

T.C
İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN ERKEK İNFERTİLİTESİNDE
CATSPER İYON KANAL EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İMMUNOFLORESAN YÖNTEM UYGULANARAK İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nergis Özlem Kılıç

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Tülay İrez

İSTANBUL
Ocak 2021

T.C. YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesin de yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 06/01/2021

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Jüri Başkanı

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı

.... Üniversitesi

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı

..... Üniversitesi

T.C.

İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ONAY BELGESİ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Klinik Embriyoloji Bilim Dalı 1911102007 numaralı yüksek lisans öğrencisi Nergis Özlem Kılıç'ın “Sperm kriyoprezervasyonunun erkek infertilitesinde CatSper iyon kanal ekspresyonları üzerine etkilerinin immunofloresan yöntem uygulanarak incelenmesi” adlı tez çalışması, Enstitümüz Yönetim Kurulunun 06/01/2021 tarih ve 2019/13 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06/01/2021

Öğretim Üyesi Adı ve Soyadı		İmzası
Tez Danışmanı	Prof.Dr.Tülay İrez	
Jüri Üyesi	Prof.Dr.İmer Okar	
Jüri Üyesi	Prof.Dr.Ayhan Bilir	

İÇİNDEKİLER

Onay Sayfası	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İçindekiler	vi
Semboller ve Kısaltmalar Listesi	vi
Tablo Listesi	vii
Şekil Listesi	viii
Beyan	ix
Önsöz	x
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Erkek Genital Sisteminin Embriyolojik Gelişimi	4
2.2. Erkek Genital Sisteminin Anatomisi	4
2.3. Erkek Hipotalamus Hipofiz ve Testis Aksı	5
2.4. Spermin Yapısı, Oluşumu ve Fizyolojisi	6
2.4.1. Spermatogenez	7
2.4.2. Spermiyogenez (Spermatid Evre)	8
2.4.3. Spermatogenezde Hormonal Kontrol	9
2.4.4. Diğer Faktörler	10
2.4.5. Spermiyogenez ve Apoptoz	11
2.4.6. Spermatozoa	12
2.4.7. Sperm Motilite Fizyolojisi	12
2.5. Semen Genel Özellikleri	13
2.6. İnfertil Erkek Bireylerin Değerlendirilmesi	14
2.7. Öykü ve Fizik Muayene	15
2.8. Laboratuvar ve Görüntüleme	15
2.9. Erkek İnfertilite Nedenleri	16
2.9.1. Pre-Testiküler Nedenler	16
2.9.1.1 Hipotalamus Hastalıkları	16
2.9.1.2. Hipofiz Hastalıkları	17
2.9.2. Testiküler Nedenler	17
2.9.2.1. Kromozom Kaynaklı	17

2.9.2.1.1. 46 XX Male Sendromu	17
2.9.2.1.2. Klinefelter Sendromu	17
2.9.2.1.3. 47, XYY Sendromu	18
2.9.2.2. Gonadotoksin Kaynaklı	18
2.9.2.3. Sistemik Hastalık Kaynaklı	18
2.9.2.4. Defektif Androjen Aktivitesi Kaynaklı	18
2.9.2.4.1. 5 α - Reduktaz Eksikliği	18
2.9.2.4.2. Androjen – Reseptör Eksikliği	18
2.9.2.5. Testis Hasarlanmaları	19
2.9.2.6. Kriptorşidizm (İnmemiş Testis)	19
2.9.2.7. Varikosel	19
2.9.2.8. İdiyopatik Nedenler	19
2.9.3. Post Testikular Nedenler	19
2.9.3.1. Reprodüktif Yol Obstrüksiyonu	19
2.9.3.1.1. Doğumsal Kaynaklı Blokaj Oluşumları	19
2.9.3.1.2. Edinsel Blokajlar	20
2.9.3.1.3. Fonksiyonel Blokajlar	20
2.9.3.2. Sperm Fonksiyonu ve Hareketliliği ile İlgili Hastalıklar	20
2.10. Fertilizasyonun Moleküler Temeli	20
2.10.1. Sperm Hücresinin Kadın Genital Sistemindeki Transportu	21
2.10.2. Akrozom Reaksiyonu	23
2.10.3. Zona Pellusida (ZP)'nın Biyokimyasal Modifikasyonu ve Penetrasyonu	24
2.10.4. Sperm -Yumurta Birleşimi	25
2.11. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Kriyoprezervasyon	25
2.11.1. Kriyoprezervasyon (Dondurarak Saklama)	25
2.11.2. Kriyobiyooloji	26
2.11.3. Kriyoprezervasyon Kaynaklı Hücresel Hasarlanmalar	27
2.11.4. Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılan Kriyoprotektan Maddeler	28
2.11.5. Kriyoprezervasyon Yöntemleri	29
2.11.6. Kriyoprezervasyon Endikasyonları	29
2.11.6.1. Fertilitenin Korunması	29

2.11.6.2. İnfertilite Tedavisi	29
2.11.6.3. Donasyon Spermlieri	30
2.12. İyon Kanal Sınıflandırılması	30
2.12.1. CatSper İyon Kanal Ailesi	30
2.12.2. Proton Voltaj Kapılı İyon Kanalı (Hv1)	36
2.12.3. Potasyum Voltaj Kapılı İyon Kanalı	37
2.12.4. Kalsiyum (Ca^{+2}) İyonu ile Aktive Edilen Klorür (Cl) Kanalı	37
3.GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Hasta Seçimi	39
3.2. İyon Kanallarını Tespit Etmek için Kullanılan Materyaller	39
3.2.1. İyon Kanallarını Tespit Etmek için Kullanılan Kimyasallar	40
3.3. Kullanılan Yöntemler	41
3.3.1. Swim-Up Tekniği ve Diff-Quik Boyama	41
3.3.2. Sperm Kriyoprezervasyon Methodu	42
3.3.2. İmmunohistoperoksidaz Yöntemi	43
3.3.3. İstatistiksel Yöntemler	44
4.BULGULAR	46
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	63
7. ÖZET	64
8. SUMMARY (ABSTRACT)	66
9. KAYNAKLAR	67
10. EKLER	73
11. ÖZGEÇMİŞ	76

II. SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
AR	Akrozom Reaksiyonu
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
Ca+2	Kalsiyum
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ- WHO	Dünya Sağlık Örgütü - World Health Organization
FBA	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Albumini)
IVF	İn Vitro Fertilizaton (Laboratuvar ortamında Fertilizasyon)
LH	Lüteinizan Hormon
ml	Mililitre
OAT	Oligoastenoteratozoospermi
PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)
PFA	Paraformaldehit
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
Rpm	Revolutions per minute (Dakika Başı Devir)

III. TABLO LİSTESİ

Tablo No	Tablonun İsmi	Sayfa No
Tablo 1	WHO 2010 yılı Semen Parametreleri Referans Değerleri	16
Tablo 2	Normospermi, teratozoospermi, oligoastenoteratozoospermi ve astenoteratozoospermi hasta gruplarının spermiyogram laboratuvar bulgularının Kruskal Wallis ve Mann Whitney testi kullanılarak ilişkilendirilmesi tablosu.	49
Tablo 3	Normospermi hasta grubunun boyama öncesi ve sonrası değerlerinin Wilcoxon Signe Ranks Test uygulanarak karşılaştırılması tablosu.	51
Tablo 4	Teratozoospermi hasta grubunun boyama öncesi ve sonrası değerlerinin Wilcoxon Signe Ranks Test uygulanarak karşılaştırılması tablosu.	52
Tablo 5	OAT hasta grubunun boyama öncesi ve sonrası değerlerinin Wilcoxon Signe Ranks Test uygulanarak karşılaştırılması tablosu.	53
Tablo 6	Astenoteratozoospermi hasta grubunun boyama öncesi ve sonrası değerlerinin Wilcoxon Signe Ranks Test uygulanarak karşılaştırılması tablosu.	54
Tablo 7	Normospermi, astenoteratozoospermi, oligoastenoteratozoospermi ve teratozoospermi gruplarının sperm kriyopreservasyon işlemi öncesi ve sonrası CatSper4 pozitifliğinin karşılaştırılması tablosu.	55
Tablo 8	Spearman's rho korelasyon analiz sonuçları tablosu.	56

IV. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No.	Şekilin İsmi	Sayfa No
Şekil 1	Erkek Üreme Sisteminin Hormonal Kontrolü	6
Şekil 2	Sperm Hücre Yapısı	7
Şekil 3	Spermatogenez sürecinde gerçekleşen sperm oluşum basamakları	8
Şekil 4	Akrozom reaksiyonu	13
Şekil 5	Sperm hücresinin yumurta hücresine giriş aşamaları	23
Şekil 6	CatSper proteini bulundurmeyen sperm (Null Sperm) ve normal Sperm	33
Şekil 7	Sperm flagellasında lokalize olan CatSper iyon kanalının fonksiyonu ve düzenlenmesi	33
Şekil 8	CatSper iyon kanal proteininin fonksiyonel önemi	35
Şekil 9	Diff-Quik boyama tekniği ile boyanan sperm hücrelerinin morfoloji değerlendirilmesi görüntüsü	48
Şekil 10	Spermde bulunan pozitif ve negatif CatSper4 protein ekspresyonu (100X floresan mikroskopu görüntüsü, beyaz ok pozitif CatSper4'ü gösterir iken, ok başı negatif CatSper4' ü göstermektedir.)Bar10 µm.	48

V. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı herhangi bir davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, çalışma ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar listesi şeklinde eklediğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

NERGİS ÖZLEM KILIÇ

VI. ÖNSÖZ

Bu çalışmanın, fikir halinden bu yana gerçekleşmesine en büyük katkıları nedeniyle öncelikle saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tülay İREZ ardından Dr.Öğr.Üyesi Nuray DAYIOĞLU ‘na teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek Lisans eğitimi dönemim boyunca ders ve proje döneminde tüm hocalarıma akademisyen olmanın yanında iyi bir eğitimci olmanın önemini göstermelerinin yanısıra sevgilerini benden eksik etmemelerinden dolayı saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum. Araştırma süresi boyunca verdiği tüm destek ve yardımları nedeniyle birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum M.Sc. Ecem ASLAN ‘a teşekkürlerimi sunarım. Başarılı olmam için her zaman beni destekleyen, sevgili eşim Murat KILIÇ ve kızıma koşulsuz sevgisiyle bakan annem Aynur KURU’ ya teşekkür ederim.

1.GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, yaklaşık olarak 12 ay korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamama olarak tanımlanmaktadır. Çiftlerin yaklaşık %15'inin infertilite nedeniyle tıbbi yardıma ihtiyaç duyduğu ve fertilite sorunlarının yaklaşık olarak %50'sinin erkek faktörüne bağlı olduğu gözlemlenmiştir ¹. Erkek faktörlü infertilite sebebinin çoğunluğunun hatalı spermatogenezele ilişkili olduğu anlaşılmıştır ².

Sperm öncelikle kadın üreme sistemine girer ve bu sistem osmotik basınç, farklı iyon konsantrasyonları ve pH ile değişebilen mikro çevreye sahiptir. Spermin kadın üreme sistemine adaptasyonu sırasında kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon olayları gerçekleşir, bu süreçler ise iyon kanallarının normal fonksiyonuna bağlı olarak çalışmasıyla alakalıdır. Bu nedenle, iyon kanal aktivitelerinin sperm fizyolojisi ve aktivasyonu üstünde büyük ölçüde etkisi gözlemlendiğinden doğum kontrolü ve infertilite için kullanılabileceği düşünülmüştür ³.

Erkek fertilitasını tayin etmek için yapılan spermiyogram testinde, hastadan alınan örneğin likefaksiyon süresi, rengi, pH değeri, viskozitesi gibi kriterler değerlendirilir. Analiz sonucu elde edilen değerlerle, sperm konsantrasyonu, hacmi, hareketliliği, ilerlemesi, lökosit sayısı ve morfolojisi gibi parametreler belirlenerek bu kriterler, WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından tanımlanan referans değerleri ile karşılaştırılır ve sonuca varılır ⁴. Spermiyogram analizi sonucunda hesaplanan sperm sayısı 15 milyon/ml'den az ise oligozoospermi, ilerleyici motil spermatozoa yaklaşık %32' den daha az ise astenozoospermi, normal morfolojideki spermilerin ise yaklaşık %4' den az olması durumu teratozoospermi olarak tanımlanırken bunlara ek olarak, spermilerin miktar, biçim, hareket bakımından normal olması normozoospermi olarak adlandırılmaktadır⁵.

Sperm hücresi içerisinde bulunan iyon kanallarının başlıcaları, Cation Channel Sperma (CatSper), Potassium Channel SubfamilyU1 (KCNU1), Proton Voltage-Gated Ion Channel1(Hv1), Transmembrane protein (TMEM16)'dir.

CatSper dört ayrı gözenek oluşturuca alfa(α) CatSper 1-4 alt biriminden ve CatSper α (alfa), CatSper δ (gama), CatSper β (beta) olmak üzere ayrıca üç yardımcı alt birimden oluşmaktadır. CatSper 1,2,3 ve 4 düşük voltaj bağımlı, pH duyarlı ve her bir sperm hücresine özgü kalsiyum seçmeli iyon kanallarıdır. Pozitif yüklü kalsiyum iyonlarının sperm hücrelerinin içine girmesini kontrol eder ve bu durum sperm hiperaktivasyonu ve erkek fertilitesi için gerekli bir süreçtir ⁶. CatSper kanalı, diğer iyon kanalları ile birlikte sperm motilitesindeki hızlı değişiklikler için gerekli olan kalsiyum girişini kolaylaştırırken, fertilizasyon süreci için de spermin yumurtaya girmesi esnasında dişi reproduktif sistemin diğer kademelerine doğru ilerlemesine yardımcı olmaktadır. Spermatozoa erkek üreme sistemi içerisinde hareket yeteneğinden yoksundur, spermatozanın hareket yeteneğini kazandığı yer kadın üreme sistemidir ve bunun için sperm sitoplazmasının alkalizasyonu gereklidir, CatSper spermatozoanın hiperaktif motilite kazanması ve yumurtayı dölemesi için hücre içi alkalizasyonu gerçekleştirir. Bahsedilen bu görevlerden dolayı CatSper kanallarında meydana gelen mutasyonların insanlarda infertilite ile ilişkili olduğu saptanmıştır ⁶. CatSper genlerinin bozulması, spesifik motilite parametrelerini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, CatSper1'siz farelerin sperm yüze hızlarında azalma gözlemlenirken, CatSper'siz fare spermin başlangıç motilitesinin normal olduğu fakat en önemli sorununun hiperaktif motilite eksikliği olduğu saptanmıştır ⁶.

Doğal yolla gerçekleşen fertilizasyon da yumurtaların plazma membranı sperm ile birleşme sürecinin hemen ardından, kumulus oophorus ve zona pellucida (ZP) ya penetrasyon olayı gerçekleşir. Yapılan bir diğer çalışmada ise, CatSper'in yumurtanın dış katmanları yüzeylerinden penetrasyonu kolaylaştırdığını göstermek için, enzim kullanılarak dış tabakaları kaldırılan zona pellucidasız yumurtalar ile normal sperm ve mutant sperm birleştirilmiş ve işlem sonucunda her iki durumda da penetrasyon sonrası fertilizasyon gerçekleşmiştir ⁷.

Yapılan bu tez çalışmasında, sperm kriyoprezervasyonu işleminin semen analiz sonuçları farklı olan oligoastenoteratozoospermik, astenoteratozoospermik ve teratospermik hasta gruplarında kontrolle kıyasla, Catsper4 iyon kanal ekspresyonlarına etkisinin immunofloresan yöntem uygulanarak araştırılması amaçlanmış ve kriyoprezervasyon işleminin CatSper4 iyon kanallarına ekspresyonlarına etkisinin incelenmesinin olumlu ya da olumsuz sonuçlarının klinikte kullanım bakımından faydalı olacağı düşünülmüştür.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sisteminin Embriyolojik Gelişimi

Erkek genital sistemi oluşturan yapılar başlıca üç ana bölüme ayrılmaktadır; bunlar gonadlar, genital boşaltım kanalları ve dış genital organlarından oluşmaktadır. Üriner sistemin içerisinde bulunan yapılar, erkek genital sisteminin boşaltım kanalları ve gonadların bazı kısımları mezodermden köken alır iken, Müller kanalları olarak bilinen paramезonefrik kanallar ise gestasyon aşamasının 44. İle 48. günleri arasında karın boşluğunun iç yüzey dokusunda bulunan sölom epitelinin içeri doğru kıvrılması ile meydana gelir ⁸.

Erkek genital sisteminin gelişiminde öncelikle SRY (Sex Determining Region of Y) proteini rol alır, SRY geni bulundurmeyen embriyolar, Y kromozomu içerse bile dişi olarak gelişme gösterirler. Sertoli hücreleri Mülleryan İnhibe Edici Faktör (MIS) ve Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) salgılayarak mezenkim hücrelerinin testise göç etmesini sağlarlar ve böylece erkek germ hücrelerinin mayoz bölünmesini engellemiş olurlar. Testise göç eden mezenkim hücreleri ise burada Leydig hücrelerine dönüşür ve bu hücreler testosteron üretimi yaparlar. Testosteron, genital dokular ve testislerde bol miktarda bulunur ve 5 α -redüktaz enzimi yardımıyla di-hidrotestosterona (DHT) dönüştürülerek, prostat, üretra, penis, skrotum gelişimi ve testislerin skrotuma inişinde görev alır ⁹.

2.2. Erkek Genital Sisteminin Anatomisi

Erkek üreme sisteminde bulunan organlar dış ve iç genital organlar olmak üzere ikiye ayrılır. İç genital organlar, epididim, duktus deferens, prostat, testis, spermatik kord, seminal kesecikler, ejakulator kanal, Cowper adı verilen bulbouretral bezlerden oluşurken, dış genital organlar ise, penis ve skrotumdan meydana gelir ¹⁰.

Testislerin boyutları yaklaşık olarak 4x2.5x3 cm olup, volümü ise ≥ 15 ml'dir. Testisler yapılarında iki çeşit hücre tipi bulundurur, bunlardan biri testesteron hormonu üretiminden sorumlu Leydig hücreleri iken diğeri spermlerin beslenmelerini ve inhibin hormonunu salgılanmasından görev alan Sertoli hücreleridir. Ayrıca, bahsedilen bu iki hücre tipi hipofiz bezi tarafından yönetilir ¹¹. Leydig hücreleri

tübüller arasında bulunan bağ dokuda konumlanmış iken, Sertoli hücreleri ise germinal hücreler ile birlikte seminifer tübüllerde yer alır ve kan-testis bariyerinin oluşumunda rol oynarlar ¹².

Epididim, testisin üst arka kenar kısmında tunika içerisinde kanal yumağı biçiminde bulunur görevi ise spermlerin motilite, morfoloji ve fertilité bakımından olgunlaşmasına yardımcı olmalarıdır ¹³.

