik Erkeklerde Sigara İçiciliğinin AKAP4, SEMG1, SEMG2, KLK2 Proteinlerine Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2022.

Astenozoospermi dünya genelinde yaklaşık 50-80 milyonu etkileyen erkek infertilitesinin önemli sebeplerinden birisidir. Bu çalışmada astenozoospermiyi ve sperm motilitesini etkileyen faktörler arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı. Çalışmaya alınan hastalar 3 gruba ayrıldı. İlk grup sigara içen astenozoospermi hastalarından oluşuyordu. İkinci gruba ise sigara içmeyen astenozoospermi hastaları dahil edildi. Üçüncü grup da normospermik hastalardan oluşuyordu. Hasta grupları etiyolojik olarak astenozoospermiyi açıklayacak bir sebebi olmayan ve infertilite şikayeti ile başvuran kişilerdi. Her 3 grupta da yaş, fertilitate öyküsü, sigara kullanım öykülerine dair veriler kayıt edildi. Bütün hastalara standart fizik muayene yapıldı. Semen analizi, hormon paneli (FSH, LH, Prolaktin, Testosteron, Estradiol) ve semen analizinden elde edilen sperm örneklerinden AKAP4, SEMG1, SEMG2 ve KLK2 proteinleri incelendi. Çalışmamızda sperm sayısının, motilitenin ve ileri motilitenin en fazla sigara kullanımı olan grupta etkilendiği görüldü. Bir diğer bulgu ise yaş ile motilite arasındaki negatif ilişki olmasıydı. Gruplar arasında sperm örneklerinden elde edilen ve motilite ile ilişkili proteinler arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken özellikle AKAP4 proteinin sigara kullanımı olan grupta daha düşük eksprese edilmesi sigaranın yarattığı oksidatif stres ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. SEMG proteinlerinin viskozite ile ilişkili olması nedeniyle ejakulat hacmi ile arasında anlamlı bir ilişki bulundu. Yapılan çalışmalara rağmen sigaranın oksidatif stres dışında hangi mekanizmalarla motiliteyi etkilediği bilinmemektedir. Sonuç olarak astenozoospermik hastalarda sperm örneklerinden elde edilecek proteinler yardımıyla altta yatan neden gösterilerek infertilite tedavisi daha kapsamlı ve doğru yapılacaktır.

Anahtar Kelimeler : İnfertilite, Astenozoospermi, Sigara, Seminal Protein

ABSTRACT

Ozbek, O. The Effect of Smoking on AKAP4, SEMG1, SEMG2, KLK2 Proteins in Asthenozoospermic Men. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Urology Department Residency Thesis Eskişehir, 2022.

Asthenozoospermia is one of the important causes of infertility affecting approximately 50-80 million men worldwide. In this study, we aimed to investigate the association between asthenozoospermia and the factors affecting sperm motility. The patients enrolled into the study were divided into 3 groups. First group was consisted of asthenozoospermia patient who smoke. In the second group asthenozoospermia patients without smoking were included. And the third group was the control group with normospermia patient. The patient groups were those who had no etiological reason to explain asthenozoospermia and had infertility complaints. In all 3 groups age, history about fertility, smoking were recorded. They were all underwent to standart physical examination. Semen analysis, hormone panel (FSH, LH, Prolactin, Testosterone, Estradiol) and AKAP4, SEMG1, SEMG2 and KLK2 proteins from sperm samples obtained from semen analysis were examined. In our study, we found that sperm count, motility and advanced motility were significantly affected in the smoking group. Another finding was the inverse relationship between age and motility. There was no significant difference between the motility-related proteins obtained from sperm samples between the groups, but the lower expression of AKAP4 protein in the smokers group suggested that it may be associated with oxidative stress caused by smoking. Since SEMG proteins are associated with viscosity, a significant correlation was found with ejaculate volume. As a result, infertility treatment may be more comprehensive and accurate by showing the underlying cause with the help of proteins obtained from sperm samples in asthenozoospermic patients.

Key Words: Infertility, Asthenozoospermia, Smoking, Seminal Protein

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Üreme Fizyolojisi	3
2.2. Erkek Üreme Organı	4
2.3. Spermatogenez	5
2.4. Spermiyogenez	6
2.5. Spermatogenezdeki Hormonal Düzen	7
2.6. Spermin Yapısı	8
2.7. Sperm Motilitesinin Fizyolojisi	9
2.8. Motilite üzerine etkili diğer proteinler	10
2.8.1 A-kinaz bağlayıcı proteinler (AKAP)	10
2.8.2 Semenogelin (SEMG)	11
2.8.3 Kallikrein ile ilişkili peptidazlar (KLK)	11
2.9. Sperm DNA hasarı ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	12
2.9.1. Lipid Peroksidasyonu (LPO)	13
2.9.2. Sperm DNA Fragmantasyonu	13
2.9.3. Germ hücre ölümü	14
2.10. Antioksidanlar	15
2.10.1. Enzimatik Antioksidanlar	15
2.10.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	16

2.11. ROS'un Kaynakları	17
2.11.1 Endojen Kaynaklar	17
2.11.2 Eksojen Kaynaklar	18
2.12. Semen genel yapısı ve analizi	20
2.13. İnfertilitenin tanımı ve önemi	23
2.14. İnfertil erkeğin değerlendirilmesi	23
2.15 Astenozoospermi	26
2.15.1 Astenozoosperminin değerlendirilmesi	26
2.15.2 Astenozoosperminin bilinen nedenleri	26
2.16 İnfertil erkeğin tedavisi	30
2.16.1 Bilinen Nedenlere Yönelik Tedaviler	30
2.16.2 İdiyopatik İnfertilite ve Non-Spesifik Tedaviler	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
AKAP	A-Kinaz Bağlayıcı Proteinler
ATP	Adenozin Trifosfat
AZF	Azospermi Faktör
BMI	Vücut Kitle İndeksi
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
DM	Diyabetes Mellitus
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FSH	Folikül Stimulan Hormon
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GSK-3	Glikojen Sentaz Kinaz-3
HPG	Hipotalamik-Hipofizer-Gonadal
ICSI	İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF-3	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-3
IFN	İnterferon
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
Kb	Kilobaz
Kg/m ²	Kilogram/Metrekare
KLK	Kallikrein ile İlişkili Peptidaz
KRY	Kronik Renal Yetmezlik
LH	Lüteinize edici Hormon
LPO	Lipid Peroksidasyonu
MDA	Malonaldehit
MESA	Mikrocerrahi Epididimal Aspirasyon
mIU/mL	Miliünite/Mililitre

mL	Mililitre
mRNA	Haberci Ribo Nükleik Asit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
Ng/dL	Nanogram/ Desilitre
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NSFAs	Non-Spesifik Flagella Anomalisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pg/mL	Pikogram/Mililitre
PKA	Protein Kinaz A
PPP1	Fosfoprotein Fosfataz 1
PSA	Prostat Spesifik Antijen
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SEMG	Semenogelin
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPMI	Seminal Plasma Motilite İnhibitörü
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TESE	Testiküler Sperm Ekstrasyonu
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri
°C	Santigrat
μ	Mikro

ŞEKİLLER

2.1.	Erkek üreme sisteminin düzenleyicisi olan HPG aks ve feed-back mekanizması	4
2.2.	Spermatogenez aşamaları	6
2.3.	Spermiyogenez aşamaları	7
2.4.	Spermin yapısı	9
2.5.	Artmış viskozite sonucu oksidatif stres artışı ve sperm hareketliliğinde azalma sonucu infertilite	12
2.6.	ROS ve antioksidan sistem arasındaki ilişki	15
2.7.	Endojen ve Ekzojen ROS kaynakları	20

TABLÖLAR

2.1.	Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların konumu ve işlevi	17
2.2.	DSÖ 2010'daki normal semen örneğinin özellikleri ve alt sınır değerleri	21
2.3.	Sperm anormalliklerine göre yapılan tanımlamalar	22
2.4.	İnfertilite ile birlikte görülebilecek bazı durumlar	25
3.1.	PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri	35
4.1.	Ölçümlerin Gruplara Göre Çoklu Karşılaştırılması (Yaş ve Semen Analizi)	39
4.2.	Ölçümlerin Gruplara Göre Çoklu Karşılaştırılması (Hormon paneli)	40
4.3.	Ölçümlerin Gruplara Göre Çoklu Karşılaştırılması (Semg1-2, Klk-2 ve AKAP4 proteinleri için yapılan PCR ve Western Blot analizi)	40
4.4.	Ölçümlerin Gruplara Göre İkili Karşılaştırılması	41
4.5.	Sperm Sayısı, Ejakulat Hacmi, Motil Ölçümlerinin Ölçümler ile İlişkisi	42
4.6.	PCR Analizinin Ölçümler ile İlişkisi	43
4.7.	Western Blot Analizinin Ölçümler ile İlişkisi	45

1.GİRİŞ

İnfertilite 1 yıllık korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen klinik olarak gebeliğin olmaması durumu olarak tanımlanır. Üreme çağında bulunan çiftlerin %15'inde infertilite olduğu ve infertilitenin yarıdan fazlasının erkek faktöründen kaynaklandığı saptanmıştır (1).

Taze ejakulat örneğinde azalmış motilite veya sperm hareketliliğinin olmaması astenozoospermi olarak tanımlanır. Astenozoospermi erkek infertilitesinin en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Şiddeti değişmekle birlikte erkek olgularda infertilitenin %80'inden sorumlu tutulmaktadır (2). Bununla birlikte çoğu olguda sperm hareketliliğinin bozulmasındaki alta yatan nedenler tam olarak bilinmemektedir. Bu da etkin bir tedavinin sağlanamamasına sebep olmaktadır.

Tıp biliminin ilerlemesi ve teknolojinin gelişmesi ile birlikte erkek infertilitesinin tanı ve tedavisinde de yenilikler yaşanmaktadır. Özellikle son zamanlarda moleküler genetik araçlar ve semen örneğinden yapılan protein analizleri ile birlikte astenozoospermiye yol açan protein ve genetik kusurlar saptanmıştır (2).

Astenozoospermi etiolojisindeki bilinen bir diğer etken ise sigara ve sigaranın yarattığı oksidatif strestir. Sigara değiştirilebilir risk faktörleri arasında yer almaktadır. Tütün içiminin neden olduğu toksinlerin semen parametreleri üzerine negatif etkisi olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu etkiler üzerinden de erkek faktöründe infertiliteye sebep olduğu bilinmektedir(3). Özellikle eksojen ROS kaynağı olan sigaranın azalmış sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve sperm morfolojisindeki değişikliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir (4).

Sigaranın sperm kalitesi ve motilitesi üzerine etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte erkek infertilitesine genel etkisi artmış oksidatif stres, DNA hasarı ve artmış hücre apoptozunun birlikte rol aldığı patolojik süreçten kaynaklanır. Bu patolojik sürecin sonunda da azalmış semen kalitesi, bozulmuş spermatogenez ve azalmış sperm hareketliliği ortaya çıkmaktadır (5).

Yapılan birçok çalışmada sigaranın erkek infertilitesi üzerine etkileri net olarak anlaşılamamaktadır ve sperm hareketliliğini nasıl etkilediği hala tam olarak bilinmemektedir. Biz de çalışmamızda sperm hareketliliği üzerine etkili proteinlerin

sigara ile ilişkisinin değerlendirilmesi ve böylece astenozoospermik hastaların tedavisinde uygulanabilecek yeni yöntemlere katkı sağlanması amaçlanmıştır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Fizyolojisi

Erkek üreme sistemi hormonal süreçlerin kontrolü altında iyi bir organizasyon sürecidir. Bu sistem genital organların gelişimi, adölesan çağ ile birlikte üreme potansiyelinin açığa çıkması ve yetişkin dönemde cinsel fonksiyonların devam etmesinden sorumludur. Erkek üreme sisteminde bulunan organlar penis, prostat bezi, seminal vezikül ve testislerdir. Testisler özellikle erkek üreme fizyolojisindeki önemli bir hormon olan testosteronun üretildiği organdır. Ayrıca sperm üretimi de testislerde olmaktadır. Doğurganlık açısından düşünüldüğünde erkek üreme sisteminin temel işlevi sperm üretimidir. Sperm üretimi spermatogenez, spermiyogenez ve spermiyasyon olmak üzere üç aşamadan oluşan karmaşık bir süreçtir. Genellikle bu üç sürecin tamamını tanımlamak için literatürde spermatogenez terimi kullanılır. Spermatogenez süreci endokrin sistemin kontrolünde ilerler. Hipotalamik-hipofizer-gonadal (HPG) aks bu süreçte görev almakla birlikte bu aksın düzenli ve kontrollü çalışması için birçok kısa ve uzun negatif feed-back mekanizmaları bulunur (6).

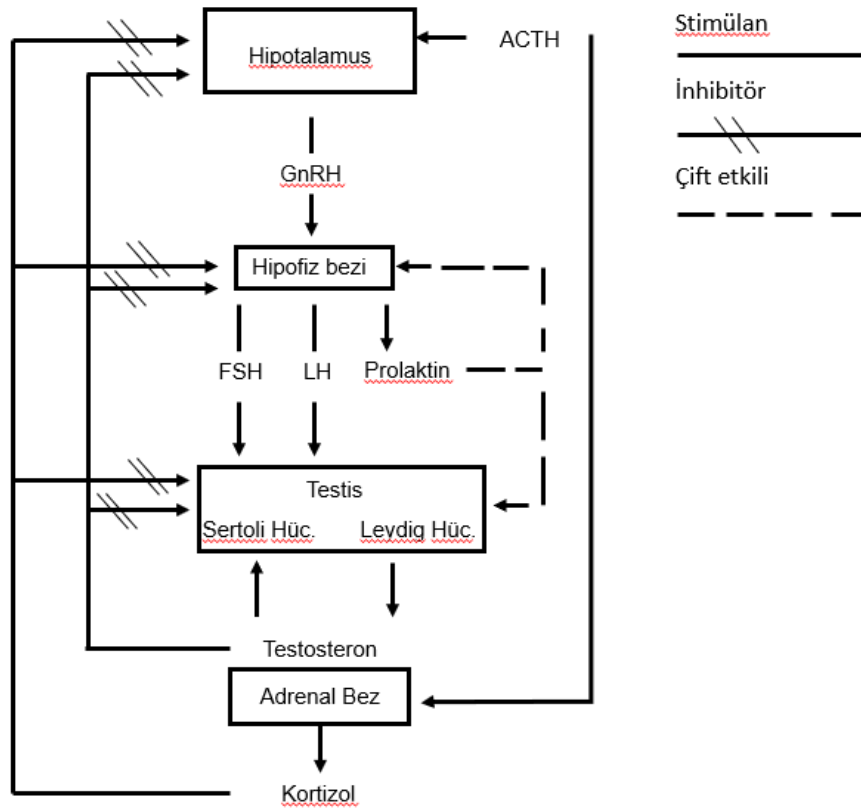
HPG aksın üç komponentinden ikisi (hipotalamus, hipofiz bezi) yalnızca ürettikleri ve salgıladıkları hormonlar aracılığıyla düzenleyici bir işleve sahiptir. Ancak üçüncü komponent olan testisler endokrin mekanizmalar dışında erkeğin cinsel özelliklerini ve bununla birlikte davranışlarını da düzenler (7).

Hipotalamus, periyodik olarak ön-hipofiz üzerinden aksı başlatacak olan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılar. GnRH ise sonrasında ön-hipofizden lüteinize edici hormon (LH) ve follikül stimulan hormon (FSH) salınmasını sağlar. GnRH'nin pulsatil salınımları LH ve FSH'nin de benzer şekilde dolaşıma katılmasını sağlar. Normal ve sağlıklı erkekte gün içerisinde 6-8 saatlik periyodlarda 2-4 kez LH ve FSH salınımı meydana gelir. Kandaki östrojen ve testosteron düzeyleri negatif feed-back ile LH düzeyini regüle eder. LH ve FSH testislerde hedef hücrelerle etkileşime girer. LH'nin testisteki hedef hücresi Leydig hücresi iken FSH Sertoli hücresini uyarır. LH Leydig hücreleri üzerinden testosteron sentezini aktive eder. (Şekil 2.1)

FSH Sertoli hücresi üzerinden ergenlikte seminifer tübül gelişimini erişkin dönemde ise spermatogenezini aktive eder. FSH salınımının etkisiyle birlikte Sertoli

hücrelerinden androjen bağlayıcı protein (ABP), transferrin ve prostoglandin gibi birçok enzim salgılanır. Bu hormonal düzenleme sırasında Leydig hücreleri üzerinde LH'nin etkisini arttırmak için prolaktin hormonu da görev alır (6).

Sertoli hücreleri seminifer tübüllerin bazal membranında yer alan hücrelerdir. Bu hücrelerin en önemli özelliği hücreler arası bağlantılar arasında en sıkı bağlantıları oluşturmasıdır. Bu bağlantının bu denli sıkı olmasıyla birlikte kuvvetli bir kan-testis bariyeri oluşarak sperm hücreleri immünolojik faktörlerden korunabilmektedir (6).



Şekil 2.1 : Erkek üreme sisteminin düzenleyicisi olan HPG aks ve feed-back mekanizması (1)

2.2 Erkek Üreme Organı

İnsanda üreme organları birincil ve ikincil organlar olmak üzere 2 grupta incelenir. Birincil üreme organları gonadları içerirken, ikincil organlar ise gametlerin olgun sürece dönüşümünde ve bu hücrelerin iletilmesinde görevli olan organlardır. Testisler, skrotumda tunica albuginea kapsülü ile çevrili birincil üreme organıdır.

Testis morfolojik ve fonksiyonel görevleri düşünüldüğünde 2 ana parçadan oluşur. Tübüler komponent seminifer tübüleri ve bu tübüller arasındaki hücreler arası bölümleri içerir. Bu intertübüller alandaki yapılarda vasküler ve immun sistemle ilgili yapılar yer alır (8).

Seminifer tübüller testis hacminin %60-80'ini oluşturur. Seminifer tübüller epitel hücresi ile çevrili olup Sertoli hücresi ve spermatogenik hücreler olmak üzere 2 tip hücre içerirler. Sertoli hücresinin görevi, spermatogenez süreci boyunca spermin gelişimini sağlamaktır. FSH tarafından uyarılan bu hücreler negatif ve pozitif feedback durumuna göre inhibin ve aktivin hormonlarını üretir. Leydig hücreleri ise testosteron ve insülin benzeri büyüme faktörü-3 (IGF-3) üretiminden sorumlu hücrelerdir (8).

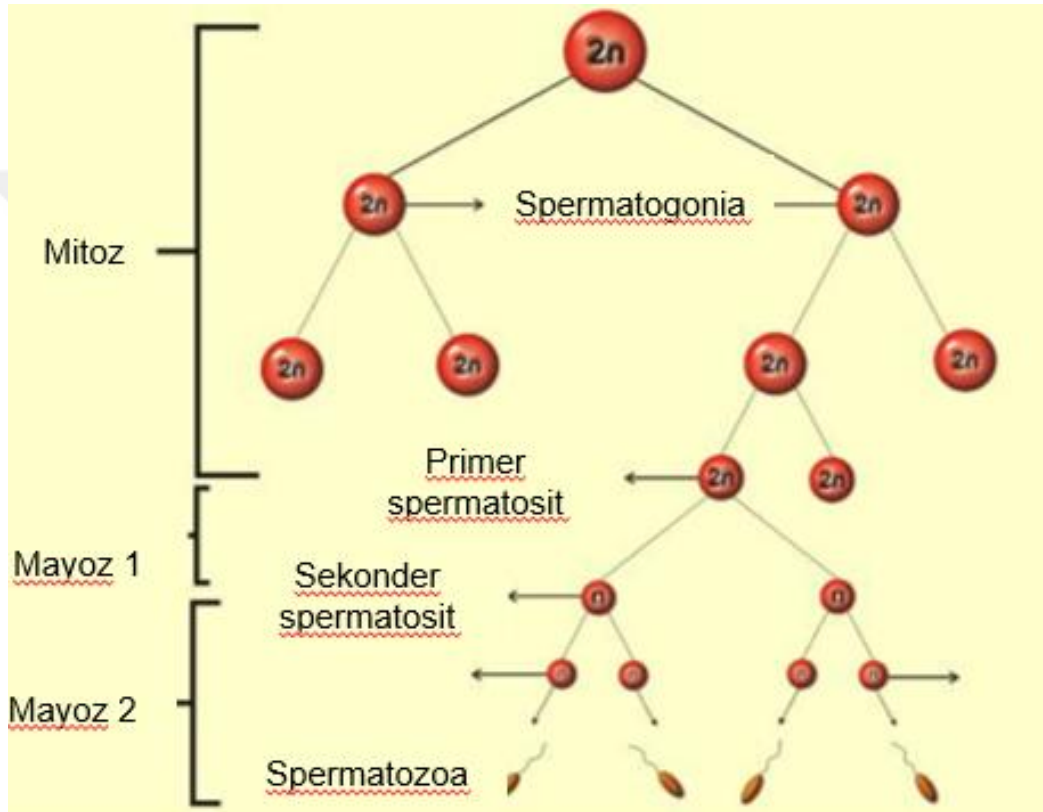
2.3. Spermatogenez

Olgun sperm genetik materyali taşıyıcı ve neslin devamlılığını sağlar. Bu nedenle olgun sperm oluşumunun eksiksiz ve verimli olması türlerin devamlılığı için önemli bir süreçtir. Spermatogenez, birbiriyle bağımlı spermatogonyal kök hücrelerin kendini yenilediği, testiküler mikroçevrenin yardımıyla fonksiyonel spermatozoaya farklılaştığı iyi bir organizasyonla ve hiyerarşik bir düzende ilerleyen dinamik bir süreçtir (9,10). Bu süreçte, Sertoli hücrelerinin yapısal desteğinin yanı sıra endokrin faktörlerin de etkisiyle, diploid kromozom sayısındaki spermatogonyum seminifer tübüllerde haploid kromozom sayısındaki spermatozoaya dönüşür (11).