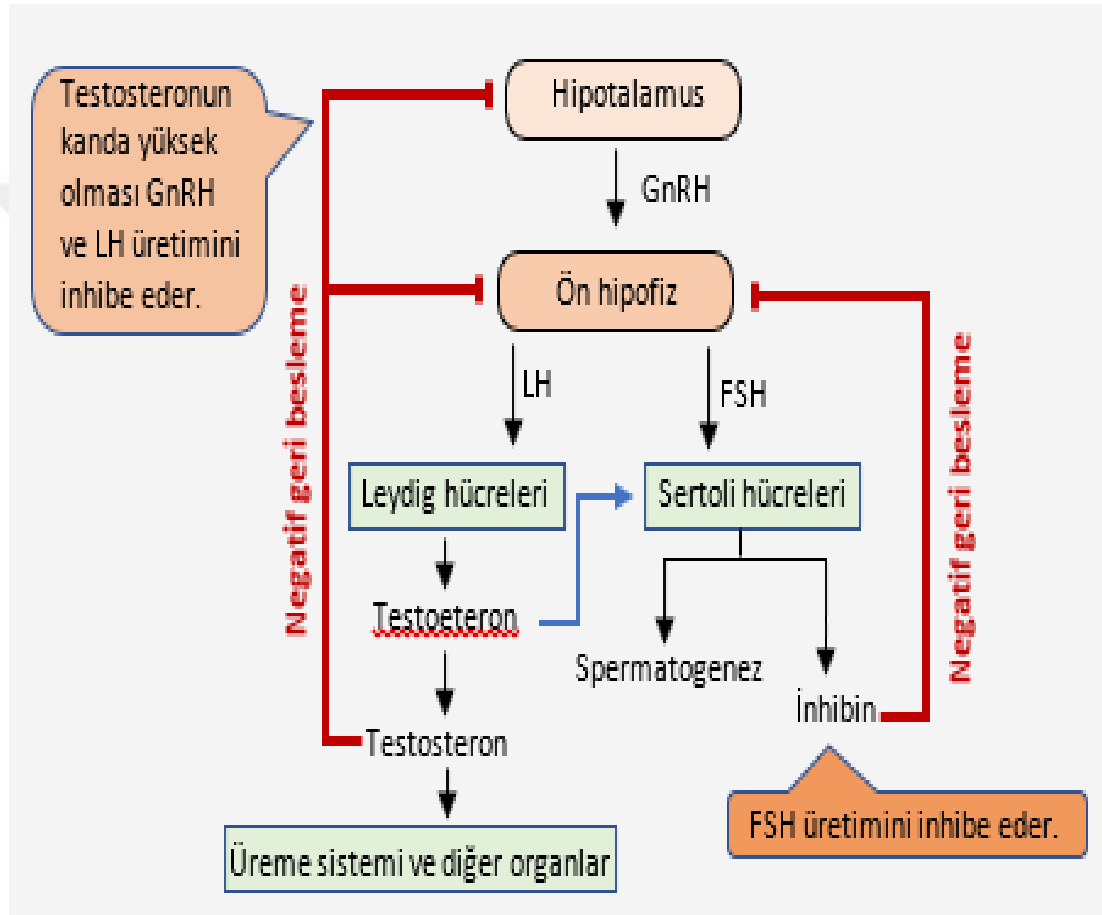
Spermatik kord testisin içerisindeki vasküler yapıları, sinirleri ve (vaz) deferensi bulundurur ¹⁴. Ayrıca, duktus deferens inguinal kanal ile birlikte karın boşluğuna uzanır ve seminal kese kanalı ile birleşerek ejakulator kanalı oluşturur ¹⁵. Seminal keseler, tübüler yapıda bulunan çift bezdir. Fibrinojen, sitrik asit, fruktoz, prostaglandinler ve birçok spesifik protein içeren salgılar üreterek ejakulatın koagülasyonunu, spermatozoanın aktive olmasını ve semene bazik özellik kazandırır. Spermin temel besin kaynağı fruktozdur ve prostaglandinler ise servikal mukusla etkileşime girerek spermin hareketliliğini sağlamak için uygun ortam oluşturur. Ayrıca bunlara ek olarak, tuba uterina ve uterusu kasılma oluşturup spermlerin ovuma ulaşmasını sağlar ¹⁶. Prostat bezi ise rektumun önünde lokalize olup, seminal prostat spesifik antijen (PSA) adı verilen asidik salgıları ile semenin likefaksiyonunu sağlarlar ¹⁷.

Volümü yaklaşık 2-5 ml olan semen (ejakulat) içerisinde 300 ile 400 milyon aralığında sperm hücresi bulundurabilir. Semen %60 ı seminal keselerden, %30 u prostattan ve %10 u epididim ile diğer bezlerden salgılanan sıvılardan oluşur¹⁸.

2.3. Erkek Hipotalamus Hipofiz ve Testis Aksı

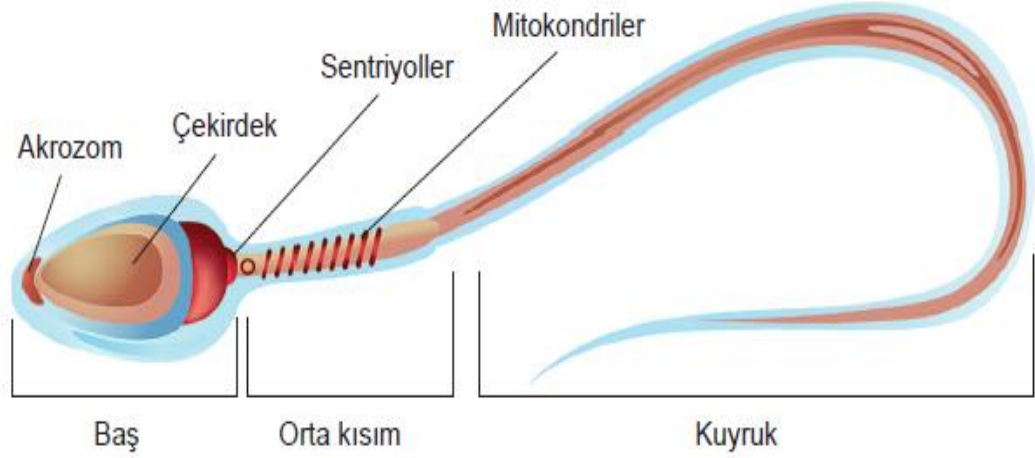
Erkek hipotalamo-hipofizer-gonadal (HHG) aksın önemli iki görevi vardır, bunlardan biri üreme için gerekli olan seks hormonlarını salgılamak diğeri ise spermatogenetik hücrelerin gelişimine katkıda bulunmaktır ¹⁹. Hipotalamustan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salınımı yapılır ve dolaşımdan geçerek ön hipofize gelir burada bulunan gonadotropik hücrelerin reseptörleri ile bağlanarak luteinize edici hormon (LH) ve follikül uyarıcı hormon (FSH) salgılanmasını sağlar.

FSH ve LH sistemik dolaşım sayesinde testise iletilir. Testesteron LH etkisi ile birlikte Leydig hücrelerinden salınırken, FSH ise Sertoli hücrelerinden inhibin,ABP, aktivin gibi birçok molekülün salgılanmasını sağlar. Ayrıca, bunlara ek olarak GnRH salınımı pulsatil gerçekleştiği için, FSH ve LH salınımı da pulsatil olur ²⁰.



Şekil 1. Erkek Üreme Sisteminin Hormonal Kontrolü ²⁰.

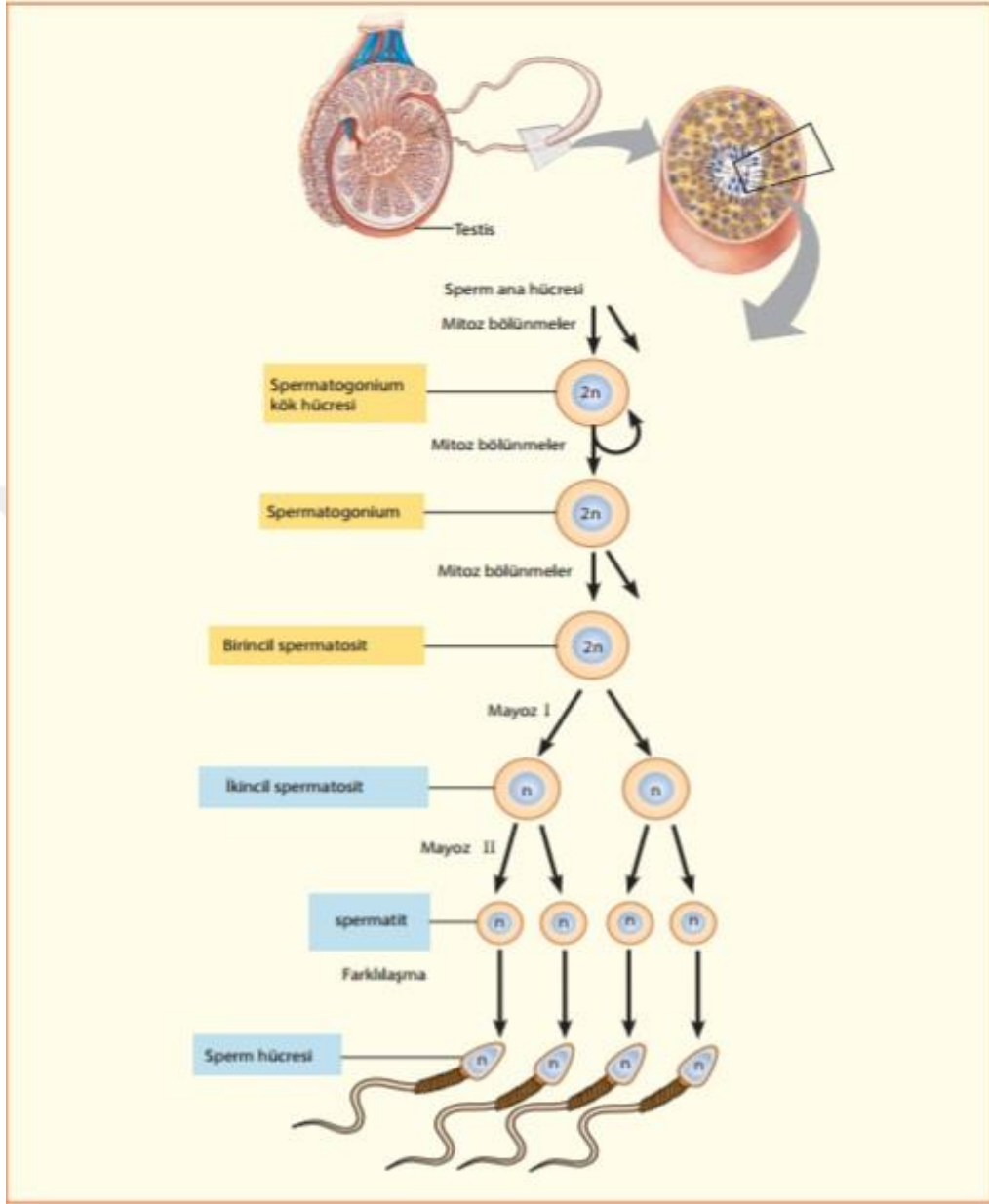
2.4. Spermin Yapısı, Oluşumu ve Fizyolojisi



Şekil 2. Sperm Hücre Yapısı ²¹.

2.4.1. Spermatogenez

Spermatogenez testisin seminifer tübüleri içerisinde gerçekleşen sperm hücresinin farklılaşması olayıdır. Germ hücreleri kökenlerini endodermden alır ve sperm hücresinin seminifer tubullerinde gerçekleşen ilk farklılaşma adımlarını hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin hormonunun etkisi ile birlikte spermatogonyumların oluşumu takip eder. Hormonal iletişim ve etkileşim puberteden hemen önce başlayıp ve hayat boyu devam etmektedir. Puberte dönemi ile birlikte spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeler geçirerek çoğalmaya başlarlar ve A tipi diye adlandırılan spermatogonyumları meydana getirirler. Tip A spermatogonyumlarının birçok kez mitoz bölünme geçirmelerinin ardından B Tipi denilen spermatogonyumları meydana getirirler ve Tip B spermatogonyumlar tekrar mitoz bölünme geçirerek primer spermatositleri oluşturur. Her bir primer spermatosit 46 (44XY) kromozom içerir, birinci mayoz bölünmelerini gerçekleştirdikten yaklaşık olarak 21-22 gün sonra profaz aşamasına geçerler ve bu evre sonunda mayoz bölünme tamamlanarak 23 kromozom içeren seconder spermatositler (22Y ya da 22X) meydana gelir. Seconder spermatositler tekrar mayoz bölünme geçirerek spermatidleri oluşturur. Sperm hücrelerinin farklılaşma süreçleri boyunca Sertoli hücrelerinin etrafında bulunan girintilere gömülü olarak konumlanırlar. Sertoli hücreleri ise, sperm hücrelerini destekleyerek onları korur ve besin ihtiyaçlarını sağlarlar ²¹.



Şekil 3: Spermatogenez sürecinde gerçekleşen sperm oluşum basamakları ²¹.

2.4.2. Spermiyogenez (Spermatid Evre)

Spermiyogenez, spermatidlerin bölünme aşamaları gerçekleşmeden farklılaşarak olgun sperme dönüşmesi sürecidir. Bu farklılaşma evresi 3 adımda

gerçekleşmektedir, bunlardan birincisi Golgi Fazı olarak adlandırılır. Spermatid hücrelerinin sitoplazmasında çekirdek (nucleus), golgi kompleksi, ribozom, mitokondri ve düz yapılı endoplazmik retikulum bulunur. Akrozomal granül adı verilen yapı Golgi kompleksinde meydana gelir ve sperm hücresine hareket yeteneğini sağlayan flagellum burada oluşur. İkinci aşama ise Akrozomal Faz olarak adlandırılır ve Akrozomal granül burada akrozomu meydana getirir bu sırada nükleus uzar ve yoğunlaşır ardından sentriyol gelişir ve flagellumu oluşturur. Sperm hücresinde bulunan mitokondriler flagellumun proximal bölümünde yer alıp hareketi için enerji sağlarlar ve böylece spermin orta kısmını meydana getirirler. Son faz olgunlaşma fazıdır, bu aşamada ise sperm hücresinin tüm organelleri tamamlanır ve geriye kalan artıklar Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek, ardından olgunlaşan spermiler seminifer tubül lumenine aktarılırlar. Sperm hücrelerinin işlevsel olarak olgun hale geldikleri kısım epididimdir, buradan da ejakülasyon yolu ile vaz deferens yardımıyla üretra bölününe oradanda dışarıya atılırlar. Spermatogonyum hücresinin olgun sperm haline erişmesi için yaklaşık olarak gereken süre 64 gündür ²¹.

Olgun sperm hücresi baş kısmında haploid nükleusu ve nükleusun ön bölgesinde de fertilizasyon için gerekli olacak enzimleri içeren akrozomu ve yaklaşık olarak 50 µm uzunluğunda hareketini sağlayan kuyruk bulundurur. Ayrıca, orta kısım esas kısım ve son kısım olmak üzere ana parçadan oluşur. Orta parçada hareket için gerekli enerjiyi sağlayan mitokondriler bulunur. Spermiyogenez sırasında haploid nükleusta bulunan histonlar arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirirler bunun sonucunda nükleusta transkripsiyon sone erer ve böylece sperm genomik DNA sını stabilize eder ²¹.

2.4.3. Spermatogenezde Hormonal Kontrol

Spermatogenez puberte döneminin öncesinde başlar ve FSH ile LH hormonları tarafından kontrol edilir. Sertoli hücrelerinin ve Leydig hücrelerinin gelişimleri ve fonksiyonlarını yapabilmeleri için gerekli olan hormon FSH' tır. Puberte öncesi dönemde spermatogenez olayının gerçekleşmesi için testosteron hormonu yeterli değildir, erişkin erkek bireylerde ise önceden başlamış olan

spermatogenezin devamı için, LH' in etkisiyle salgılanan testosteron en önemli hormon olarak görev alır. Ayrıca, FSH ise spermatogenez olayının mayoz bölünme öncesi ve sonrasın da etkisini göstermektedir. Testosteron hormonu ise Sertoli hücrelerini uyararak etkisini gösterir ²¹.

Hipotalamus bezinde meydana gelebilecek herhangi bir bozuklukta testislerde atrofi gelişebilir ve böyle durumlarda germ hücrelerinde azalma, Leydig hücre hiperplazisi, peritübüler hyalinizasyon gözlemlenmektedir. Bilindiği üzere LH'in spermatogeneze katkısı sadece Leydig hücrelerini uyararak testosteron hormonu salgılatmasıdır, oysaki FSH ve testosteron hormonlarının reseptörleri germ hücrelerinde bulunmadığı için bunların asıl etkiledikleri Sertoli hücreleridir. Testosteron hormonu Sertoli hücrelerinin spermatidlere yapışmasını sağlar ve spermatogenezde bu şekilde görev alır. Ayrıca, Testosteron hormonu ve FSH germ hücrelerinin apoptozunu önler. Testislerin içerisinde yeterli konsantrasyon da testosteron hormonu yoktur, dolayısı ile spermatogenezin düzgün şekilde devam edebilmesi için testislerde normalde dolaşımda bulunan testosteron seviyesinin en az 100 katı kadar testosteron içermelidir. Primer spermatositler ise östrojen reseptörleri bulundurmaktadır ve bu reseptörlerin aktive olması spermatogenez esnasında gereklidir. Tiroid hormonu ise Sertoli hücrelerinin yardımı ile spermatogenez de görev alır ²¹.

2.4.4. Diğer Faktörler

Testislerde gerçekleşen spermatogenezin sağlanmasında yukarıda bahsedilen hormonların dışında birçok faktör daha etkilidir. Y kromozomunun uzun kolunda bulunan genlerin spermatogenezin düzenlenmesinde de önemli rolleri vardır. DAZ (deleted in azoospermi) olarak gösterilen gen bunlardan sadece birisidir. Obstrüksiyonu olmayan azoospermili durumlarda yaklaşık olarak % 13'ünde bu genin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, fibroblast büyüme faktörü (FGF), seminifer büyüme faktörü, İnsülin benzeri büyüme faktörü -1 (IGF- 1), mayoz bölünme inhibe edici ve önleyici maddelerin yanı sıra otokrin veya parakrin faktörlerin de spermatogenez sürecinde önemli rolleri bulunmaktadır. Bunların en önemlileri ise interleukinler (IL- 1, IL- 2 ve IL- 4), leukemia inhibitör faktör (LIF) ü , kök hücre faktörü, kemik morfogenetik protein-4 gibi proteinlerdir ²¹. İnsan sperm membran protein-1 (hSMP-

1) sperm hücresinin baş kısmında bulunan akrozom bölgesinde lokalize olmuş bir proteindir ve testiste spermatogenezin her safhasında neredeyse tüm germ hücrelerinden salgılanmaktadır ve germ hücrelerinin farklılaşmasında görev alır ²⁴. Ayrıca, bunlara ek olarak çinko, bakır, kalsiyum ve magnezyum spermatogenez esnasında nükleusta bulunan kromatin yapısının yoğunlaşmasında rol oynarlar ²¹. Spermatogenez esnasında herhangi bir bozukluk gerçekleşir ise bu durum testiste makrofaj sayısının artmasına sebep olur ve dolayısı ile testiküler makrofaj sayısındaki artış sertoli hücre aktivasyonunu etkiler ²¹.

2.4.5. Spermiyogenez ve Apoptoz

Apoptoz sürecinin bir diğer adı programlanmış hücre ölümü olup, hücrelerin yaşamları boyunca yapım ve yıkım dengesini düzenleyerek gereksiz hücrelerin yok olmasını sağlar. Apoptoz süreci boyunca hücre morfolojisinde birçok değişiklik meydana gelmektedir, bunlardan ilki hücrenin büzülmesi ardından kromatinin parçalanması, hücre membranında kabarcıkların meydana gelmesi, nükleus bölümünde yoğunluk ve süreç sonunda ise fagosite edilebilen apoptotik cisimlere bölünme gerçekleşmektedir. Apoptoz ve nekroz birbirlerinden farklı gerçekleşen süreçlerdir. Apoptoz esnasında sitoplazmanın parçalanma sürecinde meydana gelen kabartılar makrofajlar tarafından fagosite edilir ama bunun sonucunda herhangi bir enflamatuvar yapı gözlemlenmez iken, nekrozda ise hücrenin şişmesi ardından organelerin hacimlerinin artması ve patlayarak tüm içeriğin hücre dışına atılımı gerçekleşir, dolayısı ile makrofajlar nekrotik hücre kalıntılarını fagosite ederlerken enflamatuvar yapının oluşmasını sağlayan molekülleri salgırlar ²¹.