3 ana aşamadan oluşan bu dönüşüm sırasıyla spermatogonyumların mitoz ile çoğaldığı aşama olan spermatositogenez, oluşan spermatogonyumun mayoz bölünme ile DNA yapısının yarıya düştüğü aşama ve türe özgü şekle sahip olgun spermin oluşumu için bir dizi morfolojik değişime maruz kaldığı spermiyogenez aşamalarını içerir (9,12). Kök hücre yapısındaki spermatogonyumun matür sperm hücresine dönüşümü ortalama 74 günde meydana gelir (13).

Spermatogenez seminifer tübüllerde bazal membrana bitişik halde bulunan spermatogonya'nın mitotik bölünmesiyle başlar. Seminifer tübüllerde meydana gelen spermatogenezin aşamaları sırasında birçok intrinsik ve ekstrinsik faktör rol almaktadır (12,14). Bu mitotik bölünme sonucunda A tipi ve B tipi spermatogonya

adında 2 farklı hücre oluşur. A tipi hücreler kök hücreleri yenilerken B tipi hücreler olgun spermatozoa oluşumunda rol oynarlar. Bu oluşumda önce B tipi hücreler spermatositlere dönüşürler. Primer spermatositler spermatogenez sürecindeki en büyük hücrelerdir. Ardından bu hücreler de 2 adet mayoz bölünme sonucu önce sekonder spermatositlere sonrasında spermatidlere dönüşürler. Spermatidler de spermiyogenez işlemi ile matür sperm hücresini oluştururlar. (Şekil 2.2) Spermatogenez adölesan çağda başlar ve ölüme kadar aralıksız devam eder. (15).

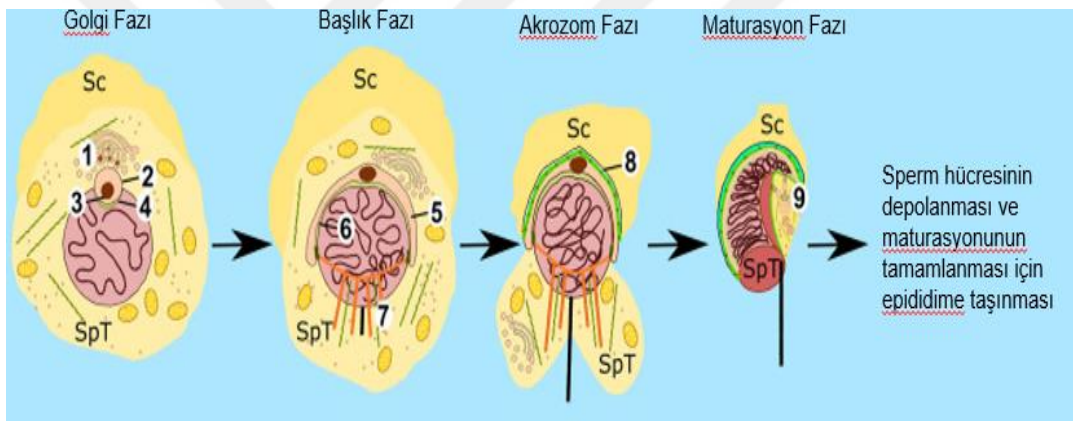


Şekil 2.2 : Spermatogenez aşamaları (8)

2.4. Spermiyogenez

Spermatidler oluştuktan sonra spermiyogenez fazı başlar. Spermiyogenez çekirdek ve çekirdek etrafındaki organellerin değişimi, golgi aygıtı tarafından oluşturulan akrozomik sistem, flagellum yapısının oluşturulması, hücre yüzeyinin düzenlenmesi ve olgunlaşma ile sonuçlanan bir sitoplazmik reorganizasyondur. Bu fazda artık hücre bölünmesi gerçekleşmemektedir (16).

Spermiyogenez olgun sperm hücresinin olduğu spermatogenez sürecinin son basamağıdır. 4 farklı aşamadan oluşur ve bu aşamalar sırasıyla golgi fazı, şapka/akrozom aşaması, kuyruk oluşumu ve olgunlaşmadır. Golgi fazında proakrozomal veziküller tek ve büyük bir granül olan akrozomu oluşturmak için birleşirler. Şapka/akrozom aşamasında ise oluşan akrozomal vezikül düzleşerek spermatid çekirdeğin üzerine yayılır. Bundan sonraki aşamada ise sentriollerden birisi flagella oluşumu için uzar. Perinükleer halkadan oluşan uzayan sperm kuyruğuna uzanan mikrotübül yapısını ve aktin filamentlerini içeren manşet yapısı ise sperm başının şekillendirilmesinde rol oynar. Spermatidlerin uzaması tamamlandıktan sonra sitoplazma ve organellerin çoğu Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Sonuç olarak spermiyogenez fazının sonunda sitoplazması azalmış, nükleus ve çevre elemanların son halini aldığı bir sperm hücresi elde edilmiş olur (17). (Şekil 2.3)



Şekil 2.3 : Spermiyogenez aşamaları (17)

2.5. Spermatogenezdeki Hormonal Düzen

Seminifer tüplerde germ hücrelerin gelişimi sırasında birçok endokrin, parakrin ve otokrin etkileşim söz konusudur. Hipotalamo-hipofiz-gonadal (HPG) aks gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) aracılığıyla bu düzenlemenin başlıca belirleyicisidir. HPG aks embriyogenik dönemde fenotipik gelişimden sorumluyken erişkin dönemde hem cinsel fonksiyonlar hem de testisin fonksiyonlarından sorumludur. Üreme sistemindeki hormonlar peptid ya da steroid yapısındadır. LH ve FSH peptid yapısında olup hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak ikincil haberciler üzerinden etki ederler. Östrojen ve testosteron ise steroid yapıda olup hücre içi etkileriyle düzenlerler. GnRH LH ve FSH üzerinden Sertoli ve Leydig hücrelerini

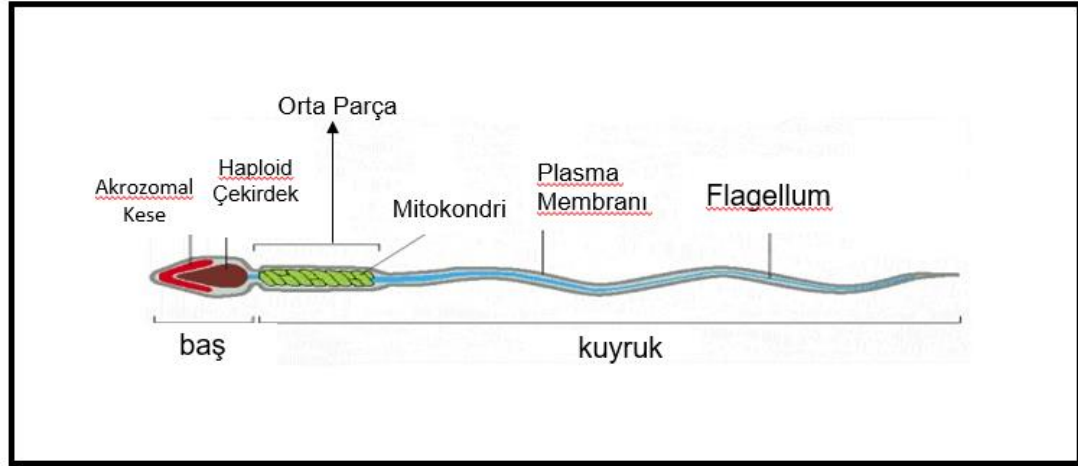
uyararak steroidogenez ve spermatogenez süreçlerini başlatır. Puberte öncesi dönemde testosteron hormonu spermatogenez için yeterli değilken erişkin dönemde LH'nin etkisiyle salınımı gerçekleştirilen testosteron spermatogenezin devamlılığı açısından büyük öneme sahiptir. Spermatogenezin devamlılığında kalitatif olarak testosteron, kantitatif olarak ise FSH gerekmektedir (18).

Üreme sisteminin en üst merkezi olan hipotalamusun fonksiyonel hasarında HPG aksta bozulma ve bunun sonucunda testislerde atrofik değişiklikler meydana gelir. Bunun sonucunda Leydig hücrelerinde hiperplazi ve germ hücrelerde sayıca azalma gerçekleşir. LH'nin spermatogenez sürecindeki katkısı Leydig hücrelerini uyararak gerçekleştirdiği testosteron salınımıdır. FSH ve testosteron ise etkilerini Sertoli hücreleri üzerinden yapmaktadır. Testosteron Sertoli hücrelerinin spermatidlere tutunmasını sağlayarak spermatogenez etkiler. FSH aynı zamanda germ hücrelerinde meydana gelecek apoptozu da önlemektedir. Testis hücrelerindeki parakrin ve otokrin süreçler de spermatogenezde görev almaktadır. Bu süreçlerin başlamasında yine gonadotropinler rol oynamaktadır. Başta interlökin-1 (IL-1) ailesi ve diğer büyüme faktörleri (IL-6, TNF gibi) germ hücre proliferasyonunu arttırırken Leydig ve Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarını da etkilediği gösterilmiştir (19).

2.6. Spermin Yapısı

Spermiyogenezin sonucunda matür sperm hücresi meydana gelir. Matür sperm hücresinin uzunluğu 60 μm 'dir. Spermatozoa döllenme için temel olarak baş ve kuyruk yapısı olmak üzere 2 bölümden oluşur. Oval ve yassı yapıda olan baş kısmı 4,5x3 mikron boyutundadır. Baş yapısı ayrıca akrozomal bölge ve haploid kromozom yapısını içeren çekirdeğe bölünür. Akrozomal bölge akrozomal vezikülü ve akrozomal keseyi örten plazma zarını içerir. Spermatozoa ovuma yaklaştığında akrozom içindeki enzimleri ortama salarak akrozom reaksiyonunu oluşturur. Bu enzimler de ovumun etrafını saran yapıları (hücre tabakaları, zarlar) eritir. Enerji üretimini sağlayan ayrıca sperm hücresini dişi üreme sisteminde ilerleten kuyruk yapısı ise mitokondrinin yer aldığı orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere 3 bölümden oluşur. (Şekil 2.4) Kuyruğun orta parçası "anulus" adı verilen bölgede sonlanır. Kuyruğun orta parçasında motilite yeteneği olmamasına rağmen kuyruğun geri kalan kısmının hareket kabiliyeti için gerekli rijiditeyi sağlar. Ana parça ise longitudinal olarak

aksonal yapılardan ve bunları birbirine bağlayan yapılardan oluşup hareketi sağlayan esas kısımdır. Sperm flagellumu, sperm hareketliliği ve fertilizasyon için gerekli olan hareketli bir siliyer yapıdır (20,21).



Şekil 2.4 : Spermin yapısı (5)

2.7. Sperm Motilitesinin Fizyolojisi

Sperm spermatogenez süreci sonunda üretildikten sonra sırasıyla rete testis, efferent kanallar, kaput epididim ve son olarak da depolanacağı yer olan kauda epididime geçer. Bu epididimal geçiş süreci boyunca da biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere uğrayarak hareketlilik ve kapasitasyon yeteneği kazanır. Spermin epididim boyunca geçirdiği süreçte dış ortam değişiklik gösterir. Lümen içeriğindeki asidik ortam spermi hareketsiz tutar (20).

Vücuttaki diğer hücreler gibi insan sperm hücresi de hareketliliğini ve akrozomal veziküldeki salgıların ekzositozu için ATP'ye ihtiyaç duyar. Erkek germ hücresinde bulunan glikolitik enzimler flagellar yapının ana parçasında bulunur. Sperm motilitesinin kazanılmasında başka bir etken de epididimdeki glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) aktivitesindeki düşüştür. İmmotil spermlerin olduğu kaput epididimdedeki GSK-3 aktivitesinin, motil spermlerin olduğu kaudal epididime göre 6 kat fazla olduğu gösterilmiştir (22).

Sperm hareketliliğini düzenleyen temel iyon kalsiyumdur. Kalsiyum ayrıca kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda da önemli bir rol oynar. Hiperaktivite için gerekli olan spermin alkalizasyonundan da sorumlu olan kalsiyum, membrandaki

kanallar aracılığıyla dış ortamdan alınır. Bunun için de CatSper kanalları rol oynar (20,23).

Ayrıca spermin orta bölümünde bulunan mitokondrinin iki önemli işlevi vardır. İlki enerji üretimi, diğeri ise apoptoz ile eşey hücrelerini ortadan kaldırmaktır. Spermin kuyruğunda bulunan flagellumun yapısındaki mitokondriler, mikrotübüllerin etrafında yerleşim göstererek hareketliliği sağlarlar. Mitokondride meydana gelen genomik mutasyonlar infertilitede, özellikle de astenozoospermide saptanmıştır (24).

Spermin motilitesi kalsiyum ve mitokondriyal aktivite dışında birçok metabolik yolağa ve mekanizmalara bağlıdır. Spermatogenez sonrası işlevsel olarak hareketliliğini tam olarak kazanmayan sperm hücreleri epididim içinde motilite özelliğini kazanmış olur. Bu kazanımla ilgili ilk sinyal mekanizmalarından birisi spermdeki fosfoprotein fosfataz 1 (PPP1) aktivitesinin kontrolüdür (25).

2.8. Motilite Üzerine Etkili Diğer Proteinler

2.8.1 A-kinaz Bağlayıcı Proteinler (AKAP)

A-kinaz bağlayıcı proteinler (AKAP) insan sperm hücresinde siklik AMP'ye (cAMP) bağımlı protein kinazları bağlayarak fosforilasyonda ve sinyal iletim mekanizmalarının başlatılmasında rol oynar. AKAP3 ve AKAP4 fibröz kılıfta bulunan yapısal proteinler içinde en çok bulunan olup cAMP'ye bağımlı protein kinaz A'yı (PKA) bağlamada görev alır (26,27). AKAP4, X kromozomu üzerindeki tek bir gen tarafından kodlanır ve testislerde sperm farklılaşması sırasında post-mayotik evrede proAKAP4 adlı öncü bir proteinden 188 aminoasitin salınması ve işlenmesiyle meydana gelir. AKAP4 sperm motilitesi ve hipermotilitesinde görev alan bir dizi protein fosforilasyonundan sorumludur. Bu nedenle yapılan hayvan deneylerinde AKAP4'ten yoksun farelerde sperm sayısında azalma olmadığı ancak flagellum yapısında kısıalma, fibröz kılıf ile ilişkili sinyal transdüksiyonunda indüksiyon ve hareketlilikte azalma olduğu görülmüştür. Özellikle AKAP4'ün fibröz kılıfın bütünlüğünden ve sağlamlığından sorumlu bir yapısal protein olduğu görülmüştür (27).

2.8.2 Semenogelin (SEMG)

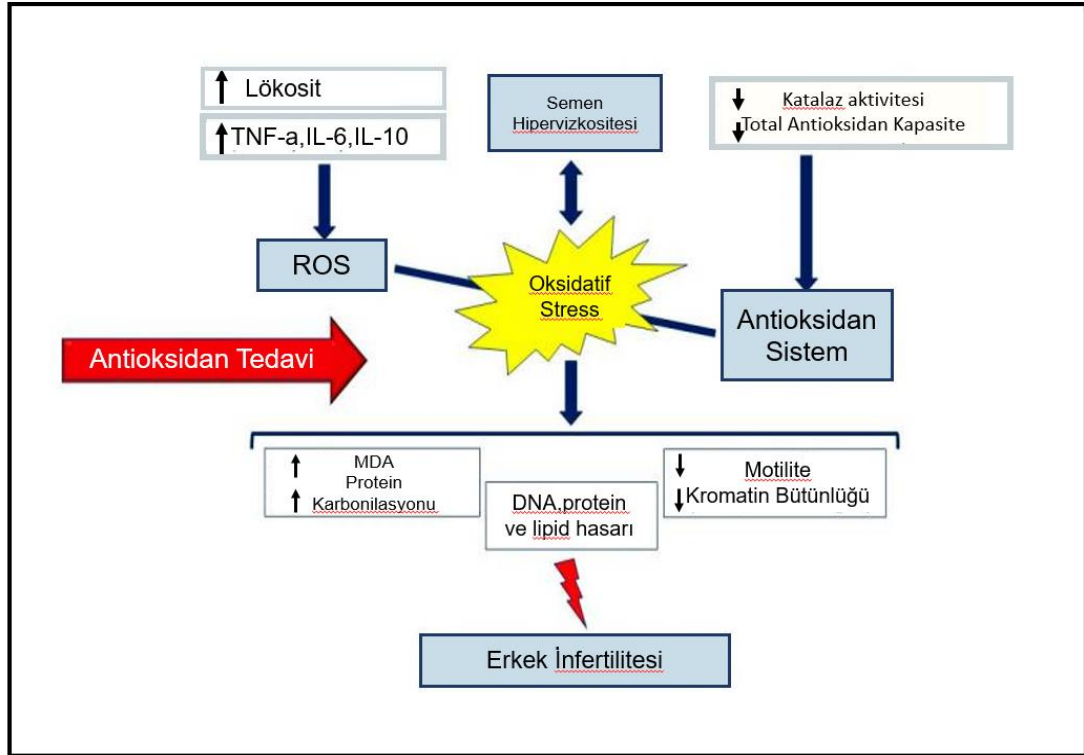
İnsan seminal plazması ejakulasyon sonrasında spermatozoa ile karşılaştığında sperm motilitesinin inhibisyonuna sebep olmaktadır. 1996 yılında seminal plasma motilite inhibitörü (SPMI) olarak tanımlanan ve seminal sıvıdaki bir başka düzenleyici protein olan semenogelin (SEMG)' dir. Kaynağı seminal vezikül olup eppine bağlı bir şekilde bulunur ve sperm hareket kabiliyetini azaltmaktan sorumlu çok yönlü bir proteindir. SEMG'nin 2 formu mevcuttur. Semenogelin1 seminal veziküllerde bolca bulunan ancak epididim, prostat gibi genital sistemin diğer yapılarında bulunmayan 1,8 kilobaz (kb)'lık bir mRNA tarafından kodlanır. Semenogelin 2 ise seminal veziküllerde bulunmasının yanı sıra epididimde bulunup 2,4 kb'lık mRNA tarafından kodlanır. Her iki formun aminoasit dizilişine bakıldığında %78'lik bir özdeşlik olduğu görülmektedir (28). İnsan seminal plazması ejakulasyondan hemen sonra sperm hücrelerinin yer aldığı yarı katı halde bulunan jelatinimsi bir kütle halinde kendiliğinden pıhtılaşır.

SEMG, semen içerisinde sperm hareketliliğini engelleyen bir protein olup prostat spesifik antijen (PSA) tarafından daha düşük moleküler kütleli polipeptidlere parçalayarak semenin daha da sıvılaşmasını sağlayarak spermin hareketliliği başlatır ve kapasitasyonun devamlılığını sağlar. Sperm motilite kusuru olan hastalarda SEMG1'in aşırı düzeyde eksprese edildiği ve bunun sonucunda semendeki spermler etrafında jel yapıda bir matriks oluşturarak hareketliliği azalttığı görülmüştür (29–31).

2.8.3 Kallikrein ile İlişkili Peptidazlar (KLK)

Kallikrein ailesi 15 proteinden oluşur. Kallikrein ile ilişkili peptidazlar da seminal sıvıda bulunur ve özellikle semenin vizkositesinden sorumlu tripsin ve kimotripsin benzeri aktivasyon gösteren serin protez ailesinin üyeleridir. KLK'ler pre-pro-KLK olarak üretilir ve böbreklerden, karaciğerden, tükürük bezlerinden ve erkek ve kadın genital sisteminden salgılanan aktif KLK'ları üreten bir dizi proteolitik kaskat ile aktif hale gelir. Ejakulattaki sperm hücreleri SEMG'ler, fibronektin ve kollajenden meydana gelen seminal koagulum içinde tutulur. Bu protez ailesinin üyeleri insan semeninin sıvılaştırılmasını seminal pıhtıların özellikle SEMG'lerin enzimatik yollarla bozunmasını sağlayarak yaparlar. Bu sayede spermin hareketliliği ortaya çıkar (32,33). Seminal sıvının viskozitesi hem sperm parametreleri hem de sperm motilitesi

açısından önemlidir. (Şekil 2.5) Semen hiperviskozitesi olan hastalarda da yapılan çalışmalar oksidatif stresin arttığını göstermiştir (34).



Şekil 2.5.: Artmış viskozite sonucu oksidatif stres artışı ve sperm hareketliliğinde azalma sonucu infertilite (34)

2.9. Sperm DNA Hasarı ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Mevcut kanıtlar dahilinde oksidatif stresin infertiliteye, sperm motilitesinde azalmaya, sperm DNA hasarına ve tekrarlayan abortusa sebep olduğu gösterilmiştir. İdiyopatik infertilite için düşünülen mekanizmalardan birisi oksidatif stres ve artan ROS'tur (35). Belirli bir seviyedeki ROS miktarı spermatozoanın olgunlaşması, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi fizyolojik olaylar için gereklidir. Ancak artmış ROS seminal plazmadaki antioksidanların nötralize etme kabiliyetini azaltır (35,36).

Oksidatif stres ile ilişkili mekanizmaların infertilite olgularının %40-50'sinde rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif stres ile uyarılan erkek genital sisteminde testisin antioksidan savunma sistemi fazla üretilen ROS ajanlarına karşı yetersiz kalır. Süperoksit anyonu, hidroksil radikali gibi oksijen türevi serbest radikallerdir ve

hidrojen peroksit ROS ajanı olarak gösterilmiştir. Serbest radikaller için en önemli endojen kaynak enerji üretiminden sorumlu olan mitokondridir. Mitokondrinin iç zarında farklı substratlar oksitlenir ve sonucunda ATP (adenozintrifosfat) sentezi ve moleküler oksijenin suya indirgendiği bir dizi elektron akışı olur. Bu elektron akışı sırasında ise kompleks I ve kompleks III üzerinden süperoksit radikali oluşur (37).

Fizyolojik seviyelerdeki ROS normal hücre işlevleri için gerekliken aşırı ROS seviyesi ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik nedeniyle lipid peroksidasyonu (LPO) ile başlayan süreç sperm DNA fragmentasyonu ve germ hücrelerin apoptozu ile sonlanır (38). (Şekil 2.6)

2.9.1. Lipid Peroksidasyonu (LPO)

Sperm hücresinin plazma zarında konjuge olmayan çift bağlara sahip olan çoklu doymamış yağ asitleri bulunur. Bu bağların metilen gruplarına yakın halde olması metil karbon ve hidrojen bağını zayıflatarak yapısındaki hidrojenin oksidatif hasara karşı duyarlı hale getirir. ROS'un hücre içi seviyelerindeki kontrolsüz artış LPO ile sonuçlanan bir reaksiyon zincirini başlatır. Bu reaksiyon zinciriyle birlikte hücre membranındaki yağ asitleri kaybolur, hücre zarının akışkanlığı azalır, membranda bulunan reseptörler ve enzimatik aktivasyonlar inhibe olur. LPO fertilizasyonda anormalliğe yol açan, otokatalitik yayılan bir kimyasal reaksiyondur.

LPO başlangıcında karbon-karbon çift bağlarından hidrojen ayrılır sonrasında lipid radikalleri oluşur ve oksijen ile tepkimeye girerek peroksit radikalleri meydana gelir. Bu radikaller bakır ve demir gibi metallerin varlığında otokatalitik reaksiyon zincirini devam ettirme özelliğine sahiptirler. Peroksil ve alkil radikallerinin oluşumu son ve kararlı ürün olan malonaldehit (MDA) oluşturana kadar devam eder. Bu nedenle MDA spermatozoayı etkileyen oksidatif hasarın seviyesini belirlemek için kullanılır (39).

2.9.2. Sperm DNA Fragmentasyonu

Fertil erkeklerden alınan sperm örneklerinde belirli bir düzeyde DNA kırılmaları vardır. Ancak infertil erkeklerde bu oran daha fazla olmaktadır. DNA'da meydana gelen bu kırılmalarda hem endojen hem de ekzojen faktörler bulunmaktadır. Kromatin yapısındaki zayıflama sperm hücresini dış faktörlere karşı DNA hasarına

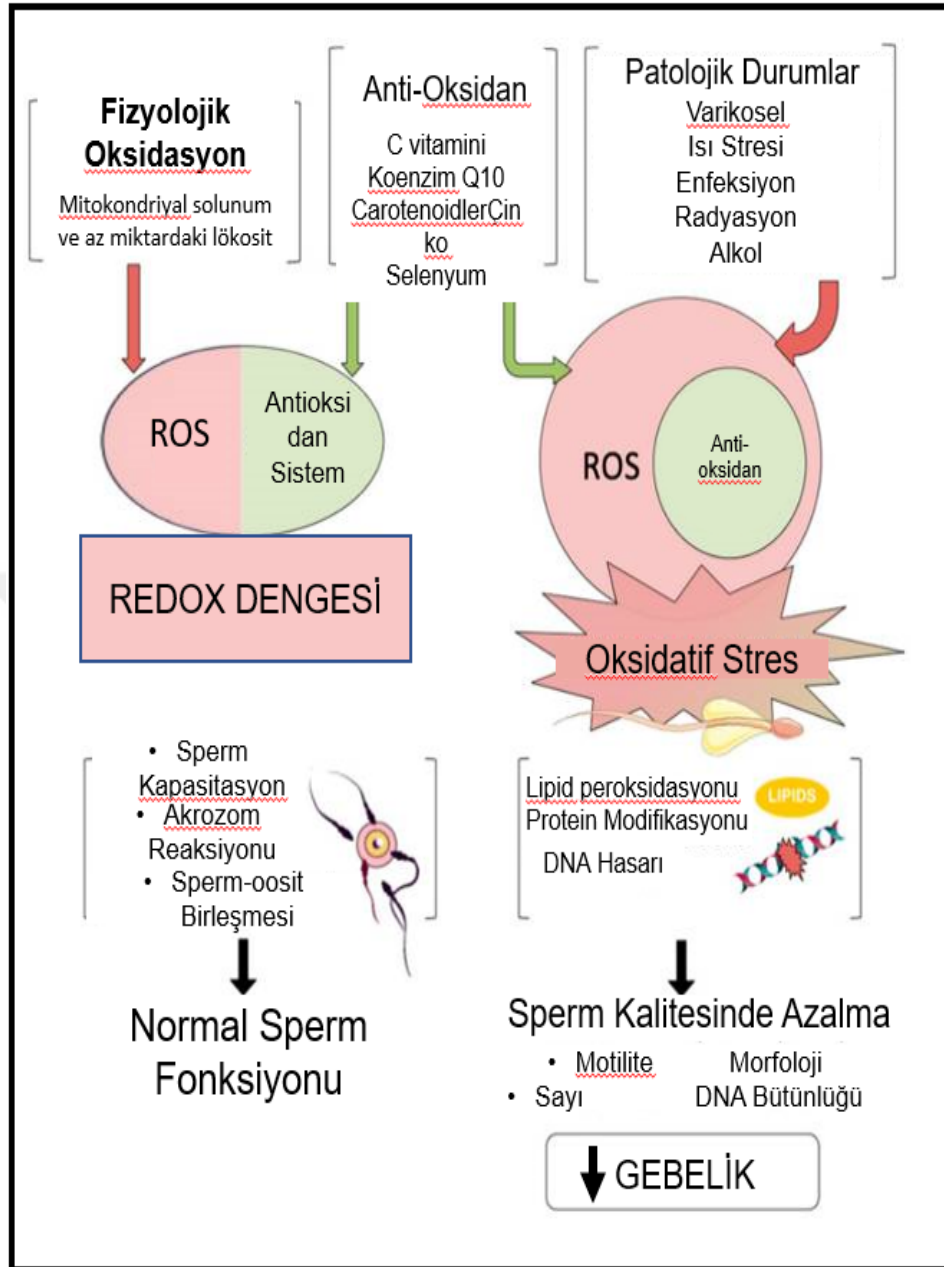
daha savunmasız kılar. Sperm hücresinde DNA onarım mekanizmasının olmaması da bu duyarlılığı açıklamaktadır.

Oksidatif stresin DNA fragmantasyonuna yol açan en önemli eksojen etken olduğu düşünülmektedir. Artan ROS miktarları ve antioksidan sistem arasındaki dengesizlik sonucunda DNA'da kırılmalar meydana gelir. Yüksek ROS seviyeleri tek başına sperm DNA'sı üzerinden hasar oluşturmaz bunun yanında mitokondriyal DNA, hücre zarı ve apoptotik mekanizmalar üzerinden de etkisini gösterir. Sperm kromatininin kusurlu olduğu durumlarda normal ROS seviyelerinde bile DNA fragmantasyonu ve yüksek duyarlılık olabilir (35,40).

2.9.3. Germ Hücre Ölümü

Apoptoz hücre içi sinyal mekanizmalarının ve düzenleyici sistemlerin neden olduğu programlanmış hücre ölümüdür. Apoptoz germ hücrelerinin Sertoli hücrelerinin kapasitesi ile uyumlu olarak korunmasında ve kusurlu germ hücrelerinin olgun sperm hücresine dönüşümünü engellemede önemli bir rol oynar.

Testiküler apoptozun iki yolu vardır. Endojen yol veya mitokondriyal yol ve eksojen veya ölüm reseptörü yolu. ROS seviyeleri her iki yolu da modüle etmektedir. Oksidatif stres sonucu oluşan ROS'lar mitokondriyal membran bozulmasına yol açarak sitokrom-c sinyal molekülünün salınmasına ve apoptoz ile ilgili kaskatların aktive olmasına sebep olur. İnfertil erkeklerin seminal plazmalarında sitokrom-c düzeylerinin yüksek olması da bunun bir göstergesidir (38). Tümör nekroz faktörü/sinir büyüme faktörü (TNF/NGF) ailesinin bir üyesi olan Fas/FasL aynı zamanda germ hücrelerinin apoptotik mekanizmalarında da görev almaktadır. Mayoz-1 fazına giren germ hücrelerinin yarıdan fazlası Fas ile işaretlenir ve gerektiğinde Sertoli hücreleri tarafından elimine edilir. Testiste artan ROS seviyeleri Fas/FasL yoluyla da germ hücre ölümünü indüklemektedir (37).



Şekil 2.6.: ROS ve antioksidan sistem arasındaki ilişki (41)

2.10. Antioksidanlar

2.10.1. Enzimatik Antioksidanlar

Semende bulunan ana enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim triadıdır. Süperoksit anyonlarının dismutasyonu için katalizörler süperoksit dismutaz ya da oksidoredüktazları içerir.

SOD'lar hücre içinde ya da dışında olmak üzere iki şekilde oluşur. Hücre içi formlardan ilki, sitoplazmada bulunan merkezinde bakır-çinko elementlerini içeren bakır-çinko SOD'dur ve SOD1 olarak tanımlanır. Diğeri ise merkezinde manganez elementini bulunduran, mitokondriyal matraste yer alan manganez SOD'dur ve SOD' olarak adlandırılır. Bu iki izoenzim prostat kaynaklıdır.

Katalaz ise hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya ayrışmasını sağlar. Katalaz merkezinde demir olan bir hem sistemidir. Hücreden hücreye değişmekle birlikte peroksizomlarda, mitokondride ve sitozolde aktivasyon gösterir. Katalaz antioksidan mekanizma dışında sperm kapasitasyonunda da rol oynar.

Glutatyon peroksidaz ise fosfolipidlerin peroksitleri dahil olmak üzere hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitlerin indirgenmesini katalize eder. Bu enzimin merkezinde ise selenosistein yapısında olan selenyum bulunmaktadır. Spermde esas olarak mitokondriyal matraste aktivasyon gösterir. Bununla birlikte kromatin yoğunlaşma sürecinde de aktif rol oynayan çekirdek formu da mevcuttur (42).

2.10.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzim sistemi dışında sperm hücrelerini oksidatif stresten koruyan enzimatik olmayan antioksidanlar da mevcuttur.

Bu grup hücre solunumunda rol oynayan mitokondride yüksek düzeyde bulunur ve içeriğinde koenzim Q10 bulundurur. Koenzim Q10 oksidatif stresin yaratmış olduğu sperm hücrelerindeki fonksiyon kaybına karşı koruma özelliği gösterir ve süperoksit oluşumunu inhibe eder. Yapılan çalışmalarda koenzim Q10 ile hidrojen peroksit arasında anlamlı bir negatif korelasyon olduğu ve koenzim Q10 seviyelerinin artışı ile semendeki sperm sayısının ve motilitenin de arttığı görülmüştür.

Selenyum ise yapısında bulunduğu selenoenzimler ile sperm DNA'sını oksidatif hasara karşı korumaktadır. Spermin yapısal bütünlüğünü korumak adına 25'ten fazla selenoprotein mevcuttur. Selenyum eksikliği sonucu ortaya çıkan en önemli morfolojik anomali spermin orta parçasında görülür (42).

Tablo 2.1.: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların konumu ve işlevi (42)

Antioksidanlar	Konumu	İşlevi
Glutasyon	Protein olmayan tiyol	Serbest radikalleri devre dışı bırakır
Karotenoidler	Membranda yağda çözünen antioksidan	Hücre zarının bütünlüğünü korur
E vitamini	Membranda	Lipid peroksidasyonu ürünlerini detoksifikasyonu
C vitamini	Sitozol,mitokondri,peroksizom	Hidrojen peroksitin detoksifikasyonu
SOD	Tüm ökaryotik hücreler	Oksijenin kararlı seviyesini düşürür
Katalaz	Peroksizom,mitokondri	Hidrojen peroksit seviyesini düşürür
Glutasyon peroksidaz	Stoplazma,mitokondriyal matris	Hidrojen peroksit seviyesini düşürür

2.11. ROS'un Kaynakları

2.11.1 Endojen Kaynaklar

Sperm hücrelerinin kendi metabolik aktivitesi önemli bir ROS kaynağı olup bununla birlikte semendeki olgunlaşmamış sperm hücreleri de serbest radikal kaynaklarıdır.

Endojen serbest radikaller sperm hücresinde gerçekleşen metabolizma sonucu bir yan ürün olarak üretilebilir. Hücrenin orta bölümünde yer alan mitokondrinin aktivitesi glikoliz ile birlikte motilite ve kapasitasyon için gereklidir. Mitokondrilerde bulunan elektron taşıma sistemi ve oksidatif fosforilasyon ile ATP üretilir. ATP üretim mekanizması esnasında da kompleks I ve kompleks III'te süperoksit ve hidroksil radikalleri oluşur.

Diğer bir endojen oluşum mekanizması ise olgunlaşmamış sperm hücreleri tarafından meydana gelir. Spermatogenez sonucunda oluşan sperm hücrelerinde sitoplazmanın tutulması hücrede nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) üretilmesine neden olur. Hücre içindeki NADPH NADPH oksidaz enzimi ile NADP'ye dönüştürülürken süperoksit radikali de yan ürün olarak oluşur (41).

2.11.2. Eksojen Kaynaklar

Varikosel

Erkek infertilitesinin en yaygın düzeltilebilir nedeni olan pampiniform pleksusun dilatasyonu sonucu meydana gelen venöz kapakçıklardaki yetersizlik kan akışında azalmaya sebep olur. Bu durum vücut sıcaklığından ortalama 2 °C daha az olması gereken testis ısısının yükselmesine neden olur. Bunun sonucunda da reaktif oksijen türlerinin artışına ve antioksidan düzeylerinde azalmaya sebep olur. Varikoseldeki klinik derecelerin artışına bağlı olarak bu sistemdeki bozulma daha fazla olmaktadır (41).

Enfeksiyonlar ve Lökospermi

Enfeksiyonların sonucunda meydana gelen lökosit aktivasyonu önemli bir oksidatif stres kaynağıdır. Her ejakulatta belli miktarda lökosit olmasına rağmen enfeksiyonlar sonucu bu sayı artar. Bu da lökospermi olarak adlandırılır. Semendeki bu lökosit artışının motilite, morfoloji ve konsantrasyon gibi farklı semen parametrelerine etkisi olduğu gösterilmiştir (41).

Alkol ve Tütün

Alkole ilgili sıçanlarda yapılan bir araştırma sonucunda kronik alkol alımının sonucu olarak testiste glutatyon miktarında ve SOD aktivitesinde düşüşe sebep olduğu, DNA hasarında ise artışa neden olduğu gösterilmiştir. Farklı çalışmalarda ise kronik etanol kullanımında apoptozun indüklendiği bu artışın Fas ligandı üzerinden gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Yine tütün kullanımının oksidatif stres yaratarak DNA fragmantasyonunda artışa ve sperm motilitesinde azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir (41).

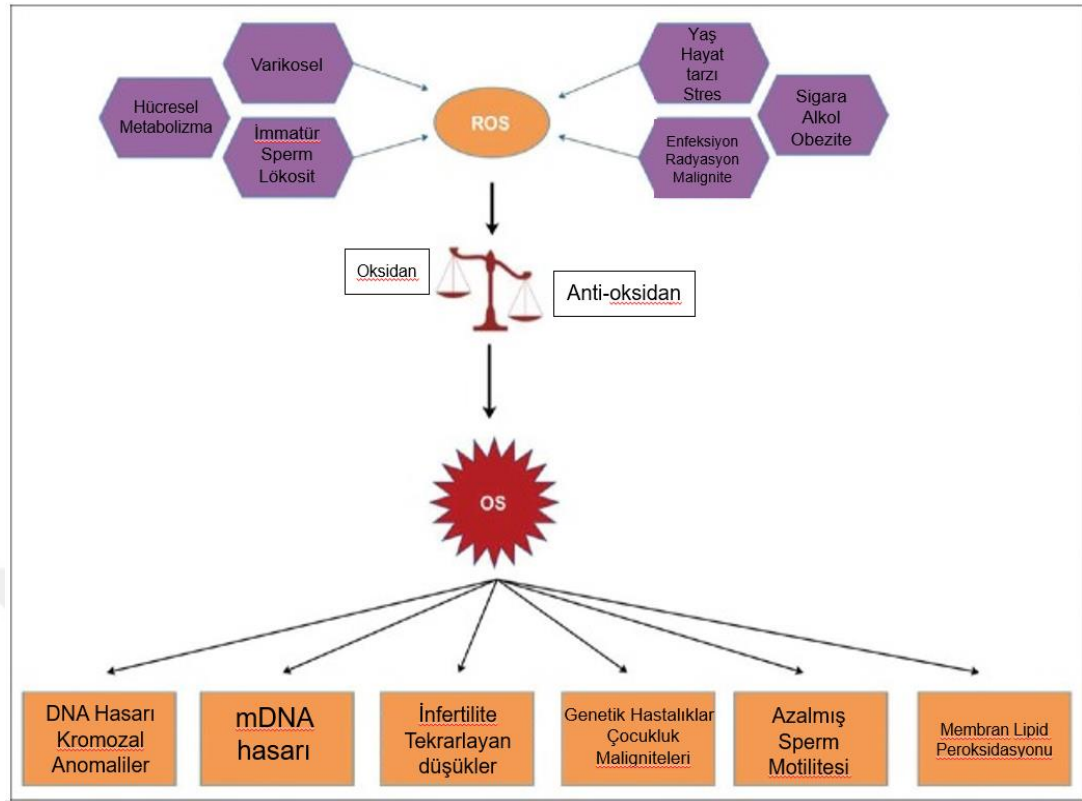
Fiziksel Egzersiz ve Isı Stresi

Yapılan çalışmalarda düzenli egzersizin doğurganlığı arttırdığı vurgulanırken hareketsiz ve sedanter yaşama sahip kişilerde semen parametrelerinin ve sperm kalitesinin bozulduğu gösterilmiştir. Ancak yoğun fiziksel egzersiz ve bisiklet sporlarının bu durumun aksine oksidatif streste artışa ve sperm hareketliliğinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Uzun süre ve sürekli yapılan saunanın ve dar iç çamaşırı kullanmanın ise skrotal ısıyı etkileyerek sperm kalitesini azalttığı gösterilmiştir (41).