Germ hücreleri de belli aşamalar da apoptoz yoluyla yok edilirler. Bu fizyolojik süreç içerisinde Bcl-2 ailesinde bulunan proteinler germ hücre homeostazisi için yaşamsal sinyal iletirler. Bcl- 2, Bcl- w, Bcl- xL, Mcl- 1 ve A1 proteinleride bu süreçte önemli rol alırlar. Bahsedilen bu proteinler hücrenin yaşaması için gerekli sinyalleri iletirken Bak, Bax, ve Bim proteinleri ise hücrenin ölümünün gerçekleşmesi için sinyal yollar. Germ hücreleri gelişimlerini sağlıklı şekilde tamamlayamaz ise apoptoz döngüsüne girerek ölümleri gerçekleşir. Ayrıca bunlara ek olarak, toksik maddeler, radyasyon, transforme edici büyüme faktörü (TGF), GnRH antagonistler, stres gibi durumlar apoptoz süreçlerini hızlandıran durumlar iken, östrojen

hormonunun seminifer t b lle etkileşimi LIF ve kök hücre faktörleri ise apoptozu engel olurlar ²¹.

2.4.6. Spermatozoa

Spermatozoa morfolojik olarak matür ancak fonksiyonel olarak immatür halde bulunan hücrelerdir. Spermiler motil olma özelliklerini daha önceden de bahsettiğimiz üzere epididim de kazanırlar ve epididim fonksiyonu ise hormonu dihidrotestosterondur. Araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada epididimin baş kısmından alınan sperm hücrelerinin ovumu fertilize etmediğı fakat kuyruk bölümünden alınan spermilerin fertilizasyonu gerçekleştirdiğini gözlemlemişlerdir ve dolayısıyla bu araştırma sonunca spermilerin fertilizasyon kabiliyetlerini epididimde kazandıklarını ortaya  ıkmiştır ²¹.

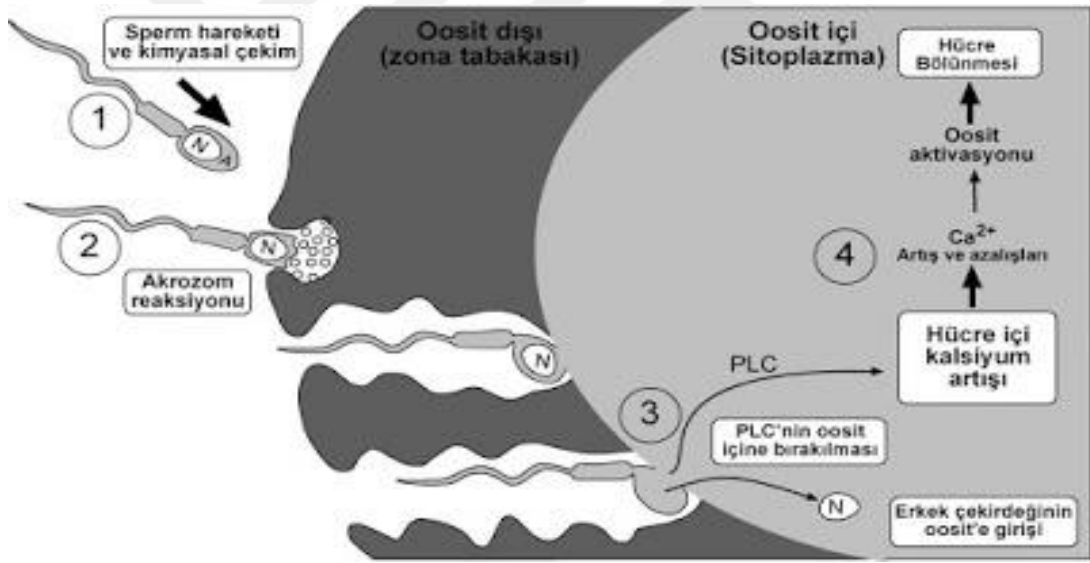
Spermatozoa, hücresi yaklaşık olarak 60 mikron uzunluğunda olup dört kısımdan oluşmaktadır. Baş bölüm uzunluğı 5- 6 mikron ve genişliğı 2x53x5 mikrondur. Bu bölgede bulunan akrozom yapısı, başın yaklaşık olarak %40 - %70 ini oluşturken, orta parçanın genişliğı ise 1 mikron ve uzunluğı 1,5x baş uzunluğı kadardır. Kuyruk bölümünün yaklaşık olarak boyu ise 45 mikrondur ve baş bölümünün bir kısmının içerisinde paternal DNA içeren çekirdek vardır ²¹.

2.4.7. Sperm Motilite Fiziyojisi

Spermin motil özellik kazanması için sperm hücresinin içerisine giren Ca²⁺ iyonunun önemli görevi vardır. CatSper protein ailesi genel olarak sperm kuyruğunun esas parçasında konumlanmış olup ve Ca²⁺ iyonunun hücre içine alınmasında rol oynar. CatSper geni ortamda bulunan pH' ın değışikliklerinden etkilenmektedir. Ayrıca bu genin yanında KSper (Slo3) geni de sperm kuyruğunda bulunmuş olup Ca²⁺ iyonunun hücre içine alınmasında etkilidir. Araştırmacılar tarafından yapılan çalışma da sperm motilite bozukluğı olan olgularda CatSper geninin mRNA ekspresyonun daha az gerçekleştiğı gözlemlenmiştir ²². Spermatogenezde hücreler arası su transportunu Aquaporinler (AQP) sağılar ve yaklaşık olarak 10 farklı Aquaporin türünün varlığı bilinmekte olup i lerinde en  emlisi AQP-7' dir ve spermin kuyruk bölümünde lokalize olmuştur. Yapılan başka bir çalışmada ise AQP-7' nin negatif sperm örneklerinde sperm motilitesinin

yavaşladığı ve epididimal geçiş boyunca sperm hücresinin gelişme göstermediği anlaşılmıştır²².

İmmotil sperm sayısından TNF - α , IL1 - β ve IL -6 gibi artmış sitokinler sorumludur. ROS, hücre içi sinyallerle sitokinlerden kaynaklı durumlara etki eder ve yüksek oksijen konsantrasyonlarında spermatozoanın motilitesinin yüksek derece de azaldığı gözlemlenmiştir²². Olgun erkek bireylerin her epididiminde yaklaşık olarak 150 - 200 milyon aralığın da sperm hücresi bulunur ve hemen hemen yarısı önceden bahsedildiği üzere epididimin kuyruk bölümünde lokalize olmuştur. Epididimin kuyruk bölgesinde yer alan spermatazoalar testiküler sperme göre hareketli olup, yumurtayı dölleme oranları da daha yüksektir²².



Şekil 4: Akrozom Reaksiyonu²².

2.5. Semen Genel Özellikleri

Semen sıvısı spermatozoa ve spermatozoaların dışındaki kısım olan seminal plazmadan oluşmaktadır. Semen yaklaşık olarak total volümün % 1 inden azını spermatozoalar meydana getirir. Ejakülat ise hemen hemen 3 - 3,5 ml. dir. Total

volümün 1,5- 2 ml. 'si seminal vezikülden, 0,5 ml.' si prostat bezinden 0,1 - 0,2 ml. 'si ise Cowper bezi ve Littre bezinden gelen sıvılardan oluşmaktadır. Ejekülatın ilk bölümü spermden zengin olup daha sonraki kısımları ise daha çok seminal vezikülden salgılanan sıvılardan meydana gelir. Seminal sıvının yapısı ise visköz, hafif alkali olup, flavine içerdiği için açık sarı renk olarak gözlemlenir ²². Ayrıca bunlara ek olarak, seminal plazmanın pH 'ı ortalama 7,2 - 7,8 olup en önemli görevleri spermatozoanın transportunu sağlamak ve vajenin pH ında tampon oluşturmaktır ²⁴.

Ejakülatın ilk kısmı, sperm ve prostat bezinden gelen sekresyon sonucunda sitrik asit yönünden oldukça zengindir. Fruktoz ise seminal veziküllerinden sekresyon edilen majör üründür ve seminal plazma sıvısı yüksek konsantrasyonlarda çinko, sitrik asit, potasyum, fruktoz, fosforilkolin, prostaglandinler ve serbest amino asitler içermektedir. Ayrıca bunlara ek olarak yüksek oranlarda laktat dehidrogenaz, asit fosfataz, beta glukronidaz, prostat spesifik antijen (PSA), IgG, IgA, IgE, IgM, FSH, LH, glikoprotein, inhibin, antitripsin, insülin, kininojen, relaksin, prolaktin, steroid bağlayıcı proteinlerle birlikte kan grubu antijenlerini de içermektedir ²⁶.

Semen sıvısında görülebilecek diğer hücresel elemanlar ise lökosit eritrosit, epitel, sertoli ve prostatik hücrelerdir ²⁷. Seminal sıvının içindeki elemanlar spermatozoaların fertilizasyon yeteneği ve aktivitesini önemli ölçüde etkileyebilirler bu sebepten dolayı infertil bir durumla karşılaşıldığı zaman, semen analizinin yanı sıra tüm bezlerden sekresyon edilen sıvılar da değerlendirilmeye alınmalıdır ^{28,29,30}.

2.6. İnfertil Erkek Bireylerin Değerlendirilmesi

İnfertilite sebebiyle IVF departmanına başvuran her bir erkeğin öyküsü, özgeçmişi ve bunların yanısıra soygeçmişleri hakkında iyi bilgi edinilip, fizik muayenesi yapılmalıdır ³¹. İnfertil erkek bireylerin değerlendirilmesindeki temel amaçlar sırasıyla ilk olarak düzeltilebilecek durumları belirlemek, daha sonra erkek hastadan alınan semen örneğinin üremeye yardımcı teknikler (ÜYT) yardımı ile tedavi edilebilecek olan veya düzeltilemeyen durumları belirlemek , ardından tedavi sürecinde teknikler yetersiz ise sadece donör inseminasyonu ile düzeltilebilecek olguları belirlemek, devamında ise kısırlıkla birlikte olabilecek olan önemli

hastalıkları saptamak ve son olarak ise hastayı, doğacak bebeği etkileyebilecek kromozom kaynaklı ve genetik anomali oluşturacak durumları belirlemektir.

2.7. Öykü ve Fizik Muayene

Öncelik olarak hastanın infertilite öyküsü dinlendikten sonra seksüel ve tıbbi öyküsü, çocukluk çağında geçirmiş olabilecek herhangi bir hastalık durumu, cerrahi ve aile öyküsü detaylıca dinlenmelidir. Ayrıca bunlara ek olarak, fiziki muayenede hastanın genel vücut görünümüne, sekonder seks karakterlerine, skrotumuna, testis volümlerine, epididimler ve vaz deferenslarına bakılmadılır.

2.8. Laboratuvar ve Görüntüleme

İnfertil erkek bireyler de öykü ve fizik muayeneden sonra değerlendirilecek olan ilk laboratuvar testi semen sıvı analizidir. WHO 1999 ve 2010 yılı semen sıvısı parametrelerinin referans değerleri tablo 1’ de belirtilmiştir. İlk semen testi sonucu normal yeni bir semen analizine gerek olmayabilir ama ikinci kez semen analizinin yapılmasında hiçbir problem yoktur ama eğer test sonucunda anormal durumlar söz konusu ise bir ay sonra ikinci hatta üçüncü kez semen analizi yapılabilir³⁷. Bunlara ek olarak, daha önceden öneminden bahsedilen HHG aksın değerlendirilmesi yapılmalıdır ve kanda bulunan FSH ve Total Testosteron (TT) seviyeleri, ayrıca gerek duyulur ise LH, Estradiol (E2) ve Prolaktin (PRL) düzeyleri de ölçülüp değerlendirilmelidir. Tüm bahsedilen değerlendirilmelerden sonra eğer gerek duyulur ise skrotal ultrasonografi (USG) veya transrektal ultrasonografi (TRUSG) gibi görüntüleme sistemlerine başvurulabilir.

Tablo 1. WHO 2010 yılı semen parametreleri referans değerleri ³⁷.

Parametreler	Normal Değerler
Volüm (ml)	1,5
pH	≥ 7.2
Spermatoza sayısı/ml (106/ml)	15 (12-16)
Total spermatoza sayısı (106/ejakulat)	39 (33-46)
Total progresif hareketlilik (%)*	32(31-34)
Canlı spermatozoa (%)	58 (55-63)
Şekil (normal %)	4 (3,0-4,0)
Peroksidaz (+) lökosit (106 /ml)	<1.0

* Ejakulasyondan sonra 60 dakika içinde, ileri hızlı, hareketli ve ileri yavaş hareketli sperm sayısı %40'dan veya ileri hızlı hareketli spermilerin sayısı %32'den fazla olmalıdır

2.9. Erkek İnfertilite Nedenleri

2.9.1. Pre-Testiküler Nedenler

2.9.1.1 Hipotalamus Hastalıkları

Hipotalamus bezi kaynaklı hastalıkların başında hipogonadizm ile birlikte ortaya çıkan Kallman Sendromu infertilite nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. Olguların ortalama %11 lik kısmı X kromozomlu gen mutasyonu gösterir iken diğer durumlarda otozomal kalıtım şeklinde görölmektedir ³⁴. Erken embriyonik dönemde X kromozomu üzerinde bulunan genindeki delesyondan kaynaklı Kallman sendromu, hipogonadotropik hipogonadizm ile tanımlanmaktadır ³⁵. İzole LH eksikliği ise bir diğer hipotalamus bezinden kaynaklı hastalıklardan biridir. Bu durumda, intratestiküler testosteron üretimi ve spermatogenezin uyarılması için yeterli LH ortamda bulunurken virilizasyonu aktif etmek için yetersiz LH' ın üretildiği gonadotropin eksikliği ortaya çıkmaktadır. Bu erkek bireylerde testisler normal büyüklükte olup ejakulatlarında sperm sayısı az gözlemlenmiştir. Ayrıca, plazma FSH seviyeleri normal görünse bile serum-LH ve testosteron değerleri düşü seyrederek. İzole FSH eksikliğinde ise bu sefer FSH üretimi yetersizdir ancak testis büyüklükleri,

testesteron ve LH seviyeleri normal düzeydedir. Ayrıca, sperm sayısı olgulara göre değişik göstermektedir ³⁵. Doğum kaynaklı hipogonadotropik sendromlar ise Prader - Willi sendromu gibi genetik obezite, küçük eller ve ayaklar, gelişmede ki gerilik gibi hipogonadizmle ilişkili olup hipotalamik Gn-RH eksikliğinden meydana gelmektedir ³⁵.

2.9.1.2. Hipofiz Hastalıkları

Dokularda meydana gelen tümör oluşumları, enfarktlar, radyasyona mağruz kalma, infiltratif ve granüloamatöz gibi durumlar bilindiği üzere hipofiz yetersizliğine neden olabilir. Hiperprolaktinemi ise dolaşımda bulunan PRL seviyesinin artmasına bağlıdır ve bunun en önemli nedeni PRL salgılanmasını sağlayan hipofiz adenomudur. Bu durum sonucunda ise PRL düzeyinin yükselmesi FSH, LH ve testosteron hormonlarını azaltarak infertiliteye sebep olur ³⁵. Ayrıca bahsedilenlere ek olarak, dolaşımdaki östrojen veya androjen seviyelerinin fazlalığı testosteron-östrojen oranında dengesizliğe sebep olduğu için erkek infertilitesine sebep olabilir. Östrojen ve androjen fazlalığı hipofizden gonadotropin salgılanmasının azalmasına sebep olup böylece sekonder testis yetersizliği sebebiyle infertiliteye neden olur ³⁵.

2.9.2. Testiküler Nedenler

2.9.2.1. Kromozom Kaynaklı

2.9.2.1.1. 46 XX Male Sendromu

XX kromozomuna sahip erkek bireyler dişi karyotipi gösterirken fenotip görünüşleri erkektir ve dişi genital bulundurmazlar ³⁸. Rekombinasyonun gerçekleştiği esnada SRY genleri, X kromozomuna bağlandığı için gonadlar testise dönüşüm gösterir ama diğer taraftan azospermi faktör (AZF) genleri ise Y kromozomu üzerinde bağlantı yapacağı için XX kromozomlu erkekler azospermik ve infertil bireylerdir ³⁹.

2.9.2.1.2. Klinefelter Sendromu

Klinefelter Sendromu erkek hipogonadizmine ve erkek infertilitesine sebep olarak en sık görülen nedenlerin başında gelmektedir ³⁶. Olguların

çoğunluğunda kromozomal aberasyon (47, XXY) sebep olur iken, yaklaşık %20 sin de 46, XY / 47, XXY mozaizmi ya da 48, XXYY gibi birden fazla Y kromozomu gözlemlenmektedir ³⁷.

2.9.2.1.3. 47, XYY Sendromu

Erkek bireylerde mayoz-II bölünme safhasında gerçekleşen Y kromozomunun ayrılmama durumudur ve bu durumlarda genellikle infertilite gözlemlenmez ³⁷. Dolaşımdaki hormonal değerler göz önüne alındığında ise FSH yüksek, LH ve testosteron seviyeleri normal seyretmektedir, ayrıca bahsedilenlere ek olarak semen analizlerinde ise genelde azospermik veya oligospermik olguları ortaya çıkabilir ³⁵.

2.9.2.2. Gonadotoksin Kaynaklı

İnfertilite nedenlerinin başında testisler üzerinde negatif etkiye sahip radyasyon mağruz kalma ve kullanılan çeşitli ilaç içerikleri gelmektedir ³⁵.

2.9.2.3. Sistemik Hastalık Kaynaklı

Bazı sistemik hastalıklar karaciğer sirozu, böbrek yetmezliği veya orak hücre anemisi olarak bilinen gibi farklı mekanizmalar testisler üzerine negatif etki ederek infertiliteye sebebiyet verebilirler ³⁵.

2.9.2.4. Defektif Androjen Aktivitesi Kaynaklı

2.9.2.4.1. 5α- Reduktaz Eksikliği

5α- Reduktaz eksikliğinde testislerin ve Wolf kanalları türevlerinin, iç genital organlar gibi normal gelişim göstermesiyle beraber bazı belirsiz dış genital organların oluşumu gözlemlenir. Normal gelişim evresinde skrotuma inen testislerde spermatogenez gerçekleşmesi tamamlanmış olmasına rağmen bu olgularda infertilite dış genital fonksiyonlarının bozukluğundan kaynaklanmış olabilmektedir ³⁵.

2.9.2.4.2. Androjen – Receptör Eksikliği

Androjen reseptörü geninde oluşabilecek herhangi bir mutasyon 46, XX kromozomlu infertil kadın ve 46, XY kromozomlu azospermik erkek fenotiplerini meydana getirebilmektedir ³⁶.

2.9.2.5. Testis Hasarlanmaları

Bu hasarlanmalar içerisinde orşit, travma veya torsiyon gibi durumlar infertiliteye sebep olabilir ³⁵.

2.9.2.6. Kriptorşidizm (İnmemiş Testis)

Kriptoşidizm olarak adlandırılan skrotuma inmemiş testis durumları genel gelişim kusuru olarak görülmekte olup ve testisin kanser olma riskini attırmaktadır. Ayrıca, yenidoğan bebekte inmemiş testis morfolojik olarak normal edilir iken 2 yaşına gelindiğinde erken dönem germ hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklar gözlemlenmektedir ³⁵.

2.9.2.7. Varikozel

Testis toplar damarlarında neredeyse ergenlik döneminden itibaren meydana gelen genişlemeler ve bunun sonucunda oluşan varisleşmelerdir. Varikozel birçok sebeple testisi etkileyerek kısırlığa neden olabilirken aynı zaman da testesteron hormonu azalmasına, kasık ve bacak ağrılarına ve ergenlik çağında testisin boyutlarının küçük kalmasına sebep olabilmektedir ³⁵.

2.9.2.8. İdiyopatik Nedenler

Kısır erkeklerin hemen hemen %25 - %50 inde tanımlanabilecek herhangi bir neden bulunmamaktadır ³⁵.

2.9.3. Post Testikular Nedenler

2.9.3.1. Reprodüktif Yol Obstrüksiyonu

2.9.3.1.1. Doğumsal Kaynaklı Blokaj Oluşumları

Doğumsal blokaj oluşumlarının ilk sırasında Kistik Fibrozis olarak adlandırılan otozomal resesif ile taşınan olgu vardır. Burada, CFTR (7q31,20) geninde oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Hastaların hemen hemen % 90 'ı konjenital bilateral vaz deferens agenezin kaynaklı OA' dır. CFTR geni iyon kanalı olarak görev yapar ve aynı zamanda seminal vezikül, ejakülatuar kanal, vaz deferens ve epididim distal kısmının büyük bölümünün membran proteinini kodlar ³⁶. Vaz deferensin tek taraflı agenezisi genellikle aynı tarafta bulunan böbrek yokluğu

ilebirlikte gözlemlenir ^{35,36}. Young Sendromu ise hemen hemen Kistik Fibrozis ve konjenital vaz deferans yokluğundan benzer olsalar da klinik ve etyolojik bulgular açısından farklılıklar göstermektedirler. Young Sendromu aslında kronik sinüzit, azospermi ve bronşiyekrazi ile birlikte gözlemlenmektedir ³⁵. Erişkin polikistik böbrek hastalığında yine doğumsal kaynaklı blokaj oluşumları içerisinde yer almakta olup ve burada ise seminal vezikül veya epididimdeki kistten kaynaklı tıkanıklık kısırlığa sebep olmaktadır. Son olarak, ejakülatuvar kanal blokajın da obstrüksiyon doğal gözlemlenebildiği gibi doğumsal atrezisi, seminal vezikülde bulunan taşlar, Müller kanal kistler, ya da cerrahi bir işlem sonrası da oluşabilecek skar dokusunada bağlı olabilmektedir ³⁵.

2.9.3.1.2. Edinsel Blokajlar

Edinsel blokajlar içerisinde vazektomi operasyonu, bakteriyel enfeksiyonlar ve kasık ya da fitik cerrahi işlemleri yer almaktadır ³⁵.

2.9.3.1.3. Fonksiyonel Blokajlar

Fonksiyonel blokajlar ise vaz deferans veya seminal veziküller gibi yapılarda gerçekleşen kasılma kabiliyetlerinin bozulma durumlarıdır ³⁵.

2.9.3.2. Sperm Fonksiyonu ve Hareketliliği ile İlgili Hastalıklar

Spermde hücrelerinde oluşan defektlerin sebebi aksonemlerinde görülen siliyalı hücrelerin anormallikleridir, kartagener sendromu bu olguya güzel bir örnektir. Testisler de yüksek oranda antijenik sperm bulunmaktadır, testis ttorsiyonu, vazektomi veya testis biyopsi sonucu oluşan patolojik immun mekanizmalarının tetiklenmesiyle sperm antikorlarının oluşumu ve dolayısıyla otoimmun infertilite sebep olmakta ve bu olgu da immünolojik infertilite olarak adlandırılmaktadır ³⁵.

2.10. Fertilizasyonun Moleküler Temeli

Fertilizasyon sperm hücresi ile yumurta hücresi arasında gerçekleşen birden fazla kompleks etkileşimin gerçekleşmesi sürecidir. Spermatogenezin başlamasında yaklaşık 72 gün sonra oluşan sperm hücreleri epididimin kuyruk bölgesinde lokalize olur. Sperm hücresi motil olma ve fertilizasyon yeteneğini epididimdeki transport sırasında adım adım ilerleme yaparken kazanır. Ejakulasyon

sürecinin hemen ardından semen ilk olarak koagüle olur, daha sonra ise yaklaşık olarak 30 dakika içerisinde prostat enzimlerinin yardımı sayesinde likefiye olur. Vajenin içerisi asidik olduğu için semenin alkali olma özelliği sperm hücrelerini bu bölgede kısa süreli korumaktadır dolayısı ile sperm hücreleri vajen içerisinde yaklaşık 2 saatten fazla kalır ise burada fertil olma fonksiyonlarını kaybedirler. Ejakülasyon sürecinden yaklaşık olarak 90 saniye sonrasında da sperm hücreleri servikal mukusa ulaşmış olur ve sadece %1 'i kadarı üst genital olarak tanımlanan bölgeye ulaşabilirler ³⁶. Erkek sperminin fertilizasyon yeteneği kazanabilmesi için bazı hücrel değişikliklere ihtiyaç duyulur ve bu süreçler sperm kapasitasyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu süreç sonucunda ise sperm hücresi hiperaktif motilitesini, akrozom reaksiyonunu gerçekleştirebilme ve zona pellusidaya bağlanabilme kabiliyetini kazanmış olur ³⁶.

2.10.1. Sperm Hücresinin Kadın Genital Sistemindeki Transportu

Sperm hücresi kadın genital sisteminde geçen transport süreç boyunca fertilizasyon işlemini gerçekleştirmek adına birtakım fonksiyonlar kazanmaktadır. Epididim ve seminal sıvı içerisinde bulunan kolesterol ve türevi maddeler yolculuk sırasında sperm hücresinin yüzeyinden ayrılmaktadır. Yardımcı üreme tedavilerinde kullanılan spermlerin swim-up gibi yöntemlerle yıkanmasındaki gaye sperm kapasitasyonunu sağlamak ve yüzeylerinde bulunan kapasitasyon önleyici maddelerden spermleri arındırmaktır. Sperm kapasitasyon süreci esnasında gerçekleşen en önemli olayların başında ise protein fosforilasyonu ve kalsiyumun iyonunun sperm içine girmesi gelmektedir ³⁶.

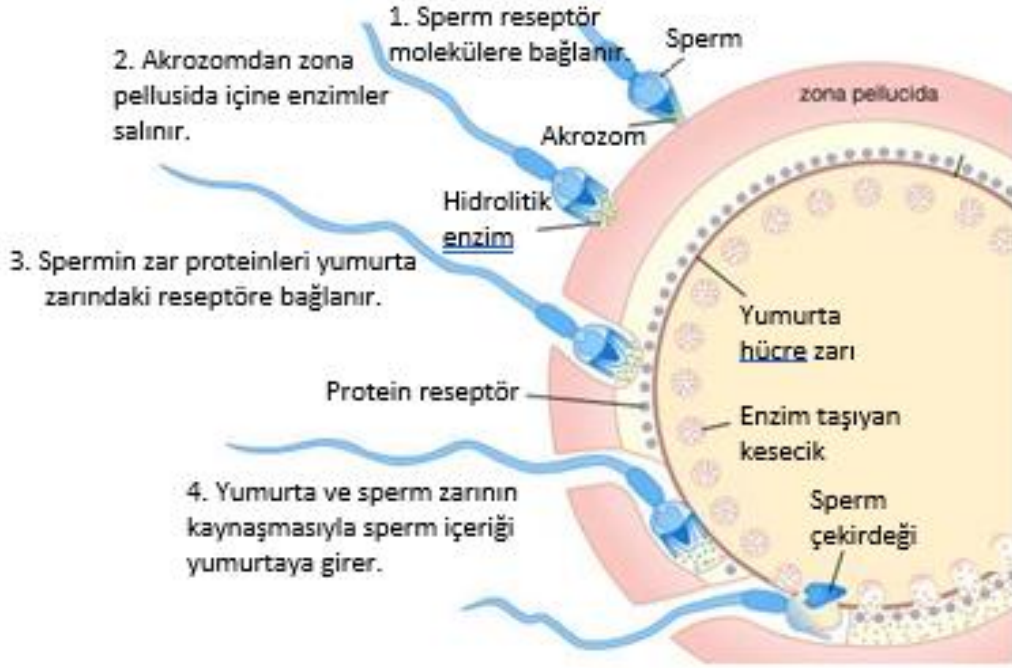
Spermin uterotubal bölüme yönelme eğilimi ve daha sonra yumurta ile karşılaşp onun ekstrasellüler matriksine girmesigibi süreçlerde birçok önemli moleküler etkileşim gerçekleşmektedir. Bu moleküler etkileşimlerin başında spermin dış katmanında bulunan β -Defensin-126 (DEFB126) adı verilen protein gelmektedir ve bu protein gibi türevleri de erkek aksesuar bezlerinden salgılanmaktadır. Bahsedilen bu protein kanal epitelleri üzerinde sağladığı elektriksel çevre spermin kolayca ilerlemesi ve servikal mukustan geçmesini sağlamaktadır ³⁶.

Sperm hücresinin kadın genital sistemi içerisindeki transportu sırasında tubanın istmus kısmında bulunan mukoza yapısı spermin ampulla bölümüne geçişinin

yavaşlamasına sebep olur ve böylece fallop tüpünde spermin bulunması gereken süre uzatmış olup polispermik fertilizasyon oluşumu engellenir. Ayrıca yukarıda bahsedilenlere ek olarak, sadece kapasitasyon sürecini tamamlayan spermier ampullaya doğru ilerleme kaydedebilirler ³⁶.

Ejakulatta bulunan yaklaşık olarak 200 - 300 milyon sperm hücresinin ortalama 1000 sperm hücresinden daha azı oositin yanına ulaşmayı başarır. Uterotubal kısmını geçmek için sperm yüzey membran proteinleri, bunlar, fertilin β , calmegin, testis-spesifik ACE ve Adam proteinlerinden Adam-2, veya Adam-3 gerekmektedir. Bu proteinlerin bulunmaması durumunda ise sperm hücresinde normal motilite kabiliyeti ve sağlam morfoloji gözlemlense bile tubal geçişin oluşumu görülmeyebilmektedir. Uterotubal bölümden geçen sperm hücrelerinin sıradaki adımı spermier istmus üzerinde bulunan mukozal yapı üzerinde fertilizasyon olayı gerçekleşene kadar beklemektir. Bu süreçte erkek seminal vezikülünden salgılanan Annexin ailesi proteinlerden bazıları sperm bağlama ve depolamada görev alırlar.

Kadında ovulasyon dönemi yaklaştıkça sperm hücreleri de istmusdan ayrılır ve ampullaya doğru hareketlenmeye başlar ancak bunu sadece kapasitasyon sürecini tamamlayan sperm hücreleri yapabilirler. CatSper proteini sperm hücresinde bulunan katyon kanal proteinleri ailesinde yer almaktadır. Araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada CatSper1 $-/-$ fare spermierinin istmus epitelinden ayrılamadığı ve bunun sonucunda ise ampullaya doğru hareket edemediklerini ortaya çıkarmışlardır ³⁶. Ayrıca bunlara ek olarak, CatSper-1 kanal proteini sayesinde kalsiyum iyonunun hücre içine alındığını ve dolayısı ile sperm hücresinin hiperaktif hareketlilik yeteneğini sağladığı gösterilmiştir. Dolayısı ile, CatSper-1 genini kodlayan proteinde meydana gelebilecek mutasyonun infertiliteye sebep olduğu ortaya çıkmıştır. Sperm hücresinin ampullaya hareket etmesindeki tek amaç kumulus yumurta kompleksini bulmak ve fertilizasyon işlemini gerçekleştirmektir. Kumulus yumurta kompleks yapısı ise Zona Pellusida (ZP) ile çevrili ovulasyonu bitmiş yumurtadan oluşmaktadır. Sperm hücresinin kumulus yapısına ulaşmasında görevli foliküler sıvı ve yumurta hücresini çevreleyen kumulus yapısının içerisinde birçok yardımcı protein bulunmakta olup progesteron bahsedilen bu yardımcı proteinlere bir örnektir ³⁶.



Şekil 5. Sperm hüresinin yumurta hücresine giriş aşamaları ³⁶.

2.10.2. Akrozom Reaksiyonu

Sperm hücresinin baş kısmında akrozom adı verilen bir yapı bulunur ve burada gerçekleşen moleküler etkileşime akrozom reaksiyonu adı verilir. Akrozom reaksiyonunu sadece kapasitasyon sürecini tamamlamış sperm hücreleri gerçekleştirebilir ve akrozom reaksiyonu yumurta ile sperm hücresinin birleşmesi için gereken ilk koşuldur ³⁶.

İn-vitro ortamda akrozom reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için yapılan araştırmalar zona pellicuda (ZP) yapısının zedelenmesi ya da bozulması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, yaklaşık %20 ile %40 oranında kapasitasyonunu tamamlayan sperm hücrelerinin İVF ortamında akrozom reaksiyonunu gerçekleştirdikleri, herhangi ek tedaviye ihtiyaç olmadığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda ise, in vitro ortamda toplanan yumurtalarla Kumulus Ooforus denen yapı ve ZP olmadan spermlerin fertilizasyonu gerçekleştirdiği görülmüştür dolayısı ile akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi için sperm ve ZP bağlantısının gerekmediği ortaya çıkmıştır.

Akrozom reaksiyonunda kalsiyum iyonunun hücre içine alınması sonrasında fosfolipaz ve aktive PIP2 den diacilgiserol (DAG) meydana gelir böylece hücre içinden kalsiyum iyonunun salınması ve gerekli proteinlerin fosforilasyonu gerçekleşir ³⁶.

2.10.3. Zona Pellucida (ZP)'nın Biyokimyasal Modifikasyonu ve Penetrasyonu

Zona Pellucida (ZP) nın yapısı glikolize edilmiş Zp-1, Zp-2 ve Zp-3 olarak adlandırılan üç ana proteinden oluşmaktadır. Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda Zp-3 proteininin sperm reseptörü olduğu ve akrozom reaksiyonunu başlatmada görev aldığı gösterilmiştir. Ayrıca, Zp-2 proteininin akrozom reaksiyonunu tamamlamış sperm hücreleri için ise ZP' den geçerken etkileşimde olunan bir receptör olduğu kabul edilmiştir. Fertilize olan yumurta hücresinde Zp-2 proteinin Zp-2f olarak adlandırılan bir yapıya dönüşür ve bu dönüşüm donrasında sperm hücrelerinin aynı yumurtayı giriş yapması engellenir. Diğer taraftan Zp-1 proteini Zp-2 / Zp-3 bağlanmasını sağlayarak ZP yapısında ipliksi ağ oluşumu sağlar. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar gösterdi ki Zp-1 proteini ve Zp-2 proteinin olmadığı durumlarda bile ZP yapısı oluşmakta ve yumurtanın fertilizasyonu gerçekleşmektedir ama Zp-3 protein yapısında bozukluk olduğunda ise ZP oluşumu gözlemlenmezken yine ZP'si olmayan yumurta hücreleri normal sperm hücreleri ile fertilizasyonlarını gerçekleştirebilmektedir ³⁶.

Sperm hücre yüzeyinde bulunan proteazları proteinlerin yapısal bütünlüğünü bozarak sperm hücresinin yumurta içine girmesini sağlar. Acr olarak adlandırılan akrozomal enzim akrozom reaksiyonu sonrasında ortaya çıkar. Yapılan araştırmalar her ne kadar Acr enziminin fertilizasyon için önemli olduğunu ileri sürseler de Acr enzimi içermeyen sperm hücreleri fertilizasyon gerçekleştirebilmektedir bunun sebebinin ise Acr- knock- out farelerde spermlerin fertilizasyon yeteneklerini alternatif olarak kullanılan proteazların sayesinde olduğu ortaya çıkmıştır ve beş adet testis spesifik Serin-proteaz enzimi bulunmuş olup ve Tsp1, Tsp2, Tsp3, Tsp4, ve Tsp5 olarak adlandırılmıştır ³⁶.

2.10.4. Sperm -Yumurta Birleşimi

Zona Pellucida yapısından geçen akrozom reaksiyonunu tamamlamış sperm hücreleri yumurtanın plazma membranına yapışırlar ve sadece akrozom reaksiyonunu tamamlamış sperm hücrelerinde bulunan fusogenler olarak bilinen genler aktive olabilmektedir. Ayrıca, Izumo-1, Cd46 ve Mn9 gibi sperm antijenleri sadece akrozom reaksiyonu gerçekleşmiş ve bitmiş ise antikorlarla reaksiyona girebilirler. Sperm-yumurta füzyonunu OBF13 olarak adlandırılan monoklonal antijen engellemektedir ve bunun yanı sıra aynı aileden olan antijenlerin füzyon için önemli görevleri vardır. Yapılan çalışmalarda, Izumo-1 antijeninden yoksun farelerin mutant spermleri ZP yi geçmeyi başarsalar bile infertildirler. Ayrıca, Izumo-1'den yoksun erkek farelerin spermleri kullanılarak yapılan ICSI de ki birleşme aşaması bypass işlemi yapılarak yürütüldüğü için yumurta fertilize olmuş ve uterusu yerleştirilen embriyonun gelişim devam edebilmiştir bu sebepten dolayı Izumo-1 proteini yumurta ile sperm birleşmesi esnasında önemli görevleri vardır. Akrozom reaksiyonu tamamlandıktan sonra Izumo-1 proteini yumurta-sperm füzyonu gerçekleştiren spermin başının ön kısmında lokalize olmaktadır. Yukarıda bahsedilenlere ek olarak, yapılan başka bir çalışmada ise Testis- spesifik Serine kinaz-6 (Tssk-6) eksikliği olan farelerde ZP yapısına bağlanma mekanizmasında bozulma gözlemlenmiştir. Yumurta üzerinde bulunan α -6 β 1 integrin ise sperm hücresi için önemli bir füzyon proteini olup, integrin ailesi içerisinde yer alan tetraspan Cd-9 yumurta yüzey proteini de fertilizasyon esnasında önemlidir. Izumo-1 proteini sperm hücresinin yumurta hücresine bağlanmasında etkili iken, Cd-9 proteini de yumurta hücresinin sperm hücresine bağlanmasında önemlidir ³⁶.

2.11. Yardımcı Üreme Tekniklerinde Kriyoprezervasyon

2.11.1. Kriyoprezervasyon (Dondurarak Saklama)

Kriyoprezervasyon dokuların ve hücrelerin sıfır derecenin altındaki ısıya mağruz bırakılıp soğutulularak bütün biyolojik aktivitelerinin sona erdirilmesi ve

ileride kullanılmak için saklanmasını ifade eden işlemdir. Buradaki asıl amaç çok düşük ısı ortamında bile canlı doku ya da hücrenin alabileceği minimum hasar ile fonksiyon kaybı yaşamadan uzun süreli saklanması durumudur ³⁷. Ayrıca, üreme hücreleri ya da dokularının dondurulup saklanabilmesi ve gelecekte istenildiğinde çözülüp sağlıklı biçimde kullanılabilmesi Yardımla Üreme Teknolojilerinin (YÜT) gelişimi açısından önemlidir ³⁸.