Radyasyon ve Çevre Kirliliği

Radyasyon iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan olarak iki grupta tanımlanır. İyonlaştırıcı olmayan radyasyon insan hayatında sıkça kullanılan telefon, mikrodalga fırın ve radarları içerir. Özellikle cep telefonunun yaymış olduğu radyasyonun lipid peroksidasyonunu indükleyerek ROS artışına ve antioksidan kapasitede azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Bunun dışında dizüstü bilgisayarların kullanımı sırasında WIFI ile birlikte DNA hasarında artış ve semen parametrelerinde azalma saptanmıştır (41).

ROS üretiminde artışa ve sperm kalitesinde azalmaya yol açan bir diğer eksojen faktör ise çevre kirliliğidir. Yapılan çalışmalarda trafik kirliliğine maruz kalan kişilerde yapılan sperm analizi sonucu araba egzozundan kaynaklanan dumanın membran lipidlerini etkileyerek, DNA hasarı oluşturarak ve spermatogenezde görevli proteinlerini etkileyerek infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir (41).



Şekil 2.7. : Endojen ve Ekzojen ROS kaynakları (8)

2.12. Semen Genel Yapısı ve Analizi

İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde yapılması gereken ilk şey semen analizidir. Semen içeriğini spermatozoa, prostat ve seminal veziküllerden gelen salgılar oluşturur. Semen içeriğine bakıldığında zaman %1'den azını oluşturan spermatozodur. Ortalama 3-3,5 ml olan semen hacminin de büyük bir kısmını seminal veziküllerden gelen salgı oluşturur. Ejakulatın ilk kısmı spermden zenginken sonraki kısımlarını diğer bezlerden gelen salgılar oluşturur. Seminal sıvı hafif alkali özellik göstermektedir. Seminal sıvının pH değeri 7,2-7,8 arasındadır. Normal aralığın üzerinde olması seminal veziküllerde akut enfeksiyonu ya da ejakulatın fazla bekletilmiş olduğunu gösterirken düşük olması ejakulator kanalın tıkanıklığını gösterir. Bu pH değerinin en önemli özelliği spermatozoanın taşınması ve vajendeki asidik ortamı tamponlamaktır (21,43,44).

Yapılan çalışmalarda semen analiz parametrelerinin ejakulat örneğinin nasıl verildiği, toplama kabının özelliği ve cinsel perhiz süresine kadar birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Semen örneği 2-7 günlük cinsel perhiz

sonrası mastürbasyon ile toplanır. Semen örneğinin tamamı toplama kabına alınmalıdır. Semen örneğinin sıcaklık değişimine ve zaman kaybına sebep olmamak için laboratuvara yakın bir odada bu işlem gerçekleştirilmeli ve örnek 20-37 °C derecede korunmalıdır. Semen örneği alındıktan sonra ise makroskobik olarak hacim, pH, renk, viskozite ve koku gibi fiziksel özelliklerine bakılırken mikroskobik olarak ise sayı, motilite ve morfoloji değerlendirilir. Ardından hesaplanan değerler DSÖ tarafından hazırlanan referans değerler (Tablo 2.2.) ile kıyaslanır (43,45).

Tablo 2.2 : DSÖ 2010'daki normal semen örneğinin özellikleri ve alt sınır değerleri

Parametreler	En düşük referans değeri
Semen volümü (mL)	1,5 (1,4-1,7)
Toplam sperm sayısı (10^6 /ejakülat)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 /mL)	15 (12-16)
Total motilitesi (PR+NP,%)	40 (38-42)
Progressive motilite (%)	32 (31-34)
Sperm canlılığı (%)	58 (55-63)
Morfoloji (%)	4 (3-4)
pH	>7,2

DSÖ tarafından belirlenen referans aralıklarına göre semen örneği incelendikten sonra yukarıda belirtilen parametrelerden birindeki anormalliğe göre patoloji (Tablo 2.3.) tanımlanır. Normozoospermi sperm sayısının, spermdeki hareketliliğin ve morfolojinin normal olmasını kapsar (46).

Tablo 2.3.: Sperm anormalliklerine göre yapılan tanımlamalar (46)

Aspermi	Semen miktarının ve sperm olmaması
Astenozoospermi	ileri hareketli spermelerin (PR) yüzdesi alt referans limitin altında
Astenoteratozoospermi	hem morfolojik olarak normal spermelerin hem de ileri hareketli spermelerin (PR) yüzdesi alt referans limitlerinden düşük
Azoospermi	Ejakullatta sperm olmaması
Kriptoospermi	Ejakullatta sperm olmamasına rağmen santrifüjlenmiş pellette sperm bulunması
Hemospermi/ Lökospermi	Ejakulatta eritrosit/ lökosit bulunması
Nekrozoospermi	Ejekülattaki canlı sperm yüzdesinin referans değerinin altında olması ve hareketsiz/ölü sperm sayısının yüksek olması
Normozoospermi	Normal sperm sayısı, progresif hareketli yüzdesi ve normal morfolojinin referans değerlerinin üstünde olması
Oligoastenozoospermi	Progresif hareketli sperm sayısı ve toplam sperm sayısının referans değerlerinden az olması
Oligoastenoteratozoospermi	Toplam sperm sayısı, progresif hareketlilik ve normal morfoloji referans değerlerinin altında olması
Oligoteratozoospermi	Toplam sperm sayısının ve normal morfoloji referans değerlerinin altında olması
Oligozoospermi	Toplam sperm sayısının referans değerinin altında olması
Tetrazoospermi	Normal morfoloji yüzdesinin referans değerinin altında olması

2.13. İnfertilitenin Tanımı ve Önemi

Klinik olarak gebelik oluşturabilme kapasitesi fertilité olarak tanımlanır. İnfertilite ise 1 yıllık düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması durumu olarak tanımlanır (47). İnfertilite primer ve sekonder olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer infertilite hiç gebelik öyküsü olmaması olarak tanımlanırken sekonder infertilitede daha önce klinik olarak gebelik görülmüş olup güncel durumda bu durumun tekrarlanamamasıdır. Bu durum dünya genelinde yaklaşık 50-80 milyonu etkileyen ve sıkça karşılaşılan bir problemdir. Bu kişilerin ise büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. Çiftlerin %8-12'sini etkilediği ve sadece erkek faktörünün %20-30'unda etkili olduğu görülmektedir. Toplam vakaların ise %50'sinde rol oynadığı düşünülmektedir. Erkek infertilitesinin nedenleri arasında genetik faktörlerden yaşam tarzına, hormonal sebeplerden kullanılan ilaçlara kadar çeşitli etmenler olduğu görülmektedir (48,49).

2.14. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

Erkek infertilitesinin bilinen nedenlerine bakıldığı zaman ürogenital sistemdeki anormallikler, endokrin sebepler ve genetik kusurlar olduğu görülmektedir. Genetik kusurlar incelendiğinde başlıca AZF bölgesindeki mikrodelesyonların olduğu bunun haricinde kromozom anormallikleri, tek gen kusurlarının da eşlik edebileceği saptanmıştır (50). Erkek infertilitesi konjenital ve edinsel hastalığa sekonder olabileceği gibi sağlıklı ve ek hastalığı olmayan bireylerde de görülebilmektedir. Vakaların %30-40'ında sperm parametrelerini bozacak ve bunu açıklayacak bir faktör bulunmaz ve bu durum idiyopatik infertilite olarak adlandırılır. Ejakulattaki spermin anormal olmasına sebep olacak durumlar ise testiküler bir patoloji, testisin uyarılmasındaki veya olgunlaşmasındaki patolojiler (Tablo 2.4.) olabilir (51). Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi sırasında tıbbi özgeçmiş, üreme geçmişi, fiziksel muayene, semen analizi ve hormonal değerlendirme mutlaka yapılması gerekmektedir. Hastanın tıbbi özgeçmiş, fizik muayene bulguları ve semen parametrelerinin değerlendirilmesi sonucunda genetik testler ve görüntüleme yöntemleri tanıya yardımcı olması amacıyla istenebilmektedir (51).

İnfertilite şikayetiyle gelen erkek hastaların değerlendirilmesinde çiftin cinsel aktivitelerine yönelik ayrıntılar, ilişki zamanlaması, sıklığı ve erkek cinsel işlev bozukluğuna yönelik bilgiler öğrenilmelidir.

Genitoüriner enfeksiyon öyküsü, genital travma, geçirilmiş ameliyat ve tıbbi durumlar dahil olmak üzere infertiliteye neden olacak tıbbi özgeçmiş ayrıntılı bir şekilde sorgulanmalıdır. Hastanın kullandığı ilaç geçmişi, sigara, alkol, obezite gibi yaşam tarzındaki risk faktörleri ve çevresel etmenler detaylandırılmalıdır. Total kolesterol ve fosfolipid düzeylerinin daha kötü sperm morfolojisi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Diyabetli kişilerde ise infertilite prevalansının arttığı saptanmıştır. Tıbbi özgeçmişinde otoimmün hastalıklar da mutlaka sorgulanmalıdır. Yapılan çalışmalarda multipl skleroz, romatoid artrit ve otoimmün tiroidit gibi hastalıklar infertil erkeklerde daha fazla görülmektedir (52).

Kronik renal yetmezliği (KRY) olan kişilerde infertilitenin yine sık görülen bir durum olduğu görülmektedir. KRY erkek ve endokrin fonksiyonlar üzerinde negatif bir etki gösterir. Bu sebeple KRY'li hastalarda spermatogenezde bozulma görülebilir. Bu olumsuz etkinin nedenleri arasında testiste gerçekleşen kronik yapısal değişiklikler, HPG akstaki bozulmalar ve bağışıklık sistemindeki bozukluklar olabilir (53).

Tıbbi özgeçmişini sorgulanan hastada bir sonraki adımı ayrıntılı fizik muayene izler. Hastanın genital muayenesi yapılırken bütün yapılar (testis, epididim, vas deferens ve spermatik kord) ayrı ayrı palpe edilmelidir. Sperm üretimi konusunda testis yapısının büyüklüğü ve kıvamı fikir verebilir. Epididimdeki dolgunluk ise post-testiküler bir obstrüksiyonu işaret ederken vas deferensin tek taraflı ya da çift taraflı yokluğu kistik fibrozis açısından ileri tetkik gerekliliğini gösterebilir. Spermatik kord muayenesinde palpasyon ve valsava manevrası ile varikozel varlığı mutlaka bakılmalıdır (54). Ayrıntılı bir tıbbi özgeçmiş sorgulaması ve fizik muayeneden sonra hormonal değerlendirmenin de yapılması infertiliteye neden olacak patolojileri belirlemede rol oynar. İnfertiliteye neden olabilecek durumları belirlerken semen analizindeki sonuçlar da yardımcı olacaktır. Seminal sıvı volümündeki azlık ejakulator kanal tıkanıklıklarına, geçirilmiş mesane boynu cerrahisine, diyabete ya da spinal kord yaralanmalarına bağlı olabilir. Hipogonadotropik hipogonadizm, spermatogenezdeki

genetik bozukluklar, geçirilmiş kabakulak orşiti azospermi ile neticelenebilir. Spermatozoanın yapısal defektleri, genital sistem enfeksiyonları, varikozel astenozoospermiye yol açabilir (21).

Tablo 2.4.: İnfertilite ile birlikte görülebilecek bazı durumlar (21)

Düşük ejakulat volümü	-Geçirilmiş mesane boynu cerrahisi -Retroperitoneal cerrahiler -Ejakulator kanal obstruksiyonu -Diyabetes Mellitus (DM)
Azospermi	A.Hipogonadotropik Hipogonadizm -Kallmann Sendromu -Hipofiz tümörleri B.Spermatogenez bozuklukları -Kromozom bozuklukları -Toksinler, Orşit -İdiyopatik C.Duktal Obstruksiyon -Konjenital bilateral vas deferen ajenizisi,Epididim Obstruksiyonu
Oligoastenoteratozoospermi	-İnmemiş testis -İlaçlar,toksinler,sistemik enfeksiyon -İdiyopatik
Normospermi	-Jinekolojik Bozukluklar -Akrozomal defektler -Antisperm antikorlar -İdiyopatik
Astenozoospermi	-Spermatozoadaki yapısal defektler Antisperm antikorlar -Varikozel -İdiyopatik

2.15. Astenozoospermi

Dünya sağlık örgütünün tanımlamasına göre semen analizinde progresif motilite oranının <32 olması astenozoospermi olarak tanımlanır. İzole astenozoospermi erkek infertilitesinde %19'luk bir oranı kapsarken başka patolojilerle birlikteliği (oligo, terato) %63'lere çıkmaktadır. Yaşam tarzı, ilaç kullanımı, toksinler, ejakulator kanal tıkanıklıkları, uzamış cinsel perhiz varikosel, genital enfeksiyonlar bilinen nedenleri olup idiyopatik de olabilmektedir (55).

2.15.1. Astenozoosperminin Değerlendirilmesi

Astenozoosperminin altında yatan nedenler arasında genetik faktörler hala tam olarak bilinmemektedir. Sperm flagellasındaki defektler ise motilite bozukluklarının en önemli nedenlerinden birisidir. 2 farklı kuyruk sorunu tespit edilmiştir : Non-spesifik flagella anomalisi (NSFAs) ve siliyer diskinezi veya genetik kökenli fibröz kılıfta meydana gelen flagella bozuklukları. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile sperm kuyruğunda bulunan fibröz kılıftaki yapısal defektler saptanabilir. Aksonem ve periaksonem yapıdaki hücre iskeletinde meydana gelen displastik gelişim fibröz kılıftaki yapısal değişikliklere neden olur. Fibröz kılıfta en bol bulunan yapısal proteinler AKAP3 ve AKAP4'dür. Bu nedenle bu proteinlerde meydana gelen yapısal ve genetik defektler motilite bozukluklarına yol açmaktadır. Flagellar patolojiler arasında NSFAs şiddetli astenozoospermide en sık rastlanan patolojidir. Edinilmiş sebepler genellikle NSFAs'a yol açar ve altta yatan etiyoloji düzeltilirse NSFAs düzelir. Bunun sonucunda da spontan gebelik gerçekleşebilir (56,57).

Astenozoospermik erkeklerde farklı mitokondriyal değişiklikler de bildirilmiştir. Bunların arasında sayısal eksiklikler, disorganizasyon, matriks yoğunluğunda artış ve mitokondriyal kılıftaki defektler sayılabilir. Spermin kuyruğundaki orta parçasında meydana gelen mitokondriyal bozukluklar astenozoospermi ile sonuçlanan nadir patolojilerden birisidir (57).

2.15.2. Astenozoosperminin Bilinen Nedenleri

Varikosel

Erkek infertilitesinde birden fazla faktör rol alsa da varikosel en sık görülen bulgudur. Primer infertilitesi olan kişilerde %19-41, sekonder infertilite olgularında

ise %45-81 oranında prevalansı vardır. Varikosel ile birlikte gelen skrotal sıcaklığın artışı, renal ve adrenal kaynaklı metabolitlerin geri akışı, kan akımında azalma ve buna bağlı anoksi/hipoksi düşünülen mekanizmalardır. Varikoseli olan erkeklerde semen analizinde oligospermi, astenospermi, teratospermi ya da bunların birliktelik gösterdiği durumlar karşımıza gelebilir. Varikosel aynı zamanda cerrahi tedavi gerektiren ve cerrahi işlem sonrası semen parametrelerinde düzelme sağladığı gösterilen bir hastalıktır (58).

İnmemiş Testis

İnmemiş testis (kriptorşidizm) yeni doğan erkeklerde gözükken insidansı %2-5 olan konjenital bir anomaliliktir. 3 aylıkken insidansı %1-2'ye kendiliğinden düşmektedir. Fizik muayenede skrotumda ele gelmeyen testis ile saptanmaktadır. İnmemiş testisin en yaygın olarak saptandığı lokalizasyon inguinal kanaldır (%63). İnmemiş testis, erkek infertilitesinin iyi bilinen bir nedeni olup spermatogenezi baskılamaktadır. İnmemiş testis öyküsü olan hastaların semen analizi incelendiğinde oligospermi, astenozoospermi ya da teratospermi ile karşılaşmaktadır (59).

Diyabetes Mellitus (DM)

Diyabetin etkileri uzun vadede birçok organda işlevsel bozukluklara yol açabilir. Erkek üreme sistemi üzerine de diyabetin etkileri bilinmektedir. Spermatogenezin doğru bir işleyişe sahip olabilmesi için glukoz metabolizmasının da doğru işlemesi önemlidir. Olgun sperm oluştuktan sonra da motilite ve kapasitasyon yeteneklerini de etkilemektedir. Diyabetik hastalara bakıldığı zaman sperm motilitesinin, DNA bütünlüğünün ve seminal plasmadaki diğer bileşinler üzerinden sperm kalitesini olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (60).

Yaşam Tarzı Faktörleri

Alkol

Spermatozoanın alkole maruz kalması doza bağımlı olarak sperm motilitesi ve morfolojisi için zararlı bulunmuştur. Alkolün sperm hücresi üzerine etkisi dışında HPG aksın her aşamasına da etkisi bulunmaktadır; GnRH, LH, FSH ve testosteron üretimini azalttığı, testisteki Sertoli ve Leydig hücre disfonksiyonuna neden olduğu

görülmektedir. Sonuç olarak spermatozoa üretimi, morfolojik gelişim ve motilite kazanımında bozulmaya yol açmaktadır (5).

İlaç ve Toksinler

Esrar, kokain, narkotik analjezikler, anabolik steroidler HPG aksını, testisin yapısını ve sperm fonksiyonlarını bozmaktadır. Düzenli esrar kullanımının sperm konsantrasyonunu ve toplam sperm sayısını düşürdüğü ve bu etkinin esrarın başka yasadışı ilaçlarla kullanıldığında arttığı saptanmıştır. Endojen kannabinoid sisteminin regülasyonunda bozulma spermatogenezi ciddi anlamda bozduğu ve bunun da immotil sperm hücreleri ile sonuçlandığı gösterilmiştir (5).

Obezite

Fazla kilo ve obezite, vücut kitle indeksi (BMI) kullanılarak değerlendirilen olması gerekenden fazla yağ birikimi ile ilişkili bir durumdur. Fazla kilolu (BMI 25-30 <math>< \text{kg/m}^2</math>) ve obez (BMI > 30 <math>< \text{kg/m}^2</math>) olan erkeklerde sperm kalitesinin azaldığı ve infertilite oranının arttığı görülmüştür. Obez olan erkeklerde DNA fragmantasyonunun arttığı, anormal morfoloji geliştiği ve mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığı bunun sonucunda da oligospermi, teratospermi ve astenozoospermi ortaya çıktığı bildirilmektedir.

Obez hastalardaki fizyopatolojik süreçte, fazla yağ dokusunun testosteron östrojen dönüşümünü arttırdığı ve buna ikincil olarak da HPG aksı etkileyerek gonadotropin salgılamasında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Yine obezite insülin direncine sebep olarak sistemik inflamasyon ve oksidatif strese yol açabilir. Skrotal yağlanmanın artışı testiküler ısı artışını ve oksidatif stresi tetikleyebilir. Bu mekanizmaların sonucunda meydana gelen oksidatif stres sperm motilitesini, DNA yapısını ve sperm-oosit birleşimini etkilemektedir (5).

Psikolojik Stres

Stres birçok yönden erkeğin üreme sistemine zarar vermektedir. Strese karşı vücudun verdiği yanıt sempatik sistemin aktivasyonudur ve bunun da bir etkisi olarak HPG aksındaki değişimlerdir. Bu stres yanıtı, HPG aksında inhibisyon ve testosteron seviyesinde azalmaya yol açmaktadır. Testosteron salgılanmasındaki değişiklikler

psikolojik stresin spermatogenez üzerinde yarattığı patolojik etkilerin esas nedenidir (5).

Toplamda 29914 katılımcının olduğu 57 kesitsel çalışmanın meta-analizi sonucunda psikolojik stresin sperm motilitesi üzerine negatif etkisi olduğu gösterilmiştir (61).

Sigara

Sigara içmek erkek infertilitesinin azalmasına sebep olan potansiyel bir risk faktörüdür. Özellikle ekzojen ROS kaynağı olan sigaranın azalmış sperm konsantrasyonu, spermin motilitesi ve spermin morfolojisindeki değişikliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir (4).

Sigaranın sperm kalitesi ve motilitesi üzerine etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte oksidatif stres üzerinden gerçekleşen bir mekanizma üzerinden olduğu düşünülmektedir (62). Sigaranın metabolitlerinden kaynaklanan toksinler, spermin kuyruk yapısındaki mitokondriyal aktiviteyi düşürerek hareketliliği etkilemektedir. Özellikle günde 20'den az sigara içen kişilerde daha ağır sigara içen kişilere göre spermiyogramlardaki bozulmanın daha az olduğu saptanmıştır. Bu nedenle sigarayı bırakmak bir yana azaltmanın bile semen parametrelerini iyileştirdiği desteklenmiştir (63). Ağır sigara içen kişilerde aksonal mikrotübüllerde ve flagellumda yapısal değişikliğe yol açtığı görülmüştür (64).

Sigara erkek infertilitesinin bozulmasından sorumlu olmakla birlikte DNA hasarındaki artışa, anöploidilere ve spermde mutasyonlara neden olmaktadır. Sigara içen erkeklerin semen kalitesinde bozulmaya, DNA parçalanma oranlarının artışının ve Chk1 ekspresyonunun azalmasının yol açtığı öne sürülmektedir. DNA hasarına karşılık Chk1'de artış olmaması sperm onarımında bozulmaya bunun sonucunda da apoptoza yol açmaktadır. Sigara içmenin erkek infertilitesine genel etkisi artmış oksidatif stres, DNA hasarı ve artmış hücre apoptozunun birlikte rol aldığı patolojik süreçten kaynaklanır. Bu patolojik sürecin sonunda da azalmış semen kalitesi, bozulmuş spermatogenez ve azalmış sperm hareketliliği ortaya çıkmaktadır (5).

2.16. İnfertil Erkeğin Tedavisi

2.16.1 Bilinen Nedenlere Yönelik Tedaviler

İnfertil erkeğin tedavisi planlanmadan önce doğru tanı koyulmalıdır. Genitoüriner muayenede saptanacak bir varikosel bulgusunun tedavisi testis hacmi ve artmış FSH değerleri ile birlikte değerlendirilerek planlanmalıdır. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi düzeltme, skleroterapi ve embolizasyon gibi teknikler mevcuttur (65).

HPG akstaki ve bu aksın etkilediği hormonal düzendeki bozukluklar sonucu erkeğin fertilizasyonunda patolojiler saptanabilir. Erkek hipogonadizmi primer veya sekonder olabilir. Primer hipogonadizmde esas patoloji testiste olup konjenital ya da edinsel olabilir. Primer hipogonadizmi olan erkeklerde saptanan en yaygın kromozal anomali olan Klinefelter sendromu (47,XXY) şiddetli oligospermiden azospermiye varan geniş bir etkiye sahip olabilir. Bu hastalar nadiren doğal yolla fertilizasyona sahip olmakla birlikte ana tedavi ICSI'de kullanılan testiküler sperm ekstrasyonu (TESE)'dur. Azospermi gösteren Y kromozomu mikrolelesyonlarında da seminifer tübüllerde fokal spermatogenez saptanabilir (65).

Sekonder hipogonadizmi olan olgularda ise patoloji konjenital ya da edinsel olabilir. Patolojinin ana kaynağı hipotalamus veya hipofiz bezi olabilir. GnRH'daki anormal sentez ve salınımın sonucunda azalan FSH ve LH konsantrasyonuna bağlı olarak spermatogenezde ve androjen üretiminde yetersizlik olabilir. Hipofiz bezindeki bir adenomda hormonal sekresyonlar sonucu HPG aksı etkileyebilir. Özellikle prolaktin salgılayan bir hipofiz adenomu GnRH'ın pulsatil salınımını etkileyerek infertiliteye sebep olabilir (65).

Ejakulatta hem spermatozoa hem de spermatogenetik hücrelerin olmaması ve seminal kanalların tıkanıklığı ile karakterize obstrüktif azospermi de önemli bir infertilite nedenidir. Transrektal ultrasonografi, vazografi, semen analizi gibi yöntemlerle tanı konduktan sonra obstrüksiyonun lokalizasyonuna bağlı olarak TESE ya da mikrocerrahi epididimal aspirasyon (MESA) tedavi olarak uygulanabilir (65).

2.16.2. İdiyopatik İnfertilite ve Non-Spesifik Tedaviler

İdiyopatik oligoastenoteratozoospermili hastalar için çeşitli ilaçların kullanımı (antiöstrojenler, aromataz inhibitörleri, pentoksifilin, vitaminler (A,C,E), arginin, karnitin) mevcuttur. Tamoksifen ve klomifen gibi antiöstrojen ilaçların kullanılmasındaki amaç FSH ve LH salınımını dolaylı olarak uyarmaktır. Aromataz inhibitörleri ise testosteronun estradiole dönüşümünü engelleyerek testisteki testosteron düzeyini arttırlar. Testosteron seviyesi düşük olan ve yüksek estradiol seviyeleri olan hastalarda bu tedavi uygulanarak spermatojenik aktivite artırılabilir (65).

Pentoksifilin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda ise sperm motilitesinin ve konsantrasyonunun iyileştirildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte ilacın kullanımı in vitro olarak doğrulanmış olsa da in vivo ile ilgili sonuçlar belirsizdir. İdiyopatik infertilite tedavisinde kullanılan diğer ampirik tedaviler gibi uygun seçim kriterleri belirlenerek kullanılabilir (65).

Yüksek ROS seviyeleri ile ilişkilendirilmiş infertilitede ise antioksidan tedaviler kullanılmaktadır. Antioksidan tedavi sonrası ROS'un yarattığı DNA hasarı azaltılabilir ve fertilizasyon yeteneği artırılabilir. Antioksidan etki gösteren ajanlar tokoferol (E vit), askorbik asit (C vit), asetilsistein ve glutatyondur. Bu ajanların IVF'deki fertilizasyon başarısını arttırdığı görülmüştür. Glutasyon oral kullanımdan sonra seminal plasmaya ulaşarak etkisini gösterebilir. Glutasyon uygulaması sonrası sperm hareketliliğinde ve morfolojide iyileşme olduğu görülmüştür (65).

Erkek infertilitesinde verilen tedaviler belli bir zaman aralığından sonra fertilizasyonu sağlamıyorsa yardımcı üreme teknikleri (YÜT) kullanılır. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) infertil erkeklerdeki son tedavi yöntemidir. Epididimden (MESA) ya da testisten (TESE) alınan bir sperm örneği fertilizasyonu mümkün kılabilir. FSH'nın spermatogenetik süreçlerdeki rolü önemli olduğu için YÜT'de sperm morfolojisini ve bunun sonucunda fertilizasyon oranlarını iyileştirmek için FSH kullanılmaktadır. FSH'nın bu tedavideki amacı spermdeki DNA yoğunlaşmasının sağlanması, motiliteyi iyileştirmesi ve hücre ölümünü azaltmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza, ESOGÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın 24.11.2020 tarihli ve 30 sayılı kararı ile onay alındıktan sonra başlandı. Hastalar, çalışmaya dahil edilmeden önce çalışma protokolü konusunda bilgilendirilip aydınlatılmış onam alındı. Polikliniğimize infertilite nedeniyle başvuru yapan erkek hastalarda anamnez, fizik muayene, sigara içiciliğinin sorgulanması, hormon paneli ve semen analizi sonuçlarının değerlendirilmesinin ardından idiyopatik astenozoospermi saptanan hastalar tespit edildi.

Çalışmada gönüllüler, kontrol grubu ve iki hasta grubu olmak üzere başlıca üç gruba ayrıldı. (Grup başına 15'er kişi) Kontrol grubu sigara kullanımı olmayan, normospermik (sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi normal) gönüllülerden; hasta grupları ise sigara kullanımı olan veya olmayan, semen analizinde astenozoospermi tespit edilen gönüllülerden oluşturuldu. Astenozoospermiyi açıklayabilecek hormonal patolojiler, testis tümörü, varikosel, inmemiş testis öyküsü gibi etiyolojik faktörü olanlar ve sperm sayısı referans aralığının altında olanlar çalışmaya dahil edilmedi.

Hastaların değerlendirilmesi için öncelikle infertilite şikayetiyle başvuran hastalardan üroloji polikliğinde anamnez alındı, hastalara fizik muayene yapıldı ve veri kayıt formu dolduruldu. İnfertilite şikayetiyle başvuran hastalardan sperm analizi sonucu astenozoospermi olarak raporlananlara en az 2 kez daha sperm analizi yapılarak bu tanıları doğrulandı. . Bu hastalarda rutin olarak FSH, LH, Testosteron, Prolaktin ve Estradiol'den oluşan hormon paneli bakıldı.

Çalışmaya dahil olma şartlarını yerine getiren hastaların semen örneklerinden sperm örnekleri elde edilerek ESOGÜ Biyokimya AD'da -80 °C'de saklandı. Bu izole sperm örneklerinde aşağıda detayları verilen Real-Time PCR (qPCR) ve Western-Blot analizleri gerçekleştirilerek çalışma kapsamında belirtilen motilite ile ilişkili proteinlerin (semg1, semg2, klk2 ve akap4) sigara kullanımı ile olası ilişkisi araştırıldı.

3.1.Kullanılan Cihazlar

- ❖ Vorteks Karıştırıcı: DragonLab MX-S Vortex Mixer
- ❖ Derin Dondurucu: Thermo Scientific, ULT 1386-5-V40
- ❖ Soğutmalı Santrifüj: Jouan MR22 Refrigerated Centrifuge

- ❖ UV-Vis Spektrofotometre: NanoDrop™ 2000/2000c, Thermo Scientific
- ❖ Florometre: Denovix QX Fluorometer
- ❖ PCR Cihazı: SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fischer
- ❖ QPCR Sistemi: StepOnePlus™ Real-Time PCR System
- ❖ Elektroforez Cihazı: Invitrogen Mini Gel Tank, Thermo Fisher Scientific
- ❖ Western Cihazı: iBind™ Flex, Thermo Fischer Scientific
- ❖ Blotlama Cihazı: iBlot™ 2 Dry Blotting System, Thermo Fisher Scientific
- ❖ Görüntüleme Sistemi: GEN-BOX ImagER CFx Western Blot Scanner
- ❖ Otoanalizör: Roche Cobas e801 Module, Roche Diagnostics

3.2. Biyokimyasal ve Moleküler Analizler

3.2.1 Hormon Düzeyleri

Gönüllülerden vakumlu jelli tüplere alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Serum örneklerinde FSH, LH, Testosteron, Estradiol ve Prolaktin hormon düzeyleri Roche Cobas e801 Otoanalizör (Mannheim, Almanya) yardımıyla Elektrokemilüminesans İmmun Ölçüm prensibine dayalı olarak ölçüldü. Sonuçlar FSH ve LH için mIU/mL, Testosteron için ng/dL, Prolaktin için ng/mL, Estradiol için ise pg/mL cinsinden verildi.

3.2.2 Real-Time PCR Analizleri

RNA İzolasyon Prosedürü

PCR analizleri için sperm örneklerinden ticari RNA izolasyon kiti (A.B.T.™; cat #102-01-05) kullanılarak total RNA izole edildi. İzolasyon işlemleri için her bir örnek başına 500 µl Tampon L ve 10 µl Merkuptoetanol olacak şekilde Lizis tamponu hazırlandı. Sperm örnekleri üzerine 200 µl PBS, 10 µl Proteinaz K ve 500 µl Lizis tamponu eklenerek 2 dakika vortekslendi. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi; üzerine 500 µl Tampon P eklenerek iyice vortekslendi ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışıma 200 µl Kloroform: izoamilalkol (49:1) karışımı eklendi; alt-üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Karışım soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası en üstte bulunan sıvı fazdaki süpernatant (yaklaşık 600 µl) yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 1.25 kat hacimde (yaklaşık 800 µl) saf etanol (%99.8) eklendi ve pipetleme yapılarak karıştırıldı. Elde edilen lizatin 700 µl'si spin kolona transfer

edildi ve oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında koleksiyon tüp içeriği döküldü ve kolon tekrar tüpe yerleştirilerek tüm lizatlar kolona transfer edilinceye kadar bu basamak tekrarlandı. Kolonun üzerine 700 µl Yıkama Tamponu I eklendi ve oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüp içeriği döküldü ve kolon tüp üzerine yerleştirildi. Kolonun üzerine 600 µl Yıkama Tamponu II eklendi ve oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüp içeriği döküldü ve kolon tüp üzerine yerleştirildi. Kolonun üzerine tekrar 600 µl Yıkama Tamponu II eklendi ve oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüp içeriği döküldü ve kolon tüp üzerine yerleştirildi. Kolon 1 dakika süreyle maksimum hızda santrifüj edilerek kolonda kalan yıkama tamponunun uzaklaştırılması sağlandı ve kolon 1,5 ml'lik yeni tüp üzerine yerleştirildi. Kolonun merkezine olacak şekilde 50 µl 65-70 °C'de önceden ısıtılmış RNaz içermeyen su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerde izole RNA örnekleri elde edildi ve örneklerdeki RNA miktarı NanoDrop cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her bir örneğin saflık kontrolü için A260/A280 oranı kullanıldı.

cDNA Sentez Prosedürü

RNA İzolasyonu sonrası elde edilen örneklerdeki RNA miktarları ölçüldükten sonra örnekler ticari cDNA sentez kiti (VitaScript™ FirstStrand cDNA Synthesis Kit; cat #PCCSKU1301) kullanılarak cDNA'ya çevrildi. cDNA sentez işlemleri için RNA miktarları belirlenen örneklerin her birinden 200 ng alınacak şekilde hesaplama yapılarak her bir numuneden ne kadar hacimde pipetlenmesi gerektiği belirlendi. Tüm kit bileşenleri -20 °C buzdolabından çıkarılarak çözüldü, hafifçe karıştırıldı ve buz üzerinde tutuldu. Potansiyel DNA kontaminasyonunu kontrol etmek için VitaScript™ Ters Transkriptaz içermeyen negatif kontrol reaksiyonu çalışıldı (Enzim mix yerine 1 µl nükleaz içermeyen dH₂O kullanıldı). Steril bir tüp alınarak bir örnek başına 4 µL 5X VS Reaksiyon Tamponu ve 1 µL Enzim-Miks olacak şekilde örnek sayısının birkaç fazlası kadar katı ile çarpılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Pipetle çek-bırak yapılarak hafifçe karıştırıldı ve striplere 5'er µL hacimde dağıtıldı. Son total hacim 20 µL olacak şekilde yukarıda hesaplanan çekilecek numune hacmi µLsi + 5 µL toplanarak 20 µL'den çıkarıldı ve eklenecek RNaz içermeyen su hacmi bulundu. Striplere pipetlenen 5 µL'lik karışımın üzerine, hesaplanan hacimlerde numune ve su

ilave edilerek çek-bırak işlemi yapıldı. Stripler SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied biosystems, Thermo Fischer) cihazına yerleştirildi ve cDNA Data Sheet'e uygun olacak şekilde reaksiyon kuruldu. Reaksiyon sonucunda deney gruplarındaki her bir hastaya ait cDNA örnekleri elde edildi ve analiz gününe kadar -20 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

Real Time-PCR (qPCR) Prosedürü

qPCR analizleri için β -aktin (kontrol geni), klk2, akap4, semg1 ve semg2 markırlarının liyofilize formlardaki "forward" ve "reverse" primerlerinin her birinden, kullanım klavuzları (Sentebiolab, Ankara)'nda belirtilen hacimlerde, nükleaz içermeyen su kullanılarak 100 μ M'lık stok primer solüsyonları hazırlandı. Çalışma sırasında stok primer solüsyonları 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı. PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.1. : PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri

Markır	Primer Dizisi	
β -AKTİN	Forward	5'-GCC AAC TTG TCC TTA CCC AGA-3' (21 bp)
	Reverse	5'-AGG AAC AGA GAC CTG ACC CC-3' (20 bp)
KLK2	Forward	5'-CTC TCC ATC GCC TTG TCT GT-3' (20 bp)
	Reverse	5'-CTT CTC ACA CTC CCA GCC TC-3' (20 bp)
SEMG1	Forward	5'- TCC AGG CAC CAA ATC CTA AGC-3' (21 bp)
	Reverse	5'- ATC CAA TCC CCC ATG AGA TCC-3' (21 bp)
SEMG2	Forward	5'-ACT ATG GAG GAA AGA GCA CGC-3' (21 bp)
	Reverse	5'-AGT AGG TCT TGT TTG CTA TCT GC-3' (23 bp)
AKAP4	Forward	5'-ACA TCA TTC CAG GGT CCT ACA-3' (21 bp)
	Reverse	5'-CAG GGT GGA CAC ATC GAC AA-3' (20 bp)

qPCR reaksiyonu için bir örnek başına 10 μ L SYBR-Green Master Mix (A.B.T.™; cat #Q03-02-01), 0.7 μ L forward primer (dilüe), 0.7 μ L reverse primer (dilüe) ve 6.6 μ L nükleaz içermeyen su olacak şekilde karışım hazırlandı. Kuyucukların her birine bu karışımdan 18 μ L ve 200 ng cDNA içeren örneklerden 2 μ L pipetlenerek toplam hacim 20 μ L'ye tamamlandı. Plate üzerine Adhesive Seal dikkatle yapıştırılarak aplikatör yardımıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde iyice yapışması sağlandı ve cihaza yerleştirildi. Semg1, semg2, klk2 ve akap4 markırları ve ayrıca kontrol geni olan β -aktin için StepOnePlus™ Real-Time PCR cihazında uygun prosedür kuruldu ve

mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi. İlgili markırların mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre kaç kez arttığı ya da azaldığı β -aktin ekspresyonu internal kontrol olarak kullanılarak relatif olarak belirlendi. Bu amaçla, kontrol ve hasta gruplarına ait β -aktin ve diğer markırlar için Ct değerleri ölçüldü. Her bir markırım Ct değerlerinden β -aktin Ct değerleri çıkarılarak Δ Ct (Delta Ct) değerleri hesaplandı. Δ Ct değerlerinden kontrol grubunun ortalama Δ Ct değeri çıkarılarak $\Delta\Delta$ Ct değerleri bulundu. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü üzerinden hesaplanarak verildi.

3.2.3. Western-Blot Analizleri

Protein İzolasyon Prosedürü

Western-Blot analizleri için her biri 15 hastadan oluşan gruplara ait sperm örnekleri 5'erli rastgele alt gruplar halinde birleştirilerek havuz oluşturuldu ve protein izolasyonları ticari kit (RIPA Lysis Buffer System, ChemCruz™; cat #sc-24948) prosedürüne uygun olarak yapıldı. Protein izolasyonu için Çalışma Solüsyonu hazırlandı. Bunun için 3 ml RIPA lizis tamponu, 10 μ l proteaz inhibitör kokteyli, 10 μ l Na-orthovanadate ve 10 μ l PMSF karıştırıldı ve sperm örnekleri üzerine 400 μ l pipetlenerek vortekslendi. Soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak protein miktar tayini için 1:50 oranında seyreltildi.