Spermin dondurularak saklanması, azospermik erkek hastalardan 1990' lı yıllarda cerrahi yöntem uygulanarak alınan testiküler spermin kullanılmaya başlanmasıyla zorunlu olmuştur. Kriyoprezervasyon işlemi üremeye yardımcı tedavilerde başarıyı arttırmış olup, aynı zamanda testis cerrahisi, radyoterapi ve kemoterapi tedavilerinden önce uygulandığında gelecekteki fertilitenin korunmasına fayda sağlamıştır ³⁹. Embriyo ve gamet kriyoprezervasyon prosedüründeki ilk basamak önce hücrelerin veya dokuların kriyoprotektan maddelerle dengelenmesi ardından soğutulması, sıvı nitrojen tank içinde (-196°C) 'de depolanması ve çözülürken ise kriyoprotektan maddelerden uzaklaştırılarak gamet ve embriyoların canlılıklarını koruyabilecekleri fizyolojik ortamlara aktarılmasıdır ⁴⁰.

2.11.2. Kriyobiyojoloji

Kriyobiyojolojide amaç hücrenin izotonik ortam içerisinde dondurulmasıdır ve bu sebepten dolayı ısının azalmasıyla birlikte su moleküllerinde azalma, ortamın osmolaritesinin artmasıyla birlikte oluşan hipertotonik ortam oluşumu, hücrenin su kaybetmesi ile sonuçlanan dehidrasyon olayıdır. Bahsedilen bu hücresel değişikliklerde asıl önemli olan dehidrasyon hızıdır, çünkü bu hız hücre canlılığının devamı için çok önemlidir. Dehidrasyon hızını belirleyen parametreler ise suya karşı oluşan plazma-membran geçirgenlik yeterliliği, kriyoprotektan maddenin türü ve aktivasyon enerjileridir ³⁷. Dondurma ve çözündürme sonrası hücrenin sağlıklı kalabilmesi durumu, içinde buz kristallerinin oluşumu oranıyla bağlantılıdır. Dolayısı ile, buz oluşumuna neden olan hücre içinde bulunan su miktarını en alt seviyeye indiren soğutma ve ısıtma derecelerinin uygulanmasının yanı sıra uygun koruyucu maddeler kullanılması da yukarıda bahsedilen kristallerin oluşumunu yüksek oranda azaltmaktadır ⁴¹. Araştırmacılar tarafından insan spermleri üzerinde yapılan çalışmalar belli soğutma ve ısıtma hızlarını sperm hücrelerinin tolere ettiğini göstermiştir.

Dondurma işlemi sırasında soğutma hızı eğer çok hızlı gerçekleştirilir ise hücre içindeki su dışarı çıkamaz ve intrasellüler buzlanma denilen yapılar oluşup hücre ölümleri gerçekleşebilir. Ayrıca, tam tersine bu işlem çok yavaş yapılır ise ortamın osmolaritesindeki artış ve hücrenin dehidrate hale gelme durumu hasarlanmaya veya hücre ölümüne sebep olabilir. Bahsedilen bu durumlardan dolayı, buz oluşumunun engellenmesi nedeniyle düşük soğutma hızları tercih edilmeli ancak bu yöntemin de uzun süre yüksek osmolarite ile karşılaşan hücrenin membran lipoproteinlerinde denatürasyon sebebiyle sitoliz olayının oluşmasıdır ⁴².

Sperm hücresinin saklanma koşulları optimal değerler içerisinde gerçekleştirildiği zaman saklanma süresinin sperm kalitesine olumsuz etkisi görülmemektedir ⁴¹. Kriyoprezervasyon işleminde beş önemli basamak vardır, bunlardan birincisi; su kristalizasyonu oluşumuna sebep olacak hücresel hasarlanmaları azaltan kriyoprotektan maddeler ile ilk etkileşim, ikinci olarak 0°C' nin altındaki sıcaklıklara kadar sperm hücresini dondurmak, üçüncü basamakta ise saklamak, dördüncü basamakta çözmek ve son olarak beşinci basamakta ise dilüsyon ve kriyoprotektan maddelerin ortamdan uzaklaştırılması, fizyolojik ortama geri dönmesi işlemleri vardır. Bütün bu yukarıda bahsedilen kriyoprezervasyon basamakları gerçekleştirilirken hücre hasarı minimal olup, hücrenin yapısal bütünlüğü ile birlikte fonksiyonel tüm özellikleri korunmalıdır. Saklama koşulları için ideal olan değer ise -196 °C' deki sıvı nitrojendir ve bu değere ulaşıldıktan sonra geçen sürenin canlılık üzerine herhangi bir negatif etkisi yoktur ^{38,40}.

2.11.3. Kriyoprezervasyon Kaynaklı Hücresel Hasarlanmalar

Dondurma işlemi sırasında hücrelerin maruz kaldığı iki tip stress mevcuttur, bunlardan birincisi temel stres olup düşük sıcaklığın etkileri iken, ikincisi buz oluşumundan kaynaklı hücrede meydana gelen fiziksel değişiklikler. Dondurma işlemi hasarı sebebiyle çözme sonrasında sperm motilitesinde yavaşlama, sperm-oosit füzyon kapasitesinde azalma veya plazma membran-lipid peroksidasyonuna bağlı olarak fertilizasyon olumsuz etkilenebilmektedir. Dondurma hasarının nedenleri ise sırasıyla, hücre içi buz kristallerinin oluşumu, yoğun dehidrate ortam oluşumu ve

hücre içi ortamda meydana gelen pH değişiklikleri ve son olarak protein denatürasyonudur. Ayrıca yukarıda bahsedilen dondurma hasarlarına ek olarak, ortam ısısı, konsantrasyon farkı, hücrenin geçirgenliği, hücre yüzey-hacim oranı, kriyoprotektan maddenin niteliği, hücre zarının yapısı da etkili faktörler arasındadır. Dolayısı ile dondurma işlemi esnasında en temel hücre hasarı dondurma ve özellikle çözme aşamasında gerçekleşmekte olup, yavaş dondurma ve hızlı çözme bu nedenle kriyoprezervasyon esnasında en önemli aşamalardır ⁴³.

2.11.4. Kriyoprezervasyon İşleminde Kullanılan Kriyoprotektan Maddeler

Kriyoprezervasyon işlemi sırasında hücreyi dondurulma hasarından koruduğu düşünülerek hazırlanan maddelerdir, ancak hücreler için toksik özellik taşırlar. Hücre içinde ve dışında kalarak etkinliğini gösteren kriyoprotektanlar vardır. Gliserol, DMSO (Dimetil sülfoksit) ve Pro-H (Propilen glikol) hücre içine girebilen koruyucu maddeler içerisinde olup intrasellüler buz kristalleri oluşumunu -40 °C' ye kadar düşürebilir ve hücreyi solüsyonun toksik etkilerinden koruyabilirler. Hücre dışında kalanlar ise membrandan geçemeyecek büyüklükte olup, monosakkaritler, disakkaritler ve trisakkaritlerdir. Bu kriyoprotektan türleri ise hücre zarını osmotik basınç değişikliğine karşı korur iken aynı zamanda ve hücrenin çözme işlemi sırasında fazla şişmesini de önlerler ⁴⁴.

Sperm dondurma solüsyonlarında intrasellüler ajan olarak % 5 - 15' lik gliserol tercih edilirken aslında en verimli sonuç etilen glikol ile alındığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca ekstrasellüler ajan olarak sükrozün tercih edilmesinin sebebinin ise büyük molekül olması ve hücre zarından geçememesidir. Dolayısı ile soğutma işlemi sırasında dehidratasyonu başlatır iken çözme işlemi sırasında da hücrenin lizisini önler, konsantrasyon farkı sayesinde intrasellüler kriyoprotektan maddenin hücre içinden uzaklaşmasını sağlar. Ayrıca, dondurulan sperm hücrelerinin çözüldüğü zaman canlılık oranlarını artırmak için glisin ya da yumurta akı gibi ek kriyoprotektan maddeler de katılarak dondurma solüsyonları hazırlanabilmektedir ¹⁸.

2.11.5. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Dondurma protoköü esnasında dondurma hızı her hücre tipine özğün olmalıdır. Optimum hız, dondurulan materyale göre değışir, örneğın parçalanmış sperm dokularının homojenizasyonu veya semen ve aspire edilen hücreler dondurulurken hızlı dondurma, doku dondurma ve single sperm dondurma sırasında yavaş dondurma tekniğı tercih edilmelidir. Hızlı dondurmanın yavaş dondurma prosedürlerinden en önemli farkı kullanılan kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonda olmasıdır. Sperm hücreleri ejakülasyondan hemen sonra işleme alınmaz, semen sıvısının likefaksiyon olması beklenir veya spermelerin yıkama işleminden sonra dondurulması gerçekleştirilir. Likefiye olan semen sıvısı kriyoprotektif ajanlarla birebir oranında kriyovial ya da straw içerisinde yavaş şekilde 30 dakika karıştırılırken nitrojen buharında tutularak ısının düşmesi sağlanır. Sürenin sonunda ise strawlar sıvı azot tankının içerisine aktarılır ^{40,41,46}.

2.11.6. Kriyoprezervasyon Endikasyonları

2.11.6.1. Fertilitenin Korunması

Fertilite fonksiyonunu bozabilen veya engelleyen işlemlerden önce semen sıvısının alınıp dondurularak saklanması halinde ileride olabilecek herhangi bir infertilite problemini ortadan kaldırma amaçlı olarak kullanılabilir. Kemoterapi, radyoterapi gibi üreme hücrelerinde gerçekleşen spermatogenezi kalıcı olarak bozabilen kanser tedavi işlemleri öncesinde ya da orşiektomi, varikoselektomi gibi testis cerrahi işlemlerin önce gerçekleştirilebilmektedir ^{38,41}.

2.11.6.2. İnfertilite Tedavisi

Testiküler veya epididimal yoldan sperm hücresi elde edilen ve genelde nonobstrüktif azospermik olgularda, ağır oligozoospermik durumlarda, hipotalamo-hipofizer hipogonadizm için hipogonadotropin tedavisinde, spinalkord travması geçiren hastalarda yada retrograt ejakülasyonla idrar veya genital yoldan alınan spermeler infertilite tedavisinde kullanılmaktadır ⁴¹.

2.11.6.3. Donasyon Spermeleri

Sağlıklı fertil erkek bireylerden alınan sperm hücreleri ileride kullanılmak üzere dondurulma işlemi uygulanarak saklanmaktadır. Erkek infertilitesinin tedavisinde, genellikle cerrahi yöntemlerle alınan testiküler sperm hücrelerinin korunmasında TESE, TESA ya da MESA gibi, kemoterapi, radyoterapi gibi uygulamalardan önce spermin kriyoprezervasyonu yardımcı üreme tekniklerinde başarıyı önemli ölçüde arttırabilmektedir ⁴⁶.

2.12. İyon Kanal Sınıflandırılması

Hücresinin plazma membranında yer alan iyon kanalları voltaj gradientine bağlı olarak çalışır ve bu kapıların açılıp kapanması ile birlikte hücre içerisine metabolizma ihtiyacına göre çeşitli iyonlar alınır ve çıkarılır. Voltaj kapılı iyon kanalları için bir α - alt birim ve bunun yanında yardımcı alt birimler olarak adlandırılan β , δ gibi benzeri yapılar yer almaktadır. Bahsedilen bu iyon kanallarından bazıları sadece pozitif (katyon) ve negatif (anyon) yüklü iyonların geçmesini sağlarken ,voltaj gradientine dayalı olarak çalışan iyon kanalları ise genellikle Na^+ (Sodyum), Ca^{++} (Kalsiyum) ve K^+ (Potasyum) gibi iyonların seçici iletkenliğine bağlı olarak çalışmaktadır. Ayrıca bahsedilen iyon kamallarına ek olarak, ligand kapılı kanallar ise bir ligandın kanala bağlanmasıyla birlikte açık kalır veya kapanır. Ligand kapılı kanallarının temel sınıflandırılması ise primer sinyal transmitterlerine göre düzenlenmektedir ⁴⁷.

2.12.1. CatSper İyon Kanal Ailesi

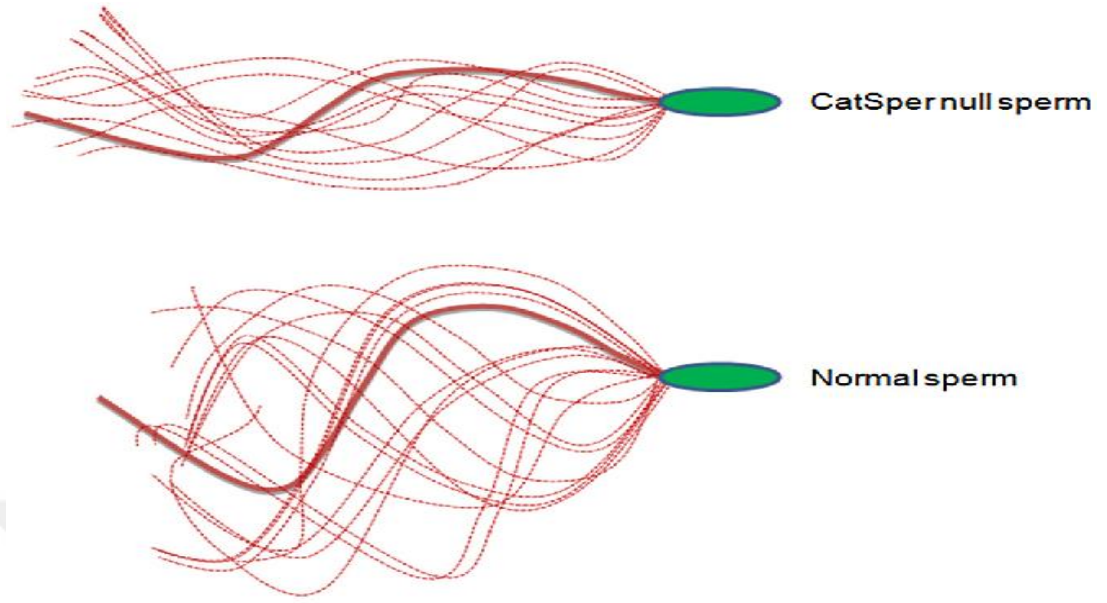
Katyon kanal sperm (Cation-Channel-Sperm;(CatSper)) olarak adlandırılan kanal sperm spesifik ve kalsiyum iyonuna selektif olarak özelleşmiş zayıf voltaj bağımlı olarak çalışan iyon kanalıdır. Sperm hücrelerinin içine pozitif yüklü kalsiyum iyonunun giriş ve çıkışından sorumlu olup pH duyarlıdır. CatSper iyon kanalının erkek infertilitesinde ve sperm hiperaktivasyonunda önemi büyüktür ⁴⁸. CatSper iyon kanalı heterotetramerik yapının gözenek oluşumunu sağlayan dört farklı α alt biriminden meydana gelen kalsiyum kanalıdır. CatSper kanalları kendi içerisinde CatSper1, CatSper2, CatSper3 ve CatSper4' e fonksiyon özelliklerine göre ayrılır ve ayrıca üç yardımcı alt birimden meydana gelirler, bunlar sırasıyla CatSper- β (beta), CatSper- γ (gama) and CatSper- δ (delta) olarak adlandırılmaktadır. Bahsedilen farklı

alt birimler CatSper iyon kanalını daha kompleks yapı haline getirirler. Spermatozoanın fonksiyonel koordianasyonu sağlaması için flagellada lokalize olup intrasellüler pH' a duyarlıdır. Ayrıca, prostaglandinler, progesteron ve diğer proteinler hücre sinyal moleküllerinin aktivasyonu için gereklidir. İlk gözenek yapısını oluşturan CatSper alt birimi, CatSper-1, 2001 yılında keşfedilmiş ve spermatozoa da erkek üreme sistemi için gerekli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. CatSper2 iyon kanalı ise sinyal Peptid-Trapping tekniği kullanılarak sperm hücre spesifik kopya gibi tespit edilmiştir. CatSper3 ve CatSper4 iyon kanalları ise daha sonra aydınlatılmıştır⁵¹.

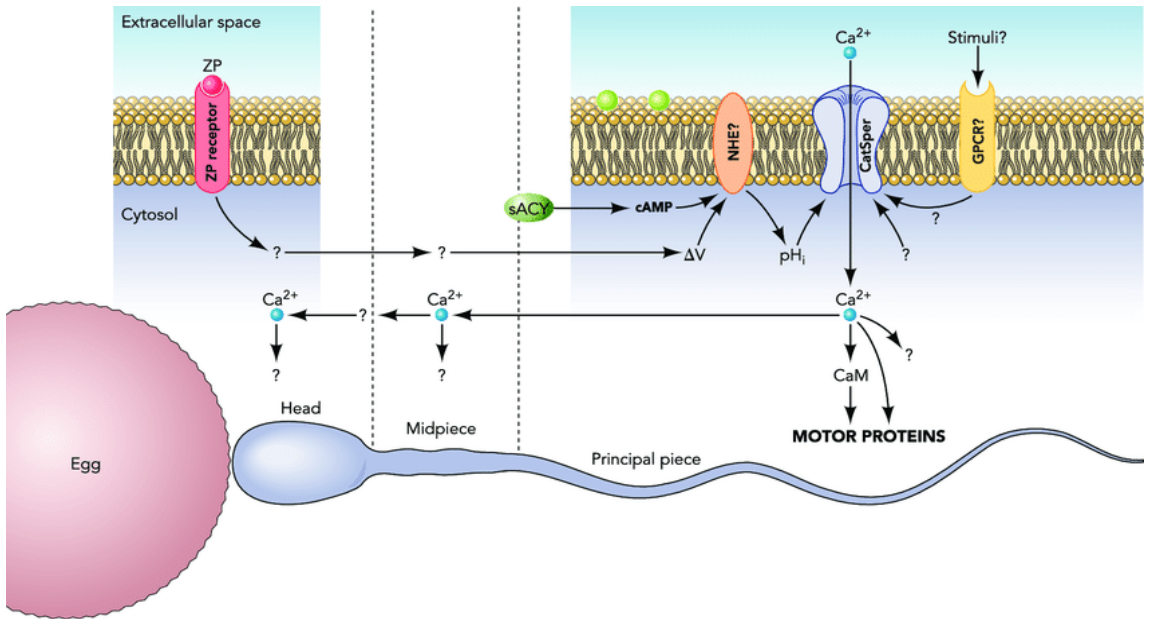
CatSper iyon kanalları diğer voltaj kapılı kalsiyum kanallarına benzer özellikler göstermektedir. Çift değerlikli katyonlar olmadığı zaman, sodyum (Na^+) ve sezyum (Cs^+) gibi tek değerli katyonları iletebilirler ama CatSper'in çift değerli katyonlara affinitesi her zaman daha yüksektir. CatSper iyon kanalları, normal fizyolojik koşullarda, intrasellüler-pH ve sperm membran potansiyali gibi değerlerde minimal seviyede aktif kalır iken, fizyolojik uyarıların ya da agonistlerin varlığında ise potansiyel olarak aktif hale gelmektedirler. Yapılan çalışmalarda bahsedilen voltaj kapılı iyon kanallarının bir kısmı spermatositler, spermatozoada ve testiste gözlemlenirken, bazı kanal proteinleri ise beyin dokusunda görülmüştür. Bu nedenle Ren ve Xia, 2010 yılında sperm fizyolojisinde önemi büyük olan iyon kanallarını belirlemek için birkaç ayırıcı özellik önermişlerdir. Öncelikle protein spermden saptanabilir olmalı ve antikor spesifitesi sağlaması açısından negatif kontrol olarak sperm örneği ile doğrulanmış olmalı, patch-clamp kayıt methodu ile tüm sperm akımı saptanabilir olmalı, sperm iyon kanal blokörlerinin uygulanması ile sperm hücrelerinin doğal fizyolojik aktivitenin bozulması ve ayrıca hedeflenen genin bozulması ile birlikte sperm fonksiyonunda oluşan bozulmanın erkek fertilitesi üzerinde negatif etkilerinin olması durumlarından dolayı CatSper iyon kanalının yukarıda bahsedilen kriterlerin çoğunu sağlamasından dolayı spermatozoada fizyolojik olarak önemi büyüktür⁵¹.