Protein izolasyonu sonrası elde edilen örneklerdeki protein miktar tayini için ticari kit (Qubit™ Protein Assay Kit; Thermo Scientific™; cat #Q33211) prosedürüne uygun olarak Çalışma Solüsyonu hazırlandı. Solüsyon örnek başına 199 μ l protein tamponu ve 1 μ l protein reagent olacak hacimde toplam örnek sayısına göre hazırlandı. Standartlar için 190 μ l solüsyon ve 10 μ l standartlardan (0, 200 ve 400 ng/ μ l) pipetlendi. Numuneler için ise 198 μ l solüsyon ve 2 μ l süpernatant pipetlendi. 15 dakika karanlıkta inkübasyon sonrasında DeNovix marka florometre cihazında protein konsantrasyonu ölçümleri yapıldı. Örnekler için protein konsantrasyonları standart ölçümleri üzerinden hesaplandı. Jele yüklenecek her bir örneğin protein miktarı 50 μ g olacak şekilde orantı kurularak hesaplamalar yapıldı ve elektroforez işlemlerine geçildi.

Western-Blot Prosedürü

Elektroforez işlemleri için ependorflara her bir örnek başına 2.5 µL LDS örnek tamponu, 1 µL redükleyici ajan, 50 µg protein hesabına göre belirlenen örnek ve su pipetlenerek jeldeki her bir kuyucuğa yüklenecek final hacim 10 µL olacak şekilde ayarlandı. Örnekler jele yüklenmeden önce 70 °C’de 10 dakika bekletilerek denatüre edildi. SDS Yürütme Tamponu (20X) solüsyonu 1X olacak şekilde seyreltildi ve elektroforez tankına dolduruldu. Protein örnekleri ve protein standardı (Seebblue Plus2 prestained standard, ThermoFischer Scientific; cat. #LC5925) %4-12 Bis-Tris poliakrilamid jele yüklendi. β-aktin, klk2, akap4, semg1 ve semg2 proteinleri için ayrı ayrı jellere yüklemeler yapıldı. 200 Volt ve 500 mA’da 30 dakika süreyle elektroforez yürütülerek proteinler jel üzerinde ayrıştırıldı.

Yürütme işlemi ardından elde edilen jellerdeki proteinlerin nitroselüloz membranlara transfer işlemi iBlot™ 2 Dry Blotting System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) cihazında gerçekleştirildi. Transfer işlemi tamamlandığında membranlara, ticari iBind™ Flex Solution Kit (Invitrogen™; cat # SLF2020) kullanılarak bloklama işlemi gerçekleştirildi. Kit prosedürüne uygun olarak, 10 ml iBind Flex 5X buffer, 39.5 ml dsu ve 0.5 ml iBind Flex 100X Additive eklenerek iBind™ Flex solüsyonu (1X) hazırlandı. Membran bu solüsyon içerisinde karanlık ortamda 15 dakika bekletildi. β-aktin, klk2, akap4, semg1 ve semg 2 proteinlerine özgü primer (1:1000) ve sekonder (1:250) antikorlar -20 °C’den çıkarılarak aynı solüsyonla seyreltildi (1998 µl solüsyon + 2 µl primer antikor; 1992 µl solüsyon + 8 µl sekonder antikor). iBind™ Flex kartı iBind™ Flex Western cihazına yerleştirildi; kart üzerine 10 mL 1X iBind™ Solüsyonu uygulanarak kartın tamamen ıslanması sağlandı.

Membranların yerleştirileceği bölgeye tekrar bu solüsyon uygulandı; membranlar yerleştirilerek hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Cihazda yer alan kuyucuklara 2 ml dilüe primer antikor, 2 ml iBind™ Flex solüsyonu (1X), 2 ml dilüe sekonder antikor ve 6 ml iBind™ Flex solüsyonu (1X) pipetlendi. Pipetlemeler sonrasında cihaz kapatılarak 2.5 saat süreyle beklemeye bırakıldı. Bu antikor bağlama işlemi sonrasında membranlar çıkarılarak dsu ile yıkandı (daha temiz görüntü için blocking solüsyonuna konuldu). Bu aşamada, ışımaya ve bantların görüntülenmesini sağlayan Elektrokemilüminesans solüsyonu ticari kit (Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific™; cat #32132) kullanılarak hazırlandı. Bunun

için 1 ml Luminol/Enhancer solüsyonu ve 1 ml Peroksidaz solüsyonu (1:1) pipetlenerek membran bu solüsyona alındı. Membran üzerine solüsyon pipetle çek-bırak yapıldı ve karanlık ortamda 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında GEN-BOX ImagER CFX cihazında görüntüleme işlemine geçildi. Cihaza yerleştirilen membranın fotoğrafları bilgisayar programıyla çekilerek kaydedildi. Bantların dansitesinin hesaplanmasında ImageJ programı kullanıldı ve sonuçlar her bir markırlar için β -aktine oranlanarak verildi.

3.3. İstatiksel Analiz

Her grup için yaş, semen analizi, hormon paneli, sigara kullanımı, pcr ve western blot analizleri kayıt altına alındı. Verilerin analizi SPSS 26.0 programı ile yapılmış ve %95 güven düzeyi ile çalışılmıştır. Kategorik (nitel) değişkenler için frekans (n) ve yüzde (%), sayısal (nicel) değişkenler için ortalama (X), standart sapma (ss), minimum, maksimum, medyan (M) istatistikleri verilmiştir. Çalışmada her bir grupta 15 örnek bulunması nedeniyle (normal dağılım varsayımı için Merkezi Limit Teoremine göre 30 örnek gereklidir) parametrik olmayan yöntemler kullanılmıştır. Çalışmada sayısal ölçümlerin gruba göre farklılık göstermesi (ikili) Mann Whitney testi, (üçlü) Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir. Ölçümler arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon ile test edilmiştir. Mann Whitney; bağımsız iki grubun sayısal ölçüm bakımından karşılaştırılmasında kullanılan test tekniğidir. Kruskal Wallis; bağımsız k ($k>2$) grubun sayısal ölçüm bakımından karşılaştırılmasında kullanılan test tekniğidir. Spearman Korelasyon; iki nicel ölçüm arasındaki ilişkinin yönünün ve gücünün belirlenmesinde kullanılan test tekniğidir. Gruplar arası karşılaştırma analizleri dışında ölçümler arası ilişkiler her grup için ayrı test edilmiştir

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen kontrol grubundaki normospermik 15 kişi, astenozoospermik ve sigara kullanımı olan 15 kişi veya sigara kullanımı olmayan 15 kişinin yaşları, cinsel perhizleri ve semen analizleri gruplar içinde analiz edildi.

Normospermik gruptaki kişilerin yaş ortalaması 31,47 (25-40), sigara kullanımı olan gruptaki hastaların yaş ortalaması 32,6 (24-41) ve sigara kullanımı olmayan gruptaki hastaların yaş ortalaması 35 (25-45) olarak saptandı. Gruplar arasında yaş açısından anlamlı bir fark bulunmadı. (Tablo 4.1.)

Tablo 4.1.: Ölçümlerin Gruplara Göre Çoklu Karşılaştırılması (Yaş ve Semen Analizi)

	Normospermi		Asteno,sigara(+)		Asteno,sigara(-)		P
	Max-Min(M)	Ort±ss	Max-Min(M)	Ort±ss	Max-Min(M)	Ort±ss	
Yaş	40-25 (33)	31,47±4,78	41-24 (31)	32,6±5,44	45-25 (33)	35±6,29	0,332
Cinsel perhiz	7-3 (4)	4,2±1,32	6-3 (4)	4,27±0,8	7-3 (5)	4,87±1,19	0,156
Sperm sayısı	147-18 (65)	59,73±32,19	69-15 (33)	33,87±16,08	91-15 (26)	34,73±22,37	0,014*
Ejakulat hacmi	7-1 (3)	3,33±1,73	4-0,5 (2)	1,99±1,01	6-0,2 (2,5)	2,81±1,61	0,063
Toplam motil	91-51 (76)	76,67±11,35	59-0 (31)	30,87±16,61	49-23 (33)	33,47±7,08	0,000*
İleri motil	87-42 (73)	70,6±12,83	30-0 (15)	12,87±10,7	28-0 (14)	14,4±8,12	0,000*
Morfoloji	25-4 (10)	12,2±6,84	26-4 (16)	13,8±7,49	19-4 (6)	8,07±5,13	0,052

*p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

Bu hastalardan semen analizi sonrasında yapılan ve çalışmaya dahil olma kriterlerinden hormon panelinin araştırılması için hastalardan FSH, LH, Estradiol, Testosteron ve Prolaktin hormonları bakıldı.

Tüm hastaların hormon değerlerinin referans aralığında olduğu tespit edildi. Gruplar arasında hormon değerleri açısından anlamlı fark görülmedi. (Tablo 4.2.)

Tablo 4.2. : Ölçümlerin Gruplara Göre Çoklu Karşılaştırılması (Hormon paneli)

	Normospermi		Astenozoospermi Sigara(+)		Astenozoospermi Sigara(-)		P
	Max-Min(M)	Ort±ss	Max-Min(M)	Ort±ss	Max-Min(M)	Ort±ss	
FSH (mIU/mL)	8,9-1,7 (7,46)	6,25±2,4	9,3-1,6 (4,5)	4,8±2,75	10,9-0,8 (5,3)	5,62±2,7	0,405
Estradiol (pg/mL)	34,9- 13,4 (23,9)	25,23±6,3	37,9-10,2 (25,7)	24±8,66	38,7-14,4 (21,3)	24,67±8,5 3	0,914
LH (mIU/mL)	8,4-2,1 (4,1)	5,15±2,06	8,5-2,1 (5,4)	4,93±2,33	8,5-2,8 (5)	5,1±1,67	0,914
Testosteron (ng/dL)	3140- 249 (365)	559,93±71 7,06	894-254 (356)	426,93±17 6,29	520-258 (362)	385,13±8 4,96	0,996
Prolaktin (ng/mL)	23,4- 7,58 (10,3)	10,79±3,85	23,4-7,6 (12,5)	13,41±4,5 4	23,4-7,2 (11,1)	12,35±4,0 5	0,093

*p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

Yapılan semen analizi ve hormon paneli sonrasında çalışmaya dahil edilen hastaların sperm örneklerine Seng1-2, Klk-2 ve Akap4 proteinlerinin araştırılması için PCR ve Western Blot analizi yapıldı. (Tablo 4.3.)

Tablo 4.3: Ölçümlerin Gruplara Göre Çoklu Karşılaştırılması (Seng1-2, Klk-2 ve AKAP4 proteinleri için yapılan PCR ve Western Blot analizi)

	Normospermi		Asteno,sigara(+)		Asteno,sigara(-)		P
	Max-Min(M)	Ort±ss	Max-Min(M)	Ort±ss	Max-Min(M)	Ort±ss	
Akap4 (kat değişimi)	16,83-0,34 (1,2)	2,8±4,16	13,4-0 (0,8)	1,65±3,31	9,4-0,3 (0,9)	1,96±2,44	0,108
Seng1 (kat değişimi)	558,8-43,5 (130,64)	195,06± 159,49	1582,3-8,4 (172,3)	321,9±517 ,43	431,4-18 (128,8)	152,16±1 12,51	0,830
Seng2 (kat değişimi)	17,65-1,31 (6,03)	6,69±4,6 3	25,7-0,9 (4,2)	6,11±6,39	14,1-1,5 (4,6)	5,55±3,85	0,671
Klk2 (kat değişimi)	2,54-0,19 (1,17)	1,2±0,7	12-0,4 (1)	2,06±3,14	3,1-0,3 (1)	1,26±0,78	0,946
Akap4/ β-aktin	0,78-0,413 (0,728)	0,64±0,1 7	4,7-0 (0,8)	1,84±2,12	2,5-0,4 (0,6)	1,16±0,96	0,480
Seng2/ β-aktin	0,588-0,184 (0,243)	0,34±0,1 8	3,8-0,1 (0,2)	1,35±1,78	1,7-0,2 (0,6)	0,82±0,67	0,181
Klk2/ β-aktin	7,32-4,853 (6,763)	6,31±1,0 9	16,3-4 (8,9)	9,72±5,22	15,7-3,1 (4,8)	7,88±5,8	0,111

*p<0,05 anlamlı fark var, p>0,05 anlamlı fark yok; Kruskal Wallis testi

Gruplar arasında sperm sayısı, toplam motilite, ileri motilite ölçümleri bakımından istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Normospermi grupta Sperm sayısı (59,73), Toplam motil (76,67), İleri motil (70,6) ölçüm sonuçları en yüksek; sigara içen grupta Sperm sayısı (33,87), Toplam motil (30,87), İleri motil (12,87) sonuçlarının ise en düşük olduğu tespit edildi.

Diğer ölçümler için gruplar arası farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Bu verilerin değerlendirilmesi sonrasında gruplar kendi içinde 2'şerli gruplandırılarak bir kez daha istatistiksel analizi yapıldı. (Tablo 4.4.)

Tablo 4.4.: Ölçümlerin Gruplara Göre İkili Karşılaştırılması

	Normospermi- Asteno,sigara(+)	Normospermi- Asteno,sigara(-)	Asteno,sigara(-)- Asteno,sigara(+)
Yaş	0,617	0,176	0,271
Cinsel perhiz	0,439	0,083	0,163
Sperm sayısı	0,009*	0,016*	0,835
Ejakulat hacmi	0,022	0,436	0,125
Toplam motil	0,000*	0,000*	0,547
İleri motil	0,000*	0,000*	0,802
Morfoloji	0,693	0,047	0,029
FSH	0,220	0,467	0,406
Estradiol	0,709	0,740	0,884
LH	0,678	0,917	0,755
Testosteron	0,983	0,950	0,934
Prolaktin	0,046	0,101	0,520
Akap4 (kat değişimi)	0,042	0,237	0,300
Semg1 (kat değişimi)	0,633	0,604	0,787
Semg2 (kat değişimi)	0,395	0,534	0,787
Klk2 (kat değişimi)	0,868	0,950	0,709
Akap4/ β -aktin	0,115	0,599	0,599
Semg2 / β -aktin	0,115	0,599	0,115
Klk2 / β -aktin	0,115	0,115	0,115

* $p<0,017$ anlamlı fark var, $p>0,017$ anlamlı fark yok; Mann Whitney testi (Bonferroni düzeltmeli)

Normospermi grup ile Asteno/sigara içmeyen grup arasında Sperm sayısı, Toplam motil ve İleri motil ölçümleri bakımından istatistiksel anlamlı fark dikkat çekti ($p<0,017$). Diğer ölçümlerde bu farklar anlamlı değildi ($p>0,017$). Asteno/sigara içen grup ile Asteno/sigara içmeyen grup arasında tüm ölçümler bakımından farklar anlamlı değildi ($p>0,017$).

Tablo 4.5. : Sperm Sayısı, Ejakulat Hacmi, Motil Ölçümlerinin Ölçümler ile İlişkisi

Grup	Ölçüm	Sperm sayısı	Ejakulat hacmi	Toplam motil	İleri motil
Normospermi	Yaş	0,047	-0,107	0,018	0,056
	Cinsel perhiz	0,079	0,332	-0,074	0,075
	Morfoloji	-0,222	-0,290	-0,235	-0,176
	FSH	0,007	-0,151	0,031	0,041
	Estradiol	0,184	-0,046	0,258	0,194
	LH	-0,212	0,028	-0,367	-0,264
	Testosteron	0,263	-0,290	0,417	0,306
	Prolaktin	-0,199	-0,244	-0,455	-0,430
Astenozoospermi Sigara (+)	Yaş	-0,257	0,235	-0,227	-,562*
	Cinsel perhiz	0,350	0,137	0,367	0,212
	Morfoloji	0,053	0,493	0,397	0,107
	FSH	-0,441	-,658*	-0,034	-0,339
	Estradiol	-0,254	-0,364	-,577*	-0,317
	LH	-0,183	-0,328	-0,046	-0,055
	Testosteron	0,434	-0,177	-0,012	0,211
	Prolaktin	0,122	0,119	0,259	-0,081
Astenozoospermi Sigara (-)	Yaş	0,018	-0,051	0,067	0,041
	Cinsel perhiz	0,062	0,262	-0,097	0,018
	Morfoloji	-0,291	-0,145	0,264	-0,196
	FSH	-,605*	0,434	-0,265	-0,130
	Estradiol	-0,434	0,347	-,621*	0,157
	LH	-0,065	0,124	0,104	-0,145
	Testosteron	-0,304	0,407	-0,425	0,146
	Prolaktin	-0,110	0,191	0,362	-0,270

* $p < 0,05$ anlamlı ilişki var, $p > 0,05$ anlamlı ilişki yok; Spearman Korelasyon testi

Normospermi grupta sperm sayısı, ejakulat hacmi, motil ölçümleri ile yaş, cinsel perhiz, morfoloji, FSH, Estradiol, LH, Testosteron ve Prolaktin ölçümleri arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadı ($p > 0,05$).

Astenozoospermik ve sigara içen grupta ejakulat hacmi ile FSH ölçümü arasında negatif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu ($r = -0,658$; $p < 0,05$). Toplam motil ile Estradiol ölçümü arasında negatif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu ($r = -0,577$; $p < 0,05$). İleri motil ile yaş arasında negatif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki görüldü ($r = -0,562$; $p < 0,05$). Diğer ölçümler ilişkili değildi ($p > 0,05$).

Astenozoospermik ve sigara içmeyen grupta ejakulat hacmi ile FSH ölçümü arasında negatif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu ($r = -0,658$; $p < 0,05$). Sperm sayısı ile FSH ölçümü arasında negatif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu ($r = -$

0,605 ; $p < 0,05$). Toplam motil ile Estradiol ölçümü arasında negatif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki tespit edildi ($r = -0,621$; $p < 0,05$). Diğer ölçümler ilişkili değildi ($p > 0,05$).

Tablo 4.6.: PCR Analizinin Ölçümler ile İlişkisi

Grup	Ölçüm	Akap4 (kat değişimi)	Semg1 (kat değişimi)	Semg2 (kat değişimi)	Klk2 (kat değişimi)
Normospermi	Yaş	-0,179	-0,135	-0,263	0,065
	Cinsel perhiz	-0,488	-0,324	-0,356	-0,375
	Sperm sayısı	0,143	-0,075	-0,061	-0,039
	Ejakulat hacmi	-0,291	0,135	-0,005	-0,466
	Toplam motil	-0,073	0,097	0,331	0,508
	İleri motil	-0,134	-0,081	0,120	0,312
	Morfoloji	-0,048	-0,422	-0,337	0,165
	FSH	0,002	-0,022	0,034	-0,115
	Estradiol	0,029	0,159	0,273	-0,016
	LH	0,149	-0,007	-0,074	-0,265
	Testosteron	0,214	-0,002	-0,063	0,352
	Prolaktin	0,151	-0,007	-0,232	0,002
Astenozoospermi Sigara(+)	Yaş	0,079	0,077	0,371	-0,174
	Cinsel perhiz	-0,025	-0,188	-0,363	0,033
	Sperm sayısı	-0,063	-0,508	-0,484	-0,038
	Ejakulat hacmi	0,428	0,341	0,286	0,326
	Toplam motil	0,064	0,134	0,000	0,154
	İleri motil	0,137	-0,106	-0,189	0,263
	Morfoloji	0,127	0,241	0,347	0,216
	FSH	-0,304	-0,018	-0,054	-0,345
	Estradiol	-0,214	-0,254	-0,129	-0,256
	LH	0,143	0,370	0,429	0,372
	Testosteron	0,166	-0,018	0,020	,526*
	Prolaktin	-0,120	-0,052	0,143	0,272
Astenozoospermi Sigara(-)	Yaş	0,002	-0,021	0,005	0,006
	Cinsel perhiz	-0,418	-0,006	-0,129	-0,245
	Sperm sayısı	-0,265	-0,206	-0,144	-0,170
	Ejakulat hacmi	0,114	,576*	0,188	-0,092
	Toplam motil	0,344	0,165	0,317	0,329
	İleri motil	-0,244	-0,254	-,633*	-0,487
	Morfoloji	0,340	-0,042	0,360	0,249
	FSH	0,091	0,206	0,152	0,020
	Estradiol	-0,027	0,059	-0,213	-0,149
	LH	0,417	0,245	0,342	0,349
	Testosteron	0,345	0,335	0,109	0,177
	Prolaktin	,664*	0,510	,614*	,611*

* $p < 0,05$ anlamlı ilişki var, $p > 0,05$ anlamlı ilişki yok; Spearman Korelasyon testi

Normospermi grupta PCR ölçümleri ile tüm ölçümler arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadı ($p > 0,05$).

Astenozoospermik ve sigara içen grupta Klk2 (kat değişimi) ölçümü ile Testosteron ölçümü arasında pozitif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki dikkat çekti ($r=0,526$; $p<0,05$). Diğer ölçümler ilişkili değildi ($p>0,05$).

Astenozoospermik ancak sigara içmeyen grupta Akap4 (kat değişimi) ölçümü ile Prolaktin ölçümü arasında pozitif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu ($r=0,664$; $p<0,05$). Semg1 (kat değişimi) ölçümü ile ejakulat hacmi ölçümü arasında pozitif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu ($r=0,576$; $p<0,05$).

Semg2 (kat değişimi) ölçümü ile Prolaktin ölçümü arasında pozitif yönlü ($r=0,614$), İleri motil ölçümü ile arasında negatif yönlü ($r=-0,633$), istatistiksel anlamlı ilişki görüldü ($p<0,05$).

Klk2 (kat değişimi) ölçümü ile Prolaktin ölçümü arasında pozitif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu ($r=0,611$; $p<0,05$). Diğer ölçümler ilişkili değildi ($p>0,05$).

Tablo 4.7.: Western Blot Analizinin Ölçümler ile İlişkisi

Grup	Ölçüm	Akap4/ β -aktin	Semg2 / β -aktin	Klk2 / β -aktin
Normospermi	Yaş	0,029	-0,029	-0,057
	Cinsel perhiz	0,000	-0,150	-0,150
	Sperm sayısı	0,057	-0,227	-0,283
	Ejakulat hacmi	0,241	0,106	-0,135
	Toplam motilite	-0,256	0,170	0,426
	İleri motilite	-0,256	0,057	0,313
	Morfoloji	0,009	-0,123	-0,133
	FSH	-0,199	-0,313	-0,114
	Estradiol	-0,085	-0,426	-0,340
	LH	-0,218	-0,351	-0,133
	Testosteron	-0,199	-0,085	0,113
	Prolaktin	0,190	0,038	-0,152
	Asteno sigara(+)	Yaş	-0,228	-0,228
Cinsel perhiz		0,197	0,301	0,197
Sperm sayısı		-0,257	-0,171	-0,257
Ejakulat hacmi		0,086	-,575*	0,086
Toplam motilite		-0,076	-0,095	-0,076
İleri motilite		-0,105	-0,095	-0,105
Morfoloji		0,323	-0,209	0,323
FSH		-0,076	,586*	-0,076
Estradiol		0,170	0,510	0,170
LH		-0,426	0,028	-0,426
Testosteron		0,085	-0,028	0,085
Prolaktin		0,057	0,057	0,057
Asteno sigara(-)		Yaş	-0,265	-0,303
	Cinsel perhiz	-0,227	-0,425	-0,425
	Sperm sayısı	0,210	0,334	0,334
	Ejakulat hacmi	-0,105	-0,211	-0,211
	Toplam motilite	-0,085	-0,171	-0,171
	İleri motilite	0,019	-0,332	-0,332
	Morfoloji	0,244	0,137	0,137
	FSH	-0,284	-0,227	-0,227
	Estradiol	0,038	-0,151	-0,151
	LH	-0,246	0,189	0,189
	Testosteron	-0,076	0,019	0,019
	Prolaktin	-0,095	0,095	0,095

* $p < 0,05$ anlamlı ilişki var, $p > 0,05$ anlamlı ilişki yok; Spearman Korelasyon testi

Normospermi grupta WB ölçümleri ile tüm ölçümler arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadı ($p > 0,05$).

Sigara içen grupta semg2/ β -aktin ölçümü ile Ejakulat hacmi ölçümü arasında negatif yönlü ($r = -0,575$), FSH ölçümü ile arasında pozitif yönlü ($r = 0,586$), istatistiksel anlamlı ilişki tespit edildi ($p < 0,05$). Diğer ölçümler ilişkili değildi ($p > 0,05$). Sigara içmeyen grupta WB ölçümleri ile tüm ölçümler arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmadı ($p > 0,05$).

5. TARTIŞMA

İnfertilite dünya genelinde bir sağlık problemi olup üreme çağındaki çiftlerin %8-12'sini etkilemektedir. Erkek faktörü ise bu olguların en az yarısını oluşturmaktadır. Dünya nüfusu düşünüldüğü zaman bu sayı 30 milyona ulaşmaktadır (66).

Taze ejakulat örneğinde azalmış motilite veya sperm motilitesinin olmaması şeklinde tanımlanan astenozoospermi de erkek infertilitesinin en önemli nedenlerinden birisidir. Değişken derecelere göre astenozoospermi erkeklerdeki infertilitenin yaklaşık %80'inini oluşturmaktadır ve izole tek başına gözlenen astenozoospermi en sık görülen sperm kusuru olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte astenozoospermi olguları incelendiğinde çoğu zaman etiyolojide bir neden bulunamamıştır; bu da etkili bir tedavinin eksikliğine neden olmaktadır. Son zamanlarda gelişen teknoloji ile birlikte astenozoospermi için genetik taramalar yapılmış olup birçok gen kusuru saptanmıştır. Buna karşın sperm kuyruğundaki karmaşık yapı nedeniyle astenozoospermiye neden olacak genetik faktörler, motilite üzerine etkili protein yapılar göz önüne alındığında, bilgiler hala sınırlı düzeydedir (2).

Sağlıklı ve olgunlaşmış bir sperm hücresi yardımcı üreme tekniklerinin kullanımı sırasında başarılı fertilizasyonu sağlamak için çok önemlidir. Yardımcı üreme tekniklerinin geliştiği bu çağda, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu günümüzde tedavi edilemeyen şiddetli ve sendromik astenozoospermi olgularında tercih edilen bir yöntemdir. Ancak böyle bir durumda bu patolojinin bir sonraki kuşağa aktarılması açısından da risk barındırmaktadır. Bu nedenle astenozoospermi için patolojinin belirlenmesi klinik açıdan öneme sahiptir (2).

İdiyopatik astenozoospermi vakalarında sperm proteinlerinin anormal ekspresyonu söz konusudur. Astenozoosperminin moleküler patofizyolojisinde rol oynayan proteinleri belirlemek adına karşılaştırmalı sperm proteomik çalışmalar yapılmıştır. Sperm hareketliliğindeki azalma enerji metabolizmasındaki işlevsel bozukluklar, sperm kuyruğunun yapısındaki protein bileşenlerinin kusuru gibi birçok sperm proteinlerinin ekspresyonunun sonucu olduğu düşünülmüştür. Nowicka-Bauer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada astenozoospermik hastalarda tanımlanan differansiyel olarak eksprese edilen proteinleri, moleküler etiyolojide sperm

hücresindeki mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stres yarattığı durum ile ilişkilendirilmiştir (67).

Bu raporlar oksidatif stresin, mitokondriyal fonksiyonu ve bununla birlikte enerji metabolizmasını bozduğunu göstermektedir. Bu etkinin de yapısal proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek spermin hareketliliğini azalttığı sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda da, astenozoospermik infertil erkeklerde, sigaranın yarattığı oksidatif stresin sperm örneklerindeki protein ekspresyonları ve motilite üzerindeki olası etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Gelişmiş ülkelerde şu anda ilk ebeveynlik yaşları göz önüne alındığında anne ve baba yaşlarında artış olduğu görülmüştür. Baba yaşlarındaki artışın semen kalitesi ve DNA hasarı üzerine etkilerinin araştırılması konusunda son zamanlarda büyük bir ilgi vardır. Levitas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, normal sperm konsantrasyonuna sahip 6022 erkekte yaş ve semen parametreleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Bulgulara göre sperm motilitesinin yaş ile negatif yönlü bir ilişkisinin olduğu ve motilitenin yaşla birlikte azaldığını göstermiştir (68). Bir başka çalışmada Mukhopadhyay ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada iki farklı dekatta toplamda 3729 infertil erkeğin semen parametrelerinin yaş ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda her iki dekattaki hasta grubunda artan yaş ile birlikte semen hacmi dışında diğer tüm parametrelerde düşüş olduğu gösterilmiştir (69). Winkle ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise infertil 320 hasta ve 84 normospermik hastanın yaşı ile semen parametreleri ve DNA fragmentasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bulgular sonucunda ne hasta grubunda ne de kontrol grubunda erkek yaşı ile semen parametreleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir (70).

Bizim çalışmamızda her üç grubun yaş ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p: 0,332$). Ancak özellikle sigara kullanımı olan astenozoospermik erkeklerde progressif motilite ile yaş arasında negatif yönlü, istatistiksel anlamlı ilişki bulunmaktadır. ($r=-0,562$; $p<0,05$) Çalışmamızdaki bu bulgular literatürle benzer bir sonuç elde edildiğini bununla birlikte özellikle sigara kullanımı olan grupta anlamlı farkın çıkmasının yaştan bağımsız olarak sigaranın yarattığı oksidatif stresin neden olduğunu düşündürmüştür.

Sigara kullanımı üreme sağlığının değiştirilebilir risk faktörlerinden birisidir. Sharma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada üreme çağındaki erkeklerin %37'si tütün ve tütün ürünü kullanmaktadır. Tütün içiminden kaynaklanan toksinler semen parametrelerinde (sayı, motilite, morfoloji) ve semen kalitesinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Semen kalitesindeki bozulmanın yanı sıra, yarattığı DNA hasarı ve oksidatif stres ile de infertiliteye neden olmaktadır. Reham ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sigara içenlerde içmeyenlere göre sperm hareketliliğinin %5,25 oranında azaldığı görülmüştür. Yine sperm sayısının sigara içen grupta 17.7 milyon daha düşük olduğu bulunmuştur (71). Sharma ve arkadaşlarının yaptığı 5865 katılımcı ile yapılan 20 çalışmanın meta-analizinde sigara içmenin sperm sayısını, motilitesini ve morfolojisini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Özellikle ağır içicilerde hafif içicilere göre semen parametrelerinin daha fazla bozulduğu görülmüştür (4). Buna karşın Bundhun ve arkadaşlarının yaptığı 10.823 infertil erkek katılımcının olduğu (5257 sigara içen ve 5566 sigara içmeyen) 16 çalışmanın metaanalizi ise sigara kullanmanın motiliteyi etkilemediğini göstermiştir (72).

Bizim çalışmamızda ise gruplar arasındaki sperm sayısı, toplam motil ve progresif motil değerlerinde anlamlı fark saptanmış olup en düşük sperm sayısı ve motilitenin sigara kullanımı olan grupta olduğu görülmüştür. Ancak sperm morfolojisinde ve semen hacminde anlamlı fark bulunmamıştır. Bizim çalışmamızdaki bulguların da literatür ile benzer olduğu görülmektedir.

Tütün içiminin üreme hormonlarının seviyesini etkileyerek de infertiliteye sebep olduğu bilinmektedir. Ancak bu etkinin nasıl olduğu bilinmemektedir. Testiste Leydig hücrelerinden salgılanan androjenlerle ilgili olarak Blanco-Muñoz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sigara içen kişilerde testosteron düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (73). Bu konuda yapılan bir başka çalışmada Pasqualotto ve arkadaşları sigara içenlerde ortalama testosteron seviyesinin değişmediğini göstermiştir (74).

Boeri ve arkadaşlarının yaptığı 189 infertil erkeğin değerlendirildiği bir çalışmada sigara kullanımının yüksek LH ve FSH değerleriyle ilişkili olduğu, testosteron seviyelerinde anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (75). Bu gözlemsel çalışmalarda örneklem büyüklüğünün az olması çalışmaların kısıtlılığı olarak gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da sigara içen grupla sigara içmeyen gruplar

arasında hormonal düzey arasında anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir ve literatürde de sonuçlarımızı destekleyecek sonuçlar olduğunu görülmüştür. Ancak örneklem büyüklüğünün artırılması ve sigara içen grup içinde içme miktarına bağlı olarak alt gruplar oluşturularak bu sonuçların yeniden değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

Üreme hormonlarının semen parametrelerine etkisi üzerine de birçok çalışma yapılmıştır. FSH ön hipofiz bezi tarafından çeşitli uyarılar doğrultusunda salınan bir hormondur. FSH testis ve hipotalamus arasındaki geri bildirimler sonucu sperm üretme yeteneğini yansıtabilmektedir. Gordetsky ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 610 infertil erkek değerlendirilmiştir. FSH seviyesinin sperm konsantrasyonunda ve morfolojide bozulmaya yol açtığı gösterilirken semen hacmi ile ilişkili olmadığı saptanmıştır (76). Jensen ve arkadaşlarının 349 Danimarkalı erkek üzerinde yaptığı çalışmada, FSH'nin sperm konsantrasyonu ile negatif bir ilişki gösterdiği bildirilmiştir (77). Jensen ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise 1558 Danimarkalı erkekte semen kalitesi ve üreme hormonları arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda LH ve FSH tüm semen parametreleri ile ilişkili bulunurken testosteron sadece sperm motilitesi ile korelasyon göstermiştir. Buna karşın estradiol ile herhangi bir semen parametresi arasında korelasyon görülmemiştir (78). Başka bir çalışmada Uhler ve arkadaşları tarafından fertilizasyon problemi olmayan 145 erkekte LH ve testosteronun semen parametreleri arasında ilişki olmadığı FSH'nin konsantrasyon, motilite ve morfoloji ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (79).

Bizim çalışmamızda da literatür ile benzer sonuçlar saptanmıştır. Hem sigara içen hem de sigara içmeyen astenozoospermik erkeklerde FSH'nin ejakulat hacmi ve sperm sayısı ile negatif yönlü bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Literatürden bağımsız olarak ise sigara kullanımı olan astenozoospermik grupta estradiolun motilite ile negatif yönlü ilişkisi anlamlı bulunmuştur. Öztekin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada vücut kitle indeksinin (VKİ) üreme hormonları üzerine etkisi araştırılmıştır; obezitenin testosteron ve T/E2 oranını azaltarak fertilité üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir (80). Bu bağlamda düşünüldüğünde örneklem büyüklüğünün artırılması ve astenozoospermik gruptaki hastaların VKİ'nin de hesaplanması ile estradiolün semen parametreleri üzerindeki etkisi daha net bir şekilde gösterilebilir.

Çalışmamızda analiz edilen bir başka detay ise motilite üzerine etkili seminal proteinlerin sigara ile ilişkisinin olup olmadığının gösterilmesidir. Normospermik grup ile sigara kullanımı olan astenozoospermik grup arasında AKAP4 proteinin PCR analizinde fark bulunmuştur ($p:0,042$). AKAP4 proteinin sperm hücresinin yapısındaki fibröz kılıfta bulunan ve yapısal destekle ilgili bir protein olduğu bilinmektedir. Bacetti ve arkadaşlarının yaptığı bir olgu sunumunda AKAP4/AKAP3 bağlanma bölgelerinin silinmesi ve fibröz kılıfta immunflorasan incelemede AKAP4 proteinin saptanamaması fibröz kılıftaki displazi ile ilişkili bulunup bu fizyopatoloji ile infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir (56). Turner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise AKAP4'ün fibröz kılıf displazisinde rol oynamadığı ve buna yönelik bir kanıt bulunamadığı bildirilmiştir (81). Choowong-In ve arkadaşlarının yaptığı hayvan deneyinde ise kronik hafif stresin AKAP4 ve Tirozin-fosforile proteinlerin spermatozadaki ekspresyonunu azalttığı, bunun sonucunda da sperm motilitesinin azaldığı gösterilmiştir (82). Bizim çalışmamızda da özellikle sigara kullanan grupta AKAP4 ekspresyonunun anlamlı azalmasının, sigaranın yarattığı oksidatif stres ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

AKAP4 ile ilgili çalışmamızdaki bir diğer bulgu ise prolaktin ile pozitif yönlü bir ilişki bulunmasıdır ($r=0,664$; $p<0,05$). Daha önce literatürde prolaktin ve AKAP4 arasındaki ilişkiye yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Ancak Fukuda ve arkadaşlarının yaptığı hayvan deneyi çalışmasında, fare prolaktininin spermatozoa üzerindeki yararlı etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada spermelerin hareketlilik oranının prolaktin içeren bir solüsyon içerisinde bırakıldıklarında daha iyi korunduğu gösterilmiştir.

Bununla birlikte sonuçlar oligozoospermi ve astenozoospermik erkeklerde prolaktinin klinik uygulamaları açısından fikir vermiştir (83). Bir başka çalışmada ise Baker ve arkadaşları tarafından insan spermatozoasında bulunan proteinlerin kapsamlı bir analizi yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda insan sperm hücresinde 6 farklı alt tipte reseptör bulunmuştur. Bunlardan birisi de tirozin kinaz/fosfataz reseptörlerinden prolaktin reseptör öncüsünün izoformu-1 olarak tanımlanmıştır. Bu bilgilerin doğrultusunda da prolaktinin kapasitasyon, motilite gibi etkileri sistemik olarak incelenebilmektedir (84). Bir başka hayvan deneyinde ise Yanqiu insanlarda ve farelerde X kromozomu üzerinde ortak saptanan spermatogenezde işlev gören genleri

göstermiştir. Çalışmanın önemli detaylarından birisi hem insanlarda hem de farelerde X'e bağlı AKAP4'ün sperm hareketliliğini düzenlenmesidir. AKAP4 gibi prolaktinin de sperm motilitesini etkilediği ve bu etkinin de AKAP4 ile birlikte aynı tirozin fosforilasyon yolundan çalıştığı gösterilmiştir (85). Biz de çalışmamızdaki AKAP4 ve Prolaktin arasındaki pozitif yönlü ilişkiyi aynı tirozin fosforilasyonunun kullanılmasına ve ikisinin de motilite üzerine pozitif anlamda etki etmesine bağladık. Ancak daha fazla moleküler çalışma ve hasta sayısının artırılmasıyla bu ilişki daha fazla detaylandırılabilir.

Çalışmamızda PCR ve Western Blot analizi ile sonuçları elde edilen bir diğer protein ailesi SEMG'dir. Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma astenozoospermi için yapılan ilk mikrodizi çalışmasıdır. Bu çalışmanın sonuçlarında astenozoospermik erkeklerde normospermik grup ile karşılaştırıldığında SEMG1'in up-regule olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında astenozoospermik erkeklerde SEMG1'in düşük motiliteden sorumlu olduğu düşünülmüştür (86). Zhou ve arkadaşların yaptığı astenozoospermik ve normospermik grubun karşılaştırıldığı bir çalışmada SEMG1'in ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda SEMG1'in astenozoospermik grupta daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu ekspresyon seviyesinin de düşük sperm hareketliliği ve anormal morfoloji ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (87). Bizim çalışmamızın sonucunda da SEMG1 ekspresyonunun en fazla sigara kullanımı olan astenozoospermik grupta olduğu görüldü. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da ölçülen değerlerde fark saptanmış olup gruptaki kişi sayısının artırıldığı takdirde literatürle benzer sonuçlar elde edileceğini düşünmekteyiz.

Yamasaki ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise SEMG ile işaretlenen grup ve SEMG ile işaretlenmeyen grup arasında sperm hareketliliği açısından negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte sperm motilitesi normal dahi olsa SEMG ile işaretlenmenin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda da SEMG sperm motilitesinden bağımsız olarak infertilite ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (88). Legare ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise infertilite nedeniyle İVF prosedürü uygulanan hastalarda döllemenin başarısız olduğu olgular incelenmiş. Ve çalışmanın sonucunda bu olguların sperm örneklerinde SEMG1'in aşırı eksprese olduğu görülmüştür. (89)

Bizim çalışmamızdaki bulgular da literatürle benzerlik göstermektedir. Yaptığımız çalışmanın sonucunda SEMG2'nin PCR analizinde sigara içmeyen astenozoospermik grupta progresif motilite ile negatif korelasyon olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($r=-0,633$) ($p<0,05$). Ancak sigaranın SEMG proteinleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmasa da ölçülen değerlerde fark görülmüştür. Bu sonucun olası nedeni olarak, SEMG proteinlerinin daha çok viskozite ile ilişkili olması ve oksidatif stres ile ilişkili olmaması düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki bir diğer sonuç ise SEMG ve ejakulat hacmi arasındaki ilişkidir. İnsan seminal plazması ejakulasyondan hemen sonra sperm hücrelerinin yer aldığı yarı katı halde bulunan jelatinimsi bir kütle halinde kendiliğinden pıhtılaşır. SEMG'nin KLK tarafından parçalanması seminal plazmanın sıvılaşmasını sağlar. Bu bilgiler doğrultusunda bizim çalışmamızdaki SEMG ve ejakulat hacmi arasındaki ilişkinin SEMG'nin yarattığı viskoziteden kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda seminal sıvıdan analiz edilen motiliteyle ilişkili bir başka protein ise KLK'dır. Ejakulatın artan viskozitesi infertil erkeklerde yaygın görülen bir bulgudur. Emami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ejakulatın sıvılaşmasındaki gecikmede ve semen hiperviskozitesinin patolojisinde KLK'lerin rol oynadığı gösterilmiştir. Semen sıvılaşmasında anormallik olan ve hipervisköz semeni olan kişilerde KLK2'nin daha düşük konsantrasyonlarda olduğunu saptanmıştır (32). Ancak bizim çalışmamız KLK2 düzeyinin gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Bunun dışında motilite, ejakulat hacmi ve sperm sayısı gibi semen parametrelerine de etkisi olmadığı görülmüştür. Özellikle sigara kaynaklı oksidatif stres ve KLK2 düzeylerinin yaratabileceği semen hiperviskozitesi üzerinden oksidatif stres arasındaki ilişkinin anlamlı olmadığı görülmüştür. Ancak yapılacak prospektif çalışmalar ve örneklem büyüklüğünün artırılmasıyla birlikte anti-oksidan tedavilerin oksidatif stresi azaltarak KLK2 seviyelerini değiştirebileceği ihtimal dahilindedir. Bu da infertilite tedavisinde bize yol gösterecek bir parametre olabilir.