CatSper iyon kanalı, insanlarda sperm lhücresinin flagellum kısmında lokalize halde bulunur. Kalsiyum iyonun ortama girişi ile spermden intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunda yükselme gerçekleşir ve sperm hareketleri daha da

güçlenerek hızlanır. Ayrıca, araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, kalsiyum kanalının bu sınıfının hiperaktif sperm motilitesinde, dişi üreme epitelyumundaki sperm hücrelerinin ayrışmasında, sperm hücresinin yumurtaya penetrasyonu sırasında ve fertilizasyonda gerekli olduğu belirtilmiştir. Hiperaktif motilite, asimetrik yüksek amplitüd ve düşük frekansa sahip flagellar ile karakterize olup, fertilizasyon alanına ulaşmanın ardından yumurtayı çevreleyen zona pellucidaya doğru penetrasyonun gerçekleşmesi ile sonuçlanmaktadır (şekil 7). CatSper iyon kanalı, diğer iyon kanalları ile birlikte sperm motilitesinde gerekli olan hızlı değişiklikler için kalsiyum iyon girişini kolaylaştırmasına yardımcı olurken, fertilizasyon için ise sperm hücresinin yumurtaya yerleşmesi sırasında dışının reproduktif sisteminde oluşan engellerine doğru yolculuğuna devam etmektedir. Spermatozoa kadın üreme kanalındaki mikroçevreden birden fazla sinyal alır ve bu işaretler spermatozoanın hiperaktif motilite kazanması ile birlikte yumurtanın fertilize edilmesine yardımcı olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise, insan spermelerinde bulunan CatSper iyon kanallarında meydana gelen mutasyonların infertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir



Şekil 6. CatSper Proteinini bulundurmayan sperm (Null sperm) ve Normal Sperm ⁴⁸.

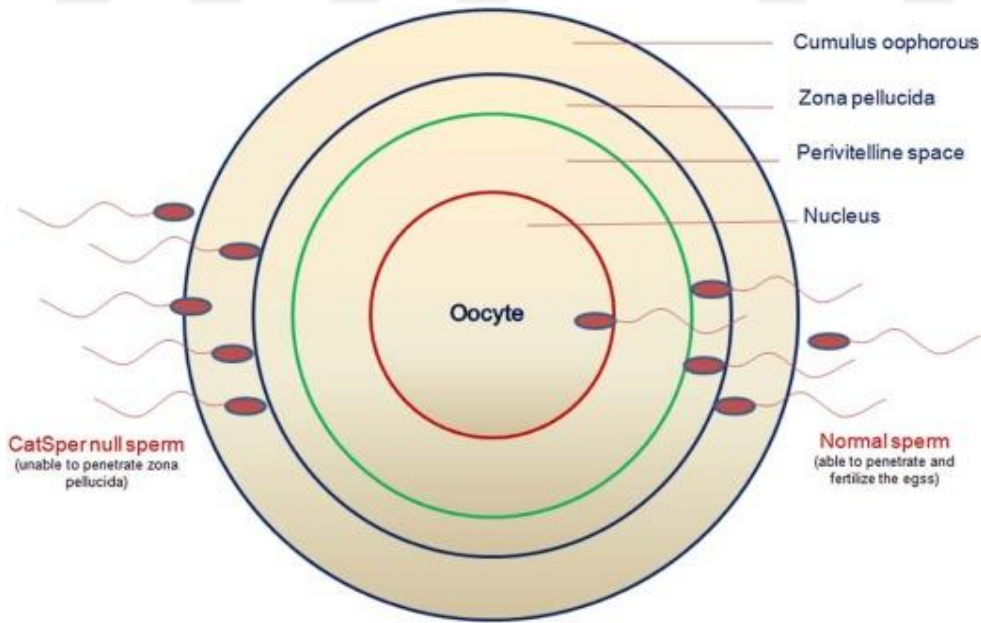


Şekil 7. Sperm flagellasında lokalize olan CatSper iyon kanalının fonksiyonu ve düzenlenmesi ⁵¹.

Dört ayrı gözenek oluşturuca CatSper alfa subünitlerinin her biri altı adet transmembran segmentine sahiptir (S1 - S6), ayrıca iki adet farklı fonksiyon özelliğine sahip modülü vardır, bunlardan ilki voltaj duyarlı alan oluşturmalarını sağlayan (S1-S4) modülü iken , diğeri ise gözenek oluşmasını sağlayan (S1- P- S6) modüllerdir. CatSper alfa subünitlerinin içerisinde bulunan CatSper4' ün dördüncü transmembran segmenti (S4) lizin-arjinin'li birden fazla pozitif (+) şarjlı aminoasit rezidüleri bulundurmaktadır. CatSper1 de aynı şekilde kuvvetli voltaj sensitif kanallarında olduğu gibi altı pozitif şarjlı lizin/arjinin' li aminoasit içerirler. CatSper2 ise dört rezidü içerir iken, CatSper3-4 ise yapılarında sadece iki rezidü bulundurmaktadır ⁵⁰.

Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda CatSper genlerinin herhangi bir sebeple mutasyona uğraması sonucunda sperm motilite parametrelerinde önemli ölçüde azalmalar gözlemlenmiştir. Canlı sperm hücresinin ayrıntılı motilite analizi sonucunda normal tip ve mutant sperm hücresi arasındaki önemli farklılıklar ortaya çıkarılabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, bilgisayar destekli sperm analiz programları aracılığıyla sperm hücresinin yol, ilerleyici ve rota hızı gibi spesifik motilite parametrelerinin mutant sperm hücresinde önemli ölçüde bozulduğunu gösterilmiştir. CatSper1 proteini bulundurmaya farelerin sperm yüzme hızlarında azalma bulunmuş olup, sperm hücrelerinin başlangıçtaki motilitelerinin normal olduğu ama en önemli problemin hiperaktif motilite eksikliği olduğu gösterilmiştir. Normal sperm hücresinin flagellar aktivitesinin CatSper1 bulunurmayan spermatozoa ile karşılaştırılmasında mutant spermatozoanın hiperaktif motiliteyi gerçekleştirmediği ayrıca, flagellarının düşük eğrilik ve simetrik ile kapasitasyon ortamında yetersiz olduğu gösterilmiştir (Şekil 7). Hiperaktivasyon fonksiyonunun gerçekleşmesi, oviducttaki sperm migrasyonu ve özellikle kadın üreme sisteminde bulunan alt istmustan uzaklaşmak için gereklidir. Hiperaktif motilitenin yokluğunda sperm fizyolojik olarak birçok fonksiyonel eksikliğe sahiptir, sperm hücresinin oviduktta ki yüksek visküz ortama doğru geçişinde kusurlar oluşurken ayrıca yumurtanın yüzeyinde bulunan kumulus oophorus ve zona pellucida gibi koruyucu yapılardan penetrasyonda başarısızlık gözlemlenmektedir ⁵².

CatSper mutant sperm hücresinin (CatSper^{-/-}) fertilizasyon yeteneğini analiz edebilmek için IVF denemesi yapılarak normal tip ve mutant sperm ile süperovül normal tip dişi matür yumurtaların inkübasyonu karşılaştırılmıştır, çalışmanın sonucunda ise normal tip sperm ile yumurtaların yaklaşık olarak % 81'inin fertilizasyonu gerçekleştirdiği ama mutant sperm ile fertilizasyonun olmadığı gözlemlenmiştir. Hiperaktif motilitenin eksikliğinden dolayı kaynaklandığı düşünülen bazı mutant sperm hücrelerinin yumurtalara yapıştığı fakat penetrasyonda yetersiz oldukları gözlemlenmiştir (şekil 8). Fertilizasyonun doğal sürecinde, sperm hücreleri yumurtaların plazma membranları ile birleşerek kumulus oophorus ve zona pellucida (ZP)'ya olarak adlandırılan yapılara penetre olurlar. Yapılan başka bir çalışmada ise, dış tabakaları kaldırılmış (zona pellucidasız) yumurtalar ile mutant sperm ve normal tip sperm hücresinin her ikisinde de fertilizasyon ve penetrasyon gerçekleşmiş dolayısı ile bunun sonucunda CatSper iyon kanal proteinlerinin yumurtanın dış yüzeyinde bulunan koruyucu katmanların üzerinden penetrasyonu kolaylaştırdığı anlaşılmıştır⁵³.



Şekil 8. CatSper iyon kanal proteinin fonksiyonel önemi.

Spermatogenezis ya da spermiogenezis süreçlerin de CatSper iyon kanalında meydana gelen bozukluklar da sperm fizyolojisinde kusurlara neden olmaktadır. Fare modellerinin insan fizyolojisi ile benzerliklerinden dolayı fareler

üzerinde yapılan çalışmalarda proteinler arasındaki fiziksel etkileşimlerde CatSper alfa alt birimlerinin (CatSper 1-4) her birinde fenotipik benzerliklerin olduğu ve bahsedilen bu dört CatSper protein formu heterodimerik kanalın bozulması sonucunda erkeklerde infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalara ek olarak infertil hastalarda CatSper 1-2' de oluşan mutasyonlarının asthenoteratozoospermi ile ilişkili olduğu bildirilirken, CatSper 3-4 oluşan mutasyonların herhangi bir infertiliteye sebep olduğu gözlemlenmemiştir ⁵⁴.

2.12.2. Proton Voltaj Kapılı İyon Kanalı (Hv1)

Proton voltaj kapılı iyon kanalı (Hv1) hücre membranında yer almakta olup, bu kanalda bulunan her bir sensör kendi proton iletim yolunu içermektedir. Ayrıca, Hv1 sperm flagellumunun ana kısmında lokalize olarak gösterilmiştir ⁴⁷. İnsan spermatozoası erkek üreme sistemi içerisinde hareket yeteneğinden yoksundur, dolayısı ile aktivasyonunu kadın üreme sistemi içine girer girmez gerçekleştirmektedirler. Bahsedilen bu aktivasyon süreci için ise sperm sitoplazmasının alkalizasyonu gerçekleştirilmelidir. Sağlam flagellara sahip sperm hücresinin Hv1 kanalındaki voltaj bağımlı proton iletkenliği hücre membranının depolarizasyon ile aktive edilir. Hv1 proton iyon kapılı kanal güçlü blokör olmasının yanı sıra proton iyonlarının sadece dışa gönderilmesine izin vermektedirler, bu sebepten dolayı intrasellüler alkalizasyonun düzenlenmesinde ve spermatozoanın aktive olmasında önemli görevleri vardır. Bahsedilenlere ek olarak, Hv1 ve CatSper iyon kanallarının hücre içinde aynı lokalizasyonda bulunmaları sebebiyle etki alanlarının aynı olması, Hv1 kanallarından proton çıkışı intraflagellar alkalizasyonu indüklenmesine yardımcı olurken aynı zamanda CatSper iyon kanallarını da aktif hale getirebilmektedirler. Bu nedenle, insan spermatozoasında bulunan Hv1 ve CatSper iyon kanallarının beraber çalışması ile kadın üreme sisteminde kalsiyum (Ca^{+2}) iyonunun gereken sperm aktivasyonunu gerçekleştirmesini ve her ikisi birlikte ortamda bulunan intrasellüler pH değerinin artmasını sağlayabilirler ⁴⁷.

2.12.3. Potasyum Voltaj Kapılı İyon Kanalı

Potasyum (K^+) iyonu hücrel migrasyon mekanizmasında görev alan asıl elementlerden biridir. Potasyum voltaj kapılı iyon kanalı (KSper) özellikle sperm flagellumun esas parçasında lokalize olduğu ve yapılan çalışmalarda Slo3 geninin KSper iyon kanalı için önemi gösterilmiştir. Slo3 geninin ortamdaki pH ve voltaj değerlerine olan duyarlılığından dolayı sperm kapasitasyonunda ve akrozom reaksiyonunda rol aldığı düşünülmüş olup, ortamdaki intrasellüler pH ve membran potansiyelinde meydana gelen değişikliklerde fertilizasyon için gerekli olan fonksiyonların gerçekleştiği anlaşılmıştır ⁴⁷.

Zeng ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada korpus epididim spermin örneğinde gerçekleştirilen deneyde hücre membranının yer alan tüm pH bağımlı potasyum (K^+) kanal akımının Slo3 geninde meydana gelen delesyon ile oratadan kalktığı gösterilmiştir. Fizyolojik iyon gradientleri ile normal tip sperm hücrelerinde KSper/Slo3 hiperpolarizasyonu gerçekleşir iken, Slo3 geni bulundurmayan (SLO3-/-) spermatozoarda ise depolarizasyon gözlemlenmektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda Slo3-/- gen mutasyonu bulunduran erkek farelerin infertil olduğu, fakat invitro fertilizasyon yöntemleri aracılığıyla bazen fertilizasyon gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile birlikte, spermatozoada (K^+) akımının gerçekleşmesiyle KSper/Slo3 hiperosmotik ortamların oluştuğu dolayısı ile sperm motilitesi ve normal morfolojinin kazanılmasında önemli görevlerinin olduğu, ayrıca Slo3 geninin fertilite için önemli olduğu ortaya çıkmıştır ⁴⁷.

2.12.4. Kalsiyum (Ca^{+2}) İyonu ile Aktive Edilen Klorür (Cl) Kanalı

CaCCs membran kanalları yardımıyla intrasellüler depo ya da ortamda serbest bulunan sitozolik kalsiyum (Ca^{+2}) iyon konsantrasyonunun artırılması ile aktivasyonu gerçekleşir.

İnsan sperm hücresi üzerinde yapılan çalışmalar spermin baş kısmında gerçekleşen iyon kanal aktivitelerinin hücrel delikli patch clamp çalışmaları yardımıyla açıklıklar gösteren klorür (Cl^-) geçirgen kanalı meydana çıkarmaktadır. Sperm hücresinin baş kısmının ayrı bölümlerinde yer alan farklı tipte kanallar mevcut olup her bir kanalın fonksiyonel görevi farklıdır. Matür insan spermatozoasının baş

kısımında yapılan tüm hücresel akımların incelenmesi sonucunda CaCCs akımlarının varlığı tespit edilmiş ve bunların TMEM16 protein yardımı ile taşındığı düşünülmüş fakat CaCCs akımlarının sperm motilitesindeki rolü henüz anlaşılamamıştır ⁴⁹.



3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen, Sosyal ve Girişimsel Olmayan Sağlık Bilimleri Araştırmaları etik kurulunca onaylanan çalışmada, 1 Mart 2020 – 1 Haziran 2020 Haziran tarihleri arasında Medical Park Hastanesi Tüp Bebek (IVF) ünitesinde bulunan Androloji laboratuvarına semen analizi için başvuran hastaların atık numuneleri çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmaya aile öyküsünde genetik anomalisi bulunmayan ve varikoseli olmayan hastalar alınmıştır.

Hastaların değerlendirilmesi yapılırken anamnezde yaş, primer ya da sekonder infertil durumunun varlığı, korunma yöntemlerinin kullanılıp kullanılmadığı ve cinsel ilişki sıklığı sorulmuştur. Ayrıca, ailede infertil bireylerin varlığı, sigara kullanımı, çocuklukta geçirilen kabakulak gibi hastalıkların durumu, orşit, prostatit ve epididimit öyküsü gibi durumlar sorgulanmış olup bunlara ek olarak fizik muayenelerinde ise testis hacimleri, skrotum, epididim, vaz deferens ve varikosele muayeneleri tamamlanmıştır. Ayrıca, hormonal olarak total testosteron, FSH, LH ve prolaktin seviyeleride değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastalar Avrupa Üroloji Derneği'nin erkek infertilitesi guideline'na uygun olarak 4 gruba ayrılmıştır. İlk grup, normozoospermi (kontrol grubu), ikinci grup astenoteratozoospermi, üçüncü grup teratozoospermi ve son olarak dördüncü grup ise oligoastenoteratozoospermidir.

3.2. İyon Kanallarını Tespit Etmek için Kullanılan Materyaller

- - 196 °C Sıvı Azot Tankı
- Falkon (15 mL) santifüj tüpü
- Falkon Tüp (50 mL)
- Pasteur Pipet
- Santrifüj (Sigma, Almanya)
- Işık mikroskobu
- Makler Sayım Kamerası (Counting Chamber Makler)

- Otomatik Pipetler
- Mini Plate Spin
- Poly-Lysine Lam
- Lamel
- PAP-pen
- Buzdolabı (+4°C)
- Vortex (Elektro-MAG)

3.2.1. İyon Kanallarını Tespit Etmek için Kullanılan Kimyasallar

- CATSPER4 Polyclonal Antibody, HRP Conjugated Kiti: Bioss Antibodies, KHL conjugated synthetic peptide derived from human CatSper4, Catalog no: bs- 6422R-HRP, Boston City, Massachusettes in ABD.
- PBS (Phosphate-Buffered Saline), Fosfat Buffer Yıkama solüsyonu
- %3-5 Paraformaldehit
- PB-Sukroz Solusyon (20 µl 0.5M pH:7, Sodyum Fosfat Buffer, 22.5gr sükröz, 500ml'ye distile su ile tamamlanır)
- Sigma- Triton-X100
- Bloking Solusyon
- 20 µl CatSper Antibody (1:200)
- İmmersion oil
- Diff-Quik Reagent 1 (EosinG in phosphate Buffer): kırmızı renk solusyon
- Diff-Quik Reagent 2 (Thiazne dye in phosphate Buffer): mavi renk solusyon
- Distile su (dH₂O)
- DMSO
- Gliserol
- DMEM
- Serum (%5) FBS (Fetal Bovine Serum)
- HSA
- Kriyotüp

3.3. Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Swim-Up Tekniği ve Diff-Quik Boyama

WHO tarafından önerilen protokole göre, semen analizi için perhiz süresini tamamlamış normospermik, astenoteratozoospermik, teratozoospermik ve oligoastenoteratozoospermik hasta gruplarından mastürbasyon yoluyla semen örnekleri Medical Park Hastanesi'nde toplanmış olup likefaksiyon süreleri tamamlandıktan sonra sperm hazırlama işlemine alındı. Öncelikle, semen örneğinin volümü, konsantrasyonu, motilitesi ve ayrıca lökosit parametreleri değerlendirildi. Ardından morfoloji analizi için diff-quick boyama tekniği uygulandı.

Swim-up mediumu (DMEM-%3FBS) hazırlandı ve mikroskopik inceleme ardından swim-up tekniği kullanılarak semen yıkaması yapıldı. 1ml semen sıvısı 15ml'lik falkon tüpe eklendi, ardından semen üzerine 1/1 oranında sperm yıkama medyumunu konuldu ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda oluşan üst katmandaki süpernatant pipet yardımıyla falcon tüpten atıldı ve pellet üzerine 1 ml medyum eklendi. Falkon tüpe 45° lik eğim yapılarak inkübatörde 1 saat 37° C'de bekletildi. Daha sonra, sperm parametrelerini ölçmek için supernatant kısmından alınan örneğin sayı ve motilitesi incelendi.