KLK2 ile ilgili bir diğer bulgu da sigara içen astenozoospermik grupta testosteron ile pozitif yönlü istatistiksel anlamlı ilişki bulunmasıdır ($r=0,526$; $p<0,05$). KLK ailesinin seminal plazmada bulunan ve SEMG'lerin hidrolizinde görevli bir

protein yapısı olduğu bilinmektedir. Semende sperm hücrelerin hareketliliği için gerekli olan PSA'dır. Normalde katalitik özelliği olmayan pro-PSA KLK2 tarafından aktif PSA'ya dönüştürülerek katalizör özelliği aktiflenebilir. Bu yüzden de KLK2 PSA için fizyolojik bir aktivatör rolündedir. Sävblom ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmanın sonucunda, hem fertil hem de infertil grupta düşük PSA seviyesinin sperm motilitesini negatif yönde etkilediği bu yüzden de infertilite mekanizması için hem KLK2 hem de PSA seviyelerinin önemli olduğunu göstermiştir (90). Elzanaty ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise PSA seviyesinin hareketli sperm yüzdesi ile pozitif korelasyon saptamış olup PSA seviyesinin hareketli sperm yüzdesini tahmin etmede en önemli ve bağımsız parametre olduğunu göstermiştir. (91)

Lövgren ve arkadaşlarının KLK2'nin enzimatik etkilerini gösterdiği bir başka çalışmada ise KLK2'nin salınımının androjenler, progesterinler, glukokortikoidler ve mineralokortikoidler tarafından uyarıldığı vurgulanmaktadır (92). Bütün bu sonuçlar ve çalışmalar dahilinde, androjenlerin KLK2 salınımı etkilemesi ve KLK2'nin PSA'nın aktivatörü olması çalışmamızdaki testosteron ile ilişkisini açıklamaktadır. Androjenlerin direkt salınımı etkilemesi dışında testosteron, KLK2 ve PSA arasındaki moleküler yolağın daha fazla prospektif çalışmayla aydınlatılabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sperm proteomik çalışmalar erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde, altta yatan nedenin araştırılması ve uygulanacak tedavi açısından önemlidir. Bizim çalışmamızda da analizleri yapılan proteinlerden SEMG2'nin motilite üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte AKAP4 proteinin de sigara kullanımı olan grupta ekspresyonun normospermik gruba göre düşük olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında, bu proteinlerin sperm motilitesinin belirlenmesinde etkili olabileceği kanaatindeyiz. Yine bu proteinlerin bazılarının prolaktin ve testosteron gibi hormon seviyelerine etkileyebileceğini ve bir takım yolaklar vasıtasıyla dolaylı yoldan da fertilitte üzerinde etkili olabileceğini düşündürebilecek bulgular elde edilmiştir. Sigara içiminin ise sperm motilitesi üzerindeki etkilerini SEMG, AKAP4 gibi proteinler üzerinden gösteriyor olabileceğine dair istatistiksel olarak anlamlı olmayan ancak önemli bulgulara ulaşılmıştır. Sigara bıraktırmamanın birçok semen parametresi üzerine etkisi dışında motilite üzerine etkili proteinlerin ekspresyonunu da olumlu yönde etkileyeceğini düşünmekteyiz. Ancak daha büyük hasta grupları ile yapılacak randomize prospektif çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

Çalışmamızın sonucunda rutin semen analizlerine ilaveten özellikle astenozoospermik erkeklerde yapılacak seminal proteinlerin tayininin infertilite tedavisine ve altta yatan moleküler patolojiyi tanımlaya yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla, astenozoospermik erkeklerde seminal proteinler gibi biyobelirteç ekspresyon düzeylerinin tanısal olarak kullanılması infertilite tedavisini olumlu yönde etkileme şansı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Cao X, Cui Y, Zhang X, Lou J, Zhou J, Bei H, vd. Proteomic profile of human spermatozoa in healthy and asthenozoospermic individuals. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 27 Şubat 2018;16:16.
2. Tu C, Wang W, Hu T, Lu G, Lin G, Tan YQ. Genetic underpinnings of asthenozoospermia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 01 Aralık 2020;34(6):101472.
3. Tang Q, Pan F, Wu X, Nichols CE, Wang X, Xia Y, vd. Semen quality and cigarette smoking in a cohort of healthy fertile men. *Environ Epidemiol*. 25 Haziran 2019;3(4):e055.
4. Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *Eur Urol*. Ekim 2016;70(4):635-45.
5. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol*. 01 Mart 2018;16(1):10-20.
6. Hackney AC. The male reproductive system and endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc*. Şubat 1996;28(2):180.
7. Emanuele MA, Emanuele N. Alcohol and the Male Reproductive System. *Alcohol Res Health*. 2001;25(4):282-7.
8. Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, Khodadadian A. Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *Int J Gen Med*. 05 Şubat 2020;13:29-41.
9. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, vd. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. Mayıs 2014;29:66-75.

10. Hao SL, Ni FD, Yang WX. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*. 20 Temmuz 2019;706:201-10.
11. Mruk DD, Cheng CY. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*. Ekim 2015;36(5):564-91.
12. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*. 14 Kasım 2003;1(1):107.
13. Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl*. Ekim 2008;29(5):469-87.
14. Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol*. 2008;636:1-15.
15. Sharma S, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Localization of epithelial sodium channel (ENaC) and CFTR in the germinal epithelium of the testis, Sertoli cells, and spermatozoa. *J Mol Histol*. Nisan 2018;49(2):195-208.
16. Dadoune JP. The cellular biology of mammalian spermatids: a review. *Bull Assoc Anat (Nancy)*. Aralık 1994;78(243):33-40.
17. Zakrzewski P, Lenartowska M, Buss F. Diverse functions of myosin VI in spermiogenesis. *Histochem Cell Biol*. 2021;155(3):323-40.
18. Sengupta P, Arefe M, Elbardisi H. Spermatogenezin hormonal düzenlenmesi. İçinde: *Spermatogenezde Moleküler Sinyalleşme ve Erkek İnfertilitesi*.
19. Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl*. Eylül 2004;6(3):259-68.
20. Buffone MG, Ijiri TW, Cao W, Merdiushev T, Aghajanian HK, Gerton GL. Heads or Tails? Structural Events and Molecular Mechanisms That Promote Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis and Motility. *Mol Reprod Dev*. Ocak 2012;79(1):4-18.

21. Anafarta K, Bedük Y, Arikan N. Temel Üroloji. 4. bs. Ankara: Günes Tip Kitabevleri; 2011. 1222 s.
22. Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, Smith GD, Khatra B, da Cruz e Silva EF, vd. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biol Reprod.* Mart 1996;54(3):709-18.
23. Finkelstein M, Etkovitz N, Breitbart H. Ca²⁺ signaling in mammalian spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol.* 01 Ekim 2020;516:110953.
24. Vertika S, Singh KK, Rajender S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility - An update. *Mitochondrion.* Eylül 2020;54:26-40.
25. Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility†. *Biol Reprod.* 01 Ocak 2017;96(1):2-12.
26. Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl.* 2017;19(1):5-14.
27. Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM. Targeted disruption of the *Akap4* gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol.* 15 Ağustos 2002;248(2):331-42.
28. Koistinen H, Soini T, Leinonen J, Hyden-Granskog C, Salo J, Halttunen M, vd. Monoclonal Antibodies, Immunofluorometric Assay, and Detection of Human Semenogelin in Male Reproductive Tract: No Association with In Vitro Fertilizing Capacity of Sperm1. *Biol Reprod.* 01 Mart 2002;66(3):624-8.
29. de Lamirande E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost.* Şubat 2007;33(1):60-8.
30. Heidary Z, Zaki-Dizaji M, Saliminejad K, Khorramkhorshid HR. Expression Analysis of the *CRISP2*, *CATSPER1*, *PATE1* and *SEMG1* in the Sperm of Men with Idiopathic Asthenozoospermia. *J Reprod Infertil.* Haziran 2019;20(2):70-5.

31. Mitra A, Richardson RT, O'Rand MG. Analysis of Recombinant Human Semenogelin as an Inhibitor of Human Sperm Motility. *Biol Reprod. Mart* 2010;82(3):489-96.
32. Emami N, Scorilas A, Soosaipillai A, Earle T, Mullen B, Diamandis EP. Association between kallikrein-related peptidases (KLKs) and macroscopic indicators of semen analysis: their relation to sperm motility. *Biol Chem. Eylül* 2009;390(9):921-9.
33. Emami N, Deperthes D, Malm J, Diamandis EP. Major role of human KLK14 in seminal clot liquefaction. *J Biol Chem.* 11 Temmuz 2008;283(28):19561-9.
34. Barbagallo F, La Vignera S, Cannarella R, Crafa A, Calogero AE, Condorelli RA. The Relationship between Seminal Fluid Hyperviscosity and Oxidative Stress: A Systematic Review. *Antioxidants.* 27 Şubat 2021;10(3):356.
35. Alahmar AT. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *J Hum Reprod Sci. Mart* 2019;12(1):4-18.
36. Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online. Haziran* 2014;28(6):684-703.
37. Baskaran S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane? *Andrologia.* 2021;53(1):e13577.
38. Dutta S, Sengupta P, Slama P, Roychoudhury S. Oxidative Stress, Testicular Inflammatory Pathways, and Male Reproduction. *Int J Mol Sci.* 17 Eylül 2021;22(18):10043.
39. Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol.* 24 Nisan 2019;17(2):87-97.
40. Agarwal A, Cho CL, Esteves SC, Majzoub A. Reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Transl Androl Urol. Eylül* 2017;6(Suppl 4):S695-6.

41. Ribas-Maynou J, Yeste M. Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants. *Biology*. 10 Nisan 2020;9(4):77.
42. Kowalczyk A. The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. *Reprod Sci [Internet]*. 29 Kasım 2021 [a.yer 15 Ocak 2022]; Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00795-w>
43. Sikka SC, Hellstrom WJ. Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian J Androl*. 2016;18(3):392-401.
44. Bibbins PE, Ward JB, Lipshultz LI, Hokanson JA, Legator MS. Incidence of sperm with two fluorescent bodies in men with impaired fertility. *Fertil Steril*. Şubat 1992;57(2):402-8.
45. Patel AS, Leong JY, Ramasamy R. Prediction of male infertility by the World Health Organization laboratory manual for assessment of semen analysis: A systematic review. *Arab J Urol*. 20 Kasım 2017;16(1):96-102.
46. World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization.
47. Vander Borght M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. Aralık 2018;62:2-10.
48. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, vd. Male infertility. *Lancet Lond Engl*. 23 Ocak 2021;397(10271):319-33.
49. Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*. 16 Mayıs 2019;8:F1000 Faculty Rev-670.
50. Cardona Barberán A, Boel A, Vanden Meerschaut F, Stoop D, Heindryckx B. Diagnosis and Treatment of Male Infertility-Related Fertilization Failure. *J Clin Med*. 01 Aralık 2020;9(12):3899.

51. Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, vd. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur Urol*. Kasım 2021;80(5):603-20.
52. Brubaker WD, Li S, Baker LC, Eisenberg ML. Increased risk of autoimmune disorders in infertile men: analysis of US claims data. *Andrology*. Ocak 2018;6(1):94-8.
53. Lundy SD, Vij SC. Male infertility in renal failure and transplantation. *Transl Androl Urol*. Nisan 2019;8(2):173-81.
54. Agarwal A, Majzoub A, Parekh N, Henkel R. A Schematic Overview of the Current Status of Male Infertility Practice. *World J Mens Health*. Temmuz 2020;38(3):308-22.
55. Zhang B, Ma H, Khan T, Ma A, Li T, Zhang H, vd. A DNAH17 missense variant causes flagella destabilization and asthenozoospermia. *J Exp Med*. 28 Ekim 2019;217(2):e20182365.
56. Baccetti B, Collodel G, Estenoz M, Manca D, Moretti E, Piomboni P. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod*. 01 Ekim 2005;20(10):2790-4.
57. Chemes HE, Alvarez Sedo C. Tales of the Tail and Sperm Head Aches Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl*. Ocak 2012;14(1):14-23.
58. Cakiroglu B, Sinanoglu O, Gozukucuk R. The Effect of Varicocelectomy on Sperm Parameters in Subfertile Men with Clinical Varicoceles Who Have Asthenozoospermia or Teratozoospermia with Normal Sperm Density. *ISRN Urol*. 21 Ekim 2013;2013:698351.
59. Moretti E, Di Cairano G, Capitani S, Scapigliati G, Baccetti B, Collodel G. Cryptorchidism and Semen Quality: A TEM and Molecular Study. *J Androl*. 2007;28(1):194-9.

60. Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, vd. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian J Androl*. 2015;17(6):948-53.
61. Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril*. 01 Ocak 2011;95(1):116-23.
62. Shrivastava V, Marmor H, Chernyak S, Goldstein M, Feliciano M, Vigodner M. Cigarette smoke affects posttranslational modifications and inhibits capacitation-induced changes in human sperm proteins. *Reprod Toxicol Elmsford N*. Ocak 2014;43:125-9.
63. Jain R, Jain V, Awasthi S, Dutta S, Jain SK. Effects of Cigarette Smoking on Adult Male Seminal Fluid: A Retrospective Study. *Int J Sci STUDY*. 2015;3(6):43-6.
64. Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, Menafra D, Pozza C, Pivonello R, vd. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 15 Ocak 2018;16(1):3.
65. Isidori A, Latini M, Romanelli F. Treatment of male infertility. *Contraception*. 01 Ekim 2005;72(4):314-8.
66. Vogiatzi P, Pouliakis A, Sakellariou M, Athanasiou A, Athanasiou A, Colaghis A, vd. Male Age and Progressive Sperm Motility Are Critical Factors Affecting Embryological and Clinical Outcomes in Oocyte Donor ICSI Cycles. *Reprod Sci [Internet]*. 15 Kasım 2021 [a.yer 31 Ocak 2022]; Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00801-1>
67. Agarwal A, Panner Selvam MK, Baskaran S. Proteomic Analyses of Human Sperm Cells: Understanding the Role of Proteins and Molecular Pathways Affecting Male Reproductive Health. *Int J Mol Sci*. 27 Şubat 2020;21(5):1621.

68. Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia*. Nisan 2007;39(2):45-50.
69. Mukhopadhyay D, Varghese AC, Pal M, Banerjee SK, Bhattacharyya AK, Sharma RK, vd. Semen quality and age-specific changes: a study between two decades on 3,729 male partners of couples with normal sperm count and attending an andrology laboratory for infertility-related problems in an Indian city. *Fertil Steril*. 01 Mayıs 2010;93(7):2247-54.
70. Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet*. Ocak 2009;26(1):41-6.
71. Rehman R, Zahid N, Amjad S, Baig M, Gazzaz ZJ. Relationship Between Smoking Habit and Sperm Parameters Among Patients Attending an Infertility Clinic. *Front Physiol*. 31 Ekim 2019;10:1356.
72. Bundhun PK, Janoo G, Bhurtu A, Teeluck AR, Soogund MZS, Pursun M, vd. Tobacco smoking and semen quality in infertile males: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 08 Ocak 2019;19:36.
73. Blanco-Muñoz J, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C. Effect of current tobacco consumption on the male reproductive hormone profile. *Sci Total Environ*. 01 Haziran 2012;426:100-5.
74. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int*. Şubat 2006;97(2):324-6.
75. Boeri L, Capogrosso P, Ventimiglia E, Pederzoli F, Cazzaniga W, Chierigo F, vd. Heavy cigarette smoking and alcohol consumption are associated with impaired sperm parameters in primary infertile men. *Asian J Androl*. Ekim 2019;21(5):478-85.

76. Gordetsky J, van Wijngaarden E, O'Brien J. Redefining abnormal follicle-stimulating hormone in the male infertility population. *BJU Int.* Ağustos 2012;110(4):568-72.
77. Jensen TK, Andersson AM, Hjollund NH, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, vd. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab.* Aralık 1997;82(12):4059-63.
78. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen Jørgen H, vd. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril.* 01 Ekim 2004;82(4):863-70.
79. Uhler ML, Zinaman MJ, Brown CC, Clegg ED. Relationship between sperm characteristics and hormonal parameters in normal couples. *Fertil Steril.* Haziran 2003;79 Suppl 3:1535-42.
80. Oztekin U, Caniklioglu M, Sari S, Gurel A, Selmi V, Isikay L. The impact of body mass index on reproductive hormones, testosterone/estradiol ratio and semen parameters. *Cent Eur J Urol.* 2020;73(2):226-30.
81. Turner RM, Musse MP, Mandal A, Klotz K, Jayes FC, Herr JC, vd. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl.* Nisan 2001;22(2):302-15.
82. Choowong-in P, Sattayasai J, Poodendaen C, Iamsaard S. Decreased expression of AKAP4 and TyrPho proteins in testis, epididymis, and spermatozoa with low sexual performance of mice induced by modified CUMS. *Andrologia.* 2021;53(3):e13977.
83. Fukuda A, Mori C, Hashimoto H, Noda Y, Mori T, Hoshino K. Effects of prolactin during preincubation of mouse spermatozoa on fertilizing capacity in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 01 Nisan 1989;6(2):92-7.

84. Baker MA, Reeves G, Hetherington L, Müller J, Baur I, Aitken RJ. Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *PROTEOMICS – Clin Appl.* 2007;1(5):524-32.
85. Hu Y. Spermatogenesis genes: sex chromosome linkage and evolution. 2010 [a.yer 03 Şubat 2022]; Erişim adresi: <http://minerva-access.unimelb.edu.au/handle/11343/35809>
86. Yu Q, Zhou Q, Wei Q, Li J, Feng C, Mao X. SEMG1 may be the candidate gene for idiopathic asthenozoospermia. *Andrologia.* 2014;46(2):158-66.
87. Zhou Q z., Guo X b., Zhang W s., Zhou J h., Yang C, Bian J, vd. Expressions of miR-525-3p and its target gene SEMG1 in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Andrology.* 2019;7(2):220-7.
88. Yamasaki K, Yoshida K, Yoshiike M, Shimada K, Nishiyama H, Takamizawa S, vd. Relationship between Semenogelins bound to human sperm and other semen parameters and pregnancy outcomes. *Basic Clin Androl.* 08 Ağustos 2017;27:15.
89. Légaré C, Droit A, Fournier F, Bourassa S, Force A, Cloutier F, vd. Investigation of male infertility using quantitative comparative proteomics. *J Proteome Res.* 05 Aralık 2014;13(12):5403-14.
90. Sävbblom C, Halldén C, Cronin AM, Säll T, Savage C, Vertosick EA, vd. Genetic variation in KLK2 and KLK3 is associated with levels of hK2 and PSA in seminal plasma and in serum in young men. *Clin Chem. Mart* 2014;60(3):490-9.
91. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod Oxf Engl.* Kasım 2002;17(11):2904-11.
92. Lövgren J, Airas K, Lilja H. Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2). *Eur J Biochem.* 1999;262(3):781-9.