Diff-quick tekniği için ise, ilk olarak semen sıvısından pipetor yardımıyla alınan örnekler lam üzerine damlatılıp yayma yapılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı, ardından kurumasını tamamlayan yayma preparatlar % 3 paraformaldehit solüsyonunun içerisinde fikse olmaları için yaklaşık 30 dakika bekletildi. Fiksasyonu tamamlanan preparatlar oda sıcaklığında kuruduktan sonra ilk olarak Reagent 1: (eosin g in phosphate buffer), kırmızı renk solüsyon içerisinde 15 dakika bekletildi ve sonrasında fazla boya lam preparat üzerinden akıtıldı. Aynı işlem, Reagent 2: (thiazine dye in phosphate buffer), mavi solüsyon içerisinde 15 dakika bekletilerek tekrarlandı ve sonrasında fazla boya solüsyonu preparat üzerinden akıtıldı. Boyanmaları tamamlanan preparatlar oda sıcaklığında kuruduktan sonra immersion oil damlatılarak ışık mikroskopunda morfolojileri gözlemlendi.

3.3.2. Sperm Kriyoprezervasyon metodu

Sperm dondurma işlemi için, her bir hasta grubunun aynı semen örneğinin yarısı kriyoprezervasyon için işleme alınıp dondurma sonrası immunofloresan yöntemi uygulanırken, diğer yarısına önce immunofloresan tekniği uygulandı.

- Öncelikle hasta gruplarından alınan örnekler sperm konsantrasyon yoğunluklarına göre 1500 rpm de 15'er dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısımları atılıp, pellet kısımlarının üzerlerine 250µl PBS eklendi.
- Daha sonra, 250µl semen sıvısından pipetör yardımıyla alınıp kriyotüp içerine aktarıldı, ardından üzerine hazırlanan sperm dondurma mediumu (4 mL DMSO, 4 mL Gliserol, 42 mL, PBS) eklenip, pipetör yardımıyla karıştırıldı.
- Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra -196 derece azot tankına konuldu.
- Hasta gruplarından alınan semen örnekleri çalışma için yeterli sayıya ulaştıktan sonra, dondurma sonrası immunofloresan yöntemi uygulamak için sırasıyla azot tankından çıkartıldı.
- Oda sıcaklığına gelen kriyotüp içerisinde bulunan örneklerin üzerine 37° C'de sperm yıkama (DMEM, %5 FBS, HSA) solüsyonu eklenerek çözüldü.
- Ardından, çözülen örnekler 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
- Pellet üzerine 1:1 oranında medium konularak iki kez 1500 rpm de 10 dakika santrifüj tekrarlanılarak örnekler yıkama işlemi yapıldı.
- Daha sonra, pellet üzerine 250µl medium eklenip karıştırıldıktan sonra, pipetör yardımıyla alınan karışım Poly-Lysine'li lamaların PAP-pen yardımıyla çizilen (+) ve (-) bölümlerinin üzerilerine damlatılarak yayma preparatlar hazırlandı.
- Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra %3'lik paraformaldehit solüsyonunda 30 dakika fikse olmaları için bekletildi.
- Son olarak, fiksasyon süreçleri tamamlanan yayma preparatlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra immunofloresan yöntem uygulanması için hazır hale getirildi.

3.3.2. İmmunofloresan Yöntemi

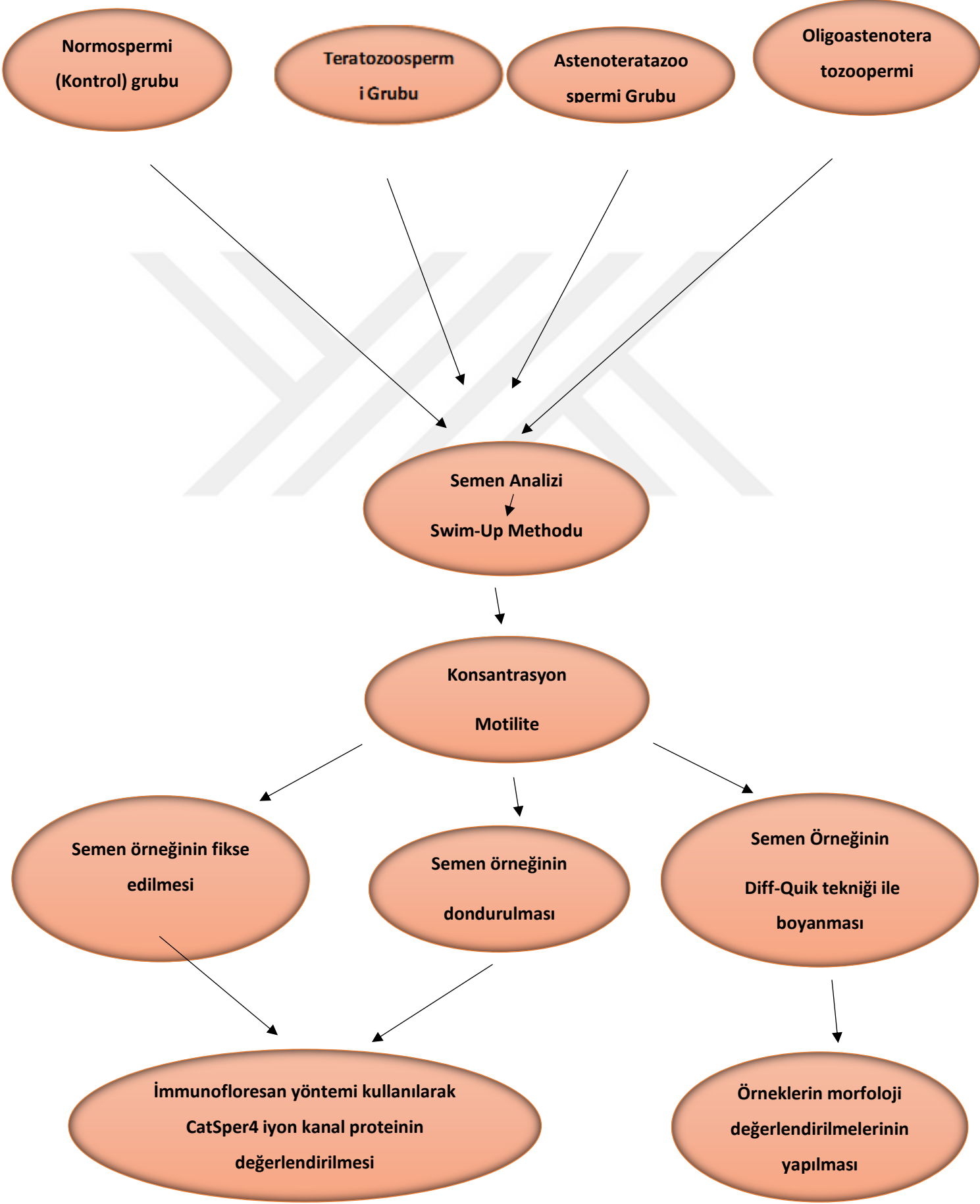
- Sperm kriyoprezervasyon işlemi öncesi immunofloresan yöntemi uygulamak amacıyla aynı semen örneğinin yarısı pipetör yardımıyla alınıp üzerine 250 µl sperm yıkama solüsyonu eklenip 1500 rpm de 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası örneğin süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 250 µl sperm yıkama solüsyonu eklenip yıkama işlemi tekrarlandı.
- Daha sonra, örneklerin üzerine 1:1 oranında medium pipetör yardımıyla eklenip Poly-Lysine li lamaların PAP-pen yardımıyla çizilen pozitif (+) ve negatif (-) bölümlerine 3'er µl sperm süspansiyonu damlatılarak yayma preparat yapıldı.
- Oda sıcaklığında kurutulan örnekler %3 'lik paraformaldehit solüsyonunda 15 dakika bekletildi.
- 15 dakika sonrasında paraformaldehit solüsyonundan çıkarılan preparatlar oda sıcaklığında kuruduktan sonra immunofloresan yöntem için hazır hale getirildi.
- Poly-lysine'li lamaların konulacağı preparat kutusunda nemli ortam sağlamak amacıyla gazlı bezler ıslatılarak zemine yerleştirildi.
- Dondurma öncesi ve dondurma sonrası hazır hale getirilen yayma preparatlar preparat kutusuna sırasıyla yerleştirildi.
- Yayma preparatların her birinin üzerine hazırlanan PB-Sükroz çözeltisi damlatıldı ve +4 ° C'de 1 gece bekletildi.
- Ertesi gün buzdolabından alınan preparatların her biri 3'er kez PBS solüsyonu damlatılarak yıkandı.
- Yıkama sonrası, preparatların üzerine % 3'lik paraformaldehit damlatılarak 15 dakika fikse olmaları için bekletildi.
- 15 dakika sonrasında örnekler terkardan 3 er kez PBS solüsyon ile yıkandı.
- Ardından, permeabilizasyonu sağlamak amacıyla %0,1 Triton-X100 solüsyonu preparatların üzerine damlatılarak 15 dakika bekletildi.
- Permeabilizasyon süresi biten örnekler PBS ile 3 defa yıkandı ve hazırlanan bloking solüsyonu preparatların üzerine damlatılarak oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 saat preparat kutusu içerisinde bekletildi.

- 1 saat sonunda ise, yıkama işlemi yapılmadan sadece pozitif (+) işaretli bölüme 20 µl CatSper antibody (1:200) 'si eklenirken, negatif (-) işaretli bölüme ise sadece PBS eklenerek +4 ° C'de 1 gece buzdolabında bekletildi.
- Ertesi gün buzdolabından çıkarılan preparatlar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra antikor olarak 20 ul FITC (Fluorescein (FITC))-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) katalog no:115-095-003) eklenerek 1 saat 37°C etüv de bekletildi.
- 1 saat sonunda alınan örnekler tekrar 3 'er kez PBS solüsyonu ile yıkandı.
- Ardından 3'er kez PBS ile yıkaması yapılan preparatlar oda sıcaklığında kurultuldu ve kapama medium (gliserol) damlatılarak lamel ile üzerleri kapatıldı.
- Kapatılan örnekler floresan mikroskopunda gözlemlenerek boyanan ve boyanmayan kısımların sonuçları kaydedildi.

3.3.3. İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmada dört hasta grubunun karşılaştırılması Kruskal Wallis Test ile istatistiksel olarak önemli farklılık gösteren değişkenlerde ise grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney Test ile yapılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca bahsedilen dört hasta grubunun boyama öncesi ve sonrası değerlerinin karşılaştırılması Wilcoxon Signe Ranks test ile yapılmıştır.

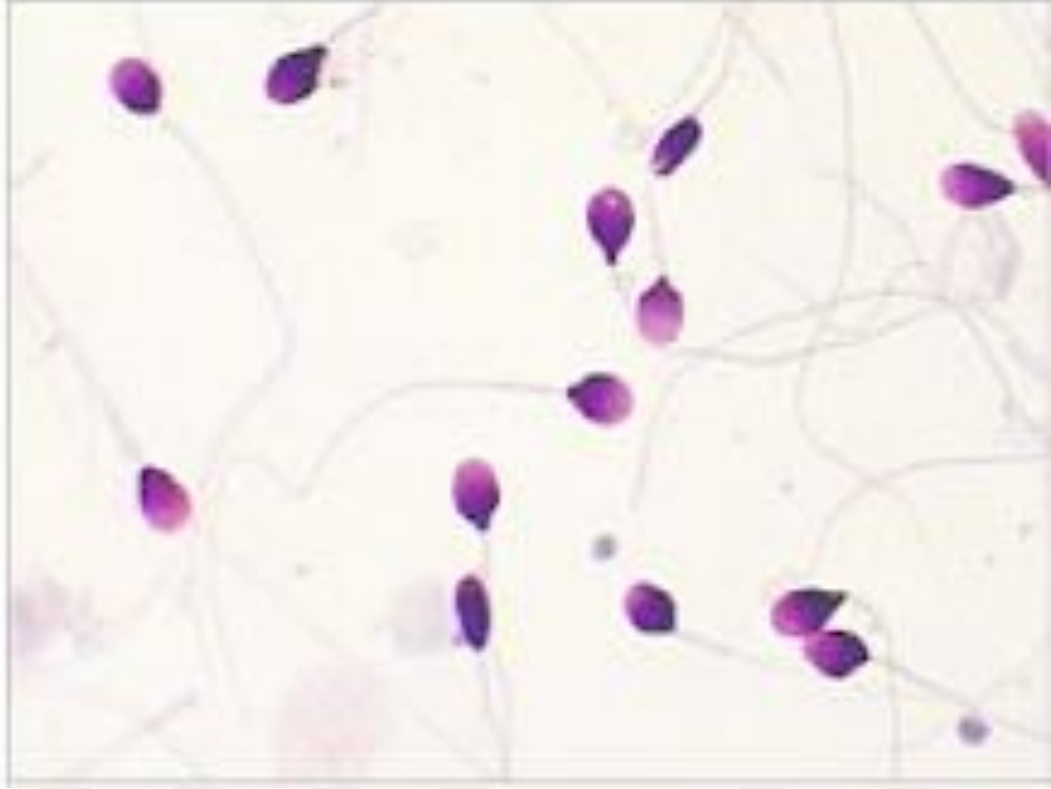
ÇALIŞMA ŞEMASI



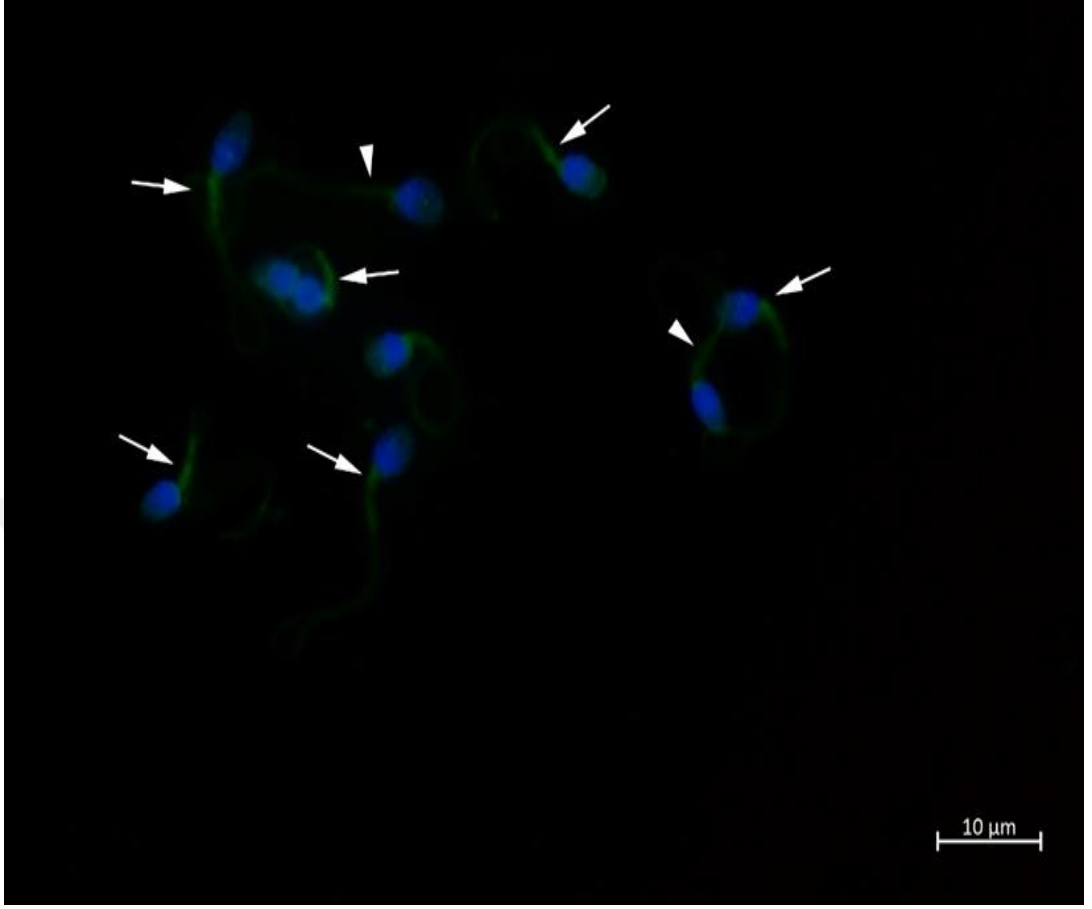
4.BULGULAR

Bu çalışmada, Mart 2020- Haziran 2020 tarihleri arasında kullanılan semen örnekleri, Medical Park Hastanesi Tüp Bebek (IVF) Ünitesinde bulunan Androloji laboratuvarına başvuran hastalardan çalışma kriterlerine uygun kontrol grubu normospermik (n:14), teratozoospermik (n:13), oligoastenoteratozoospermik (n:11) ve son olarak astenoteratozoospermik (n:11) tanısı olan toplam 49 hasta değerlendirilmeye alınmıştır. Toplanan örneklerle swim up tekniği uygulandıktan sonra yukarıda bahsedilen her bir grubun aynı semen örneği 2'ye bölünüp, ½ semen örneğine kriyoprezervasyon işlemi öncesi CatSper4 iyon kanal ekspresyon analizi için immunofloresan yöntem uygulanırken, diğer kalan ½ semen örneğine ise kriyoprezervasyon işlemi sonrası immunofloresan yöntem uygulanarak sperm dondurma işlemi öncesi ve sonrası CatSper4 iyon kanal ekspresyonlarında meydana gelen farklılıklar değerlendirilmiştir.

49 hastanın sperm örneklerinin her birinin yarısı dondurulmadan fikse edildikten sonra immunofloresan yöntemi uygulanarak CatSper4 iyon kanal ekspresyonları değerlendirilerek sayıları hesaplandı ve tüm örneklerle bu işlem ayrı ayrı uygulandı. Yine aynı hasta gruplarından alınan sperm örneklerinin diğer yarısına ise sperm kriyoprezervasyon işlemi sonrası immunofloresan yöntemi uygulanarak CatSper4 İyon kanal ekspresyonlarındaki farklılıklar değerlendirildi ve sperm dondurma öncesi ve sonrası grup arası farklılıklar CatSper4 antikoru yardımı ile immunofloresan yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı ayrıca, sperm kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve sonrası kalsiyum kanal ekspresyonları değerlendirildi.



Şekil 9. Diff-Quik boyama tekniği ile boyanan sperm hücrelerinin morfoloji değerlendirilmesi görüntüsü, (100X immersiyon objektifi) ışık mikroskobu.



Şekil 10. Spermdede bulunan pozitif ve negatif CatSper4 protein ekspresyonu (100X floresan mikroskobu görüntüsü, beyaz ok pozitif CatSper4'ü gösterir iken, ok başı negatif CatSper4'i göstermektedir.) Bar10 μm.

P değeri Yorumları sırasıyla aşağıdaki gibidir;

$p < 0.05$ İstatistiksel anlamlılık

$p < 0.01$ Yüksek derecede istatistiksel anlamlılık

$p < 0.001$ Çok yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık

$0.05 \leq p < 0.10$ Sınırdan anlamlılık.

$p > 0.10$ istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemektedir.

Tablo 2: Normospermi, teratozoospermi, oligoastenoteratozoospermi ve astenoteratozoospermi hasta gruplarının spermiyogram laboratuvar bulgularının Kruskal Wallis ve Mann Whitney testi kullanılarak ilişkilendirilmesi tablosu.

	NORMOSPERMİ (n=14)	TERATOZOOSPERMİ (n=13)	OLİGOASTENOTERATOZOOSPERMİ (n=11)	ASTENOTERATOZOOSPERMİ (n=11)	p*
YAŞ	31,71±8,02	35,23±7,64	35,45±6,30	33,36±7,31	0,5600
VOLUM	3,75±1,61	2,92±0,89	3,36±1,45	3,90±1,30	0,2550
KONSANTRASYON	66,92±37,60	46,15±33,17	41,29±44,05	46,27±4,56	0,1684
TOTAL KONSANTRASYON	281,71±208,07 T,O	135,80±122,61	113,34±111,30	188,09±52,83 T,O	0,0127
MOTİLİTE 4	16,78±8,65 T,O,A	7,30±5,94	4,90±6,47	6,45±3,70	0,0012
MOTİLİTE 3	36,07±11,41 T,O,A	27,69±7,85	19,18±11,94	19,09±5,05 T	0,0008
MOTİLİTE 2	13,78±4,85	14,30±4,15	13,72±12,26	11,09±3,21	0,3321
MOTİLİTE 1	33,00±17,41 T,O,A	50,69±12,87	62,45±18,65	63,09±8,51 T	0,0002
TOTAL MOTİLİTE	67,00±17,41 T,O,A	49,30±12,87	37,54±18,65	35,09±7,84 T	0,0001
MORFOLOJİ NORMAL	6,64±2,31 T,O,A	3,53±8,02	1,09±1,30	0,90±1,04	0,0001
MORFOLOJİ BAŞ	72,50±7,56	76,15±9,26	69,81±5,81	67,81±9,28	0,1096
MORFOLOJİ BOYUN	8,14±5,22	7,07±4,80	11,27±4,61	10,45±6,82	0,2457
MORFOLOJİ KUYRUK	12,71±7,34	15,30±7,51	16,63±3,67	18,72±8,63	0,3339

Tablo 2’de total konsantrasyon değerleri normospermi grubu ve astenoteratozoospermi gruplarına kıyasla teratozoospermi grubu ve oligoastenoteratozoospermi gruplarına göre daha yüksek grlmektedir.

Motilite 2, gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farklılık göstermezken, total motilite, motilite 4 ve 3, normospermi kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla en yüksektir. Motilite 1 ise normospermi grubunda en düşüktür. Ayrıca morfoloji normal de en yüksek olduğu grup ise kontrol grubu olan normospermidir. Diğer değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir.

Dört grubun karşılaştırılması Kruskal Wallis Test ile; istatistiksel olarak önemli farklılık gösteren değişkenlerde grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney Test ile yapılmıştır.

Tablo 3: Normospermi hasta grubunun boyama öncesi ve sonrası değerlerinin Wilcoxon Signe Ranks Test uygulanarak karşılaştırılması tablosu.

	NORMOSPERMİ (n=14)		
	Ortalama±SS		p*
	Önce	Sonra	
Yüksek boyalı	77,64±22,83	64,14±19,27	0,001
Düşük boyalı	10,64±4,58	18,42±7,90	0,001
Boya almamış	4,57±2,31	9,57±4,38	0,001

*: Wilcoxon Signed Ranks Test

Tablo 4: Teratozoospermi hasta grubunun boyama öncesi ve sonrası değerlerinin Wilcoxon Signe Ranks Test uygulanarak karşılaştırılması tablosu.

	TERATOZOOSPERMİ (n=13)		
	Ortalama±SS		p*
	Önce	Sonra	
Yüksek boyalı	7,69±4,17	5,38±3,09	0,024
Düşük boyalı	13,92±6,60	11,92±6,07	0,040
Boya almamış	71,07±22,48	75,00±23,41	0,026

*: Wilcoxon Signed Ranks Test

Tablo 5: Oligoastenoteratozoospermi hasta gruplarında boyama öncesi ve sonrası değerlerinin Wilcoxon Signe Ranks Test uygulanarak karşılaştırılması tablosu.

OLİGOASTENOTERATOZOOSPERMİ (n=11)			
	Ortalama±SS		p*
	Önce	Sonra	
Yüksek boyalı	2,36±2,16	0,45±0,82	0,011
Düşük boyalı	8,36±4,01	7,27±3,41	0,072
Boya almamış	80,27±26,87	82,27±27,59	0,261

*: Wilcoxon Signed Ranks Test

Tablo 6: Astenoteratozoospermi hasta gruplarında boyama öncesi ve sonrası değerlerinin Wilcoxon Signe Ranks Test uygulanarak karşılaştırılması tablosu.

	ASTENOTERATOZOOSPERMİ (n=11)		
	Ortalama±SS		p*
	Önce	Sonra	
Yüksek boyalı	5,45±3,59	3,00±2,05	0,012
Düşük boyalı	10,90±4,21	9,09±3,70	0,007
Boya almamış	74,54±25,19	78,81±26,37	0,005

*: Wilcoxon Signed Ranks Test

Tablo 7: Normospermi, astenoteratozoospermi, oligoastenoteratozoospermi ve teratozoospermi gruplarının sperm kriyopreservasyon işlemi öncesi ve sonrası CatSper4 pozitifliğinin karşılaştırılması tablosu.

CatSper4 pozitifliği	Normospermi Kontrol Grubu	Astenoteratozoospermi Grubu	Oligoastenoteratozoospermi Grubu	Teratozoospermi Grubu
Yüksek pozitiflik Dondurma öncesi Dondurma sonrası	77,64±22,83 64,14±19,27*	5,45±3,59 3,00±2,05**	2,36±2,16 0,45±0,82**	7,69±4,17 5,38±3,09**
Düşük pozitiflik Dondurma Öncesi Dondurma Sonrası	10,64±4,58 18,42±7,90*	10,90±4,21 9,09±3,70**	8,36±4,01 7,27±3,41**	13,92±6,60 11,92±6,07**
Negatiflik Before cryo After cryo	10,64±4,58 18,42±7,90*	74,54±25,19 78,81±26,37**	80,27±26,87 82,27±27,59	71,07±22,48 75,00±23,41

*p<0,001 , **p<0,01, : Wilcoxon Signed Ranks Test

Tablo 8. Spearman's rho Korelasyon Analizi sonuçları.

		YÜKSEK BOYALI		
		ÖNCE	SONRA	FARK
KONSANTRASYON	r	0,213	0,207	-0,251
	p	0,141	0,153	0,082
	n	49	49	49
TOTAL MOTİLİTE	r	0,462**	0,466**	-0,441
	p	0,001	0,001	0,002
	n	49	49	49
MORFOLOJİ NORMAL	r	0,440**	0,476**	-0,404
	p	0,002	0,001	0,004
	n	49	49	49

Konsantrasyon, motilite ve morfoloji arttıkça dondurma öncesi- sonrası arasındaki fark azalmaktadır.

CatSper4 pozitifliği normospermide yüksek seviyede görülürken tüm diğer gruplarda ise CatSper4 yüksek pozitifliğinin sperm motilitesi ve morfolojisi ile pozitif korelasyonu bulundu.

5. TARTIŞMA

İnfertilite, bilindiği üzere yaklaşık bir yıl düzenli ve korunmasız cinsel ilişki olmasına rağmen çocuk sahibi olamama durumu olarak tanımlanmaktadır ¹. Erkek faktörlü infertilite nedeninin çoğunluğunun ise hatalı spermatogenezele ilgili olduğu görülmüştür ².

Kadın üreme sisteminde sperm osmotik basınç, oluşan farklı iyon konsantrasyonu ve pH ile değişebilen mikro çevreye sahiptir. Spermin kadın üreme sistemine girişi ve ortama uyumu sırasında kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon olayları gerçekleşmektedir ve tüm bu süreçler iyon kanallarının normal fonksiyonuna bağlı olarak çalışmasıyla mümkün olmaktadır. Bu nedenle, iyon kanal aktivitelerinin sperm fizyolojisi ve aktivasyonu üstünde büyük ölçüde etkilidir ³.

Erkek fertilitasını değerlendirmek için uygulanan spermiyogram testinin analizi sonucu elde edilen değerlerle, sperm konsantrasyonu, hacmi, hareketliliği, ilerlemesi, lökosit sayısı ve morfolojisi gibi parametreler belirlenir ⁴. Spermiyogram analizi sonucunda hesaplanan sperm sayısı 15 milyon/ml'den az ise oligozoospermi, ilerleyici motil spermatozoa yaklaşık %32' den daha az ise asthenozoospermi, normal morfolojideki spermilerin ise yaklaşık %4' den az olması durumu ise teratozoospermi olarak tanımlanırken bunlara ek olarak, spermilerin miktarı, biçimi, hareketi bakımından normal değerler aralığında olması normozoospermi olarak adlandırılmaktadır ⁵.

Sperm hücresi membranlarında bulunan iyon kanallarının başlıcaları, Cation Channel Sperma (CatSper), Potassium Channel Subfamily U1 (KCNU1), Proton Voltage- Gated Ion Channel1 (Hv1), Transmembrane protein (TMEM16)' dir. CatSper dört farklı alfa(α) CatSper 1-4 alt biriminden ve CatSper α (alfa), CatSper δ (gama), CatSper β (beta) olmak üzere, bunlara ek olarak üç yardımcı alt birimden oluşmaktadır. CatSper 1, 2, 3 ve 4 düşük voltaj bağımlı, pH duyarlı ve her biri sperm hücresine özgü iyon kanallarıdır. Pozitif (+) yüklü kalsiyum iyonlarının sperm hücreleri içerisine girmesini kontrol eder, bu kontrol ise sperm hiperaktivasyonu ve akrozom reaksiyonu için önemli ve gerekli bir süreçtir ⁶. CatSper kanalı, diğer iyon

kanalları ilebirlikte sperm motilitesindeki değişiklikler için gerekli olan kalsiyum girişini kolaylaştırırken, fertilizasyon sürecin ise spermin yumurtaya girmesi sırasın da dişi üreme sisteminin diğer katmanlarına doğru ilerlemesine yardım etmektedir. Spermatozoa erkek üreme sistemi içerisinde hareket yeteneğine sahip değildir, hareket yeteneğini kazandığı yer kadın üreme sistemidir ve bu hareket yeteneğinin kazanılması için sperm sitoplazmasının alkalizasyonuna ihtiyaç duyulur, CatSper spermatozoanın hiperaktif motilite kazanması ve yumurtayı döllemesi için hücre içi alkalizasyonu gerçekleştirir. Yukarıda bahsedilen CatSper'in bu görevlerinden dolayı CatSper kanallarında meydana gelen mutasyonların insanlarda infertilite ile ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır ⁶. Ayrıca, CatSper genlerinin bozulması, spesifik motilite parametrelerini de büyük ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasın da varikosel öyküsü ve azospermi durumu olmayan, ayrıca genetik parametreleri ve aile öyküsü normal olan infertil hastaların örnekleri ile kriyoprezervasyon işleminin CatSper4 iyon kanalı üzerine etkileri araştırıldı.

Catsper iyon kanalları insan ve farelerde sperm flagellumu üzerinde bulunan ana parça kısmında lokalize olduğu bilinmektedir ⁵⁵. CatSper iyon kanallarının temel görevi ise spermd e hücre içi Ca^{+2} (kalsiyum) konsantrasyonunu arttırarak sperm hareketinin daha hızlı olmasını sağlamaktadır ⁵⁶. Ren ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışama da , CatSper iyon kanallarının normal sperm motilitesini sağlaması ve spermin yumurtaya penetrasyonu için önemli etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir ⁵⁵. Ayrıca, yapılan başka bir çalışama da ise CatSper iyon kanalı bulundurmayan sperm hücresi ile normal tip farelerde CatSper 'siz spermilerin cansızlığının arttığı ve ileri motilitesinin daha azalmış olduğu gözlemlenmiştir ve en önemli sonuçlardan biri ise CatSper'siz sperm hücresinde kuyruk bölgesinde oluşan güçlü kıvrılmaların önemli derecede azaldığının gözlemlenmiş olmasıdır ⁵⁵.

CatSper 'siz sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneği ise invitro ortamda yapılan başka bir çalışmada değerlendirilmiştir ve sonucunda CatSper'siz spermilerin yumurtayı fertilize etme esnasında başarısız olduklarını , sağlıklı normal sperm hücrelerinin ise yaklaşık % 80 oranında fertilizasyonu gerçekleştirdiği

izlenmiştir. Fakat bazı CatSper'siz sperm hücreleri yumurta hücrelerine yapışmış halde görülmüş ancak penetrasyonu başaramamışlardır. Zona pellucidası (ZP) enzimatik olarak kaldırılan yumurta hücreleri ise hem CatSper iyon kanallarını bulunduran normal sperm hücresi ile hemde CatSper'siz fare sperm hücreleriyle bir araya getirildiğin de her ikisinin de fertilizasyonda başarılı olduğu gösterilmiştir dolayısıyla bunun sonucun da CatSper iyon kanallarının sperm hücresinin yumurtaya penetrasyonu için önemli rol üstlendiğini göstermektedir⁵⁷. Ayrıca yukarıda bahsedilenlere ek olarak insan CatSper genlerinin erkek fertilizasyonun da önemli olması erkek kontrasepsiyonu için ideal bir hedef olmaktadır, CatSper ailesinin yapısı, sınırlı ekspresyon kapasitesi ve fizyolojik fonksiyonları düşünüldüğünde, ilaçlara spesifik CatSper' ler veya yardımcı alt birimler motilite ile ilişkili infertilite tedavilerinde kullanılabilir⁵⁸. CatSper iyon kanallarının epididim, testis ve ejakulat sperminde sınırlı şekilde lokalize olmasından dolayı tedavi amaçlı kullanılacak olan spesifik bir blokörü diğer dokulara zararı olmayacağından yan etkilerinin minimum ya da hiç olmayacağı düşünülmüştür⁵⁷.

Marguez ve arkadaşları CatSper1 sperm ve CatSper2 iyon kanal proteini bulundurmayan sperm hücrelerinin infertiliteye sebep olduklarını ve kapasitasyon sırasında hiperaktivasyon yeteneğini gerçekleştiremediklerini göstermişlerdir⁵⁸. Ren ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise CatSper1 iyon kanal proteini bulundurmayan farelerin sperm hücrelerinin yüzme hızlarında azalma gözlemlemişlerdir⁵⁵. Avenarius ve arkadaşları ise çalışmalarında CatSper1 ve CatSper2 mutasyonlu spermlerin bireyler de astenoteratozoospermiye neden olduğunu bulmuşlardır⁵⁹. Lara Tamburrino ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da CatSper1 iyon proteini ekspresyonunun astenospermi hasta gruplarında azaldığını, ilerleyici motilite ve akrozom reaksiyonlarında azalma olduğunu gözlemlerken, Bhilawadikar ve arkadaşları ise gerçekleştirdikleri başka bir çalışmada ise CatSper2 iyon proteini ekspresyonunun da astenozoospermi hastalarda azalmış olduğunu ortaya çıkarmışlardır⁶⁰. Jin ve arkadaşları CatSper3 iyon proteini ve CatSper4 iyon proteini eksikliğinde erkek farelerin normal çiftleşme davranışları göstermelerine rağmen infertil olduklarını gözlemlemişlerdir. CatSper3 ve CatSper4 iyon proteini eksikliğinde farelerin her ikisi de normal sperm sayısına sahip ve motil olmalarına

rağmen tamamıyla her iki grubunda infertil olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, aynı deney de kapasitasyon ortamı sağlandığında normal tip spermiler de oda sıcaklığında inkübasyon süresinin 30 dakika sonrasında da hiperaktivasyon sürecinin gelişmeye başladığı izlenirken diğer yandan CatSper3 iyon kanal proteini ve CatSper4 iyon kanal proteini bulundurmayan spermde inkübasyon sürecinden 2 saat sonra ilk motilite izlenmiştir ve bunun sonucunda fonksiyonel CatSper3 iyon proteini ve CatSper4 iyon proteininin kapasitasyon süresi boyunca sperm hiperaktivasyonu için önemli olduğunu göstermiştir. Jin ve arkadaşlarının bahsedilen bu çalışmalarının sonrasında ise infertiliteyi 3 sebeple açıklamışlardır, bunlardan ilki CatSper3 ve CatSper4 iyon proteini bulundurmayan sperm hücrelerin de motilite büyük ölçüde azalır ve dolayısı ile sperm hücresinin yumurta hücresine ulaşmasında sorun oluşur, ikinci olarak CatSper3 ve CatSper4 iyon proteini bulundurmayan sperm hücreleri visköz ortama penetrasyonu gerçekleştirdikleri ama dişi üreme sisteminin mukozasında ilerleme yapamadıkları ve dolayısı ile yumurta hücresine ulaşabilen sperm hücre sayısında azalma gözlemlenebileceği ve sonuncu olarak hiperaktivasyon eksikliğinde kaynaklanan fertilizasyon sırasında kumulus hücrelerine ve zona pellucida yapısına penetrasyon için yeterli güç oluşturamayabileceğini ifade etmişlerdir ⁶¹.

CatSper iyon kanal proteinleri sadece sperm motilitesi ve hiperaktivasyonu için gerekli değil, aynı zamanda yumurtaya penetrasyon içinde gerekli olduğu şimdiye kadar yapılan çalışmalar da da gösterilmiştir.

Çalışmamızda CatSper4 iyon kanal protein ekspresyonu pozitifliği normospermik kontrol grubunda diğer 3 gruba kıyasla en yüksek seviyede gözlemlenmiştir. Ayrıca, normospermi, teratozoospermi, astenoteratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi (OAT) gruplarının hepsinde CatSper yüksek pozitifliğinin sperm motilitesi ve morfolojisi ile pozitif korelasyonu bulundu. Kriyoprezervasyon işleminin Catsper pozitifliği üzerine anlamlı negatif etkileri tüm gruplarda gözlemlenmiştir.

CatSper4 katyon kanal proteinlerinin ekspresyonunun kriyoprezervasyon işlemi sonrası negatif olarak etkilendiği normospermi grubunda en

yüksek seviyede görülürken tüm diğer gruplarda CatSper4 katyon kanal protein ekspresyonunun düşük seyrettiği anlaşılmıştır.

Bahsedilen tüm bu sonuçlar neticesin de sperm kriyoprezervasyon işleminin tüm gruplar içerisinde CatSper4 iyon kanal proteini üzerinde negatif etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Catsper ve erkek doğurganlığı ile ilgili yapılan çok sayıda araştırma ile, Catsper kanalının hem insan hem de fare doğurganlığı için gerekli olduğunu kanıtlamıştır. Otozomal resesif erkek kısırlığını gösteren iki akraba ailede rutin bir semen analizi, her iki ailenin de Catsper1 gen anormallikleri olduğu görülmüştür ⁶². Farklı infertil hastalarda, astenoteratozoospermi teşhis edildi ve Catsper2 geninden yoksun olduğu bulundu ⁶³. Ayrıca çalışmalar, dört Catsper alt biriminin (Catsper1–4) hepsinin hiperaktif edilmiş sperm hareketliliği ve erkek fertilitesi için ayrılmaz olduğunu, ancak Catsper3 veya Catsper4 eksikliğinin sperm üretimini veya başlangıçtaki hareketliliğini etkilemediğini göstermiştir ⁶⁴.

Buna ilaveten, progesteronla indüklenen akrozom reaksiyonları ve progesteronla indüklenen progresif hareketlilik gösteren sperm sayısı, normal gruplara göre Catsper1 ile baskılanmış gruplarda anlamlı ölçüde daha düşük olduğu gösterildi ⁶⁵.

Catsper kanalının normal ekspresyonu, progresif motilite ve akrozom reaksiyonu ile ilişkilidir, anormal kanal ekspresyonu, astenozoospermi patogenezinde rol oynayabilir. Spesifik olarak, farelerde sNHE veya Catsper2 genlerinin bozulması, hareketsiz spermatozoa bulguları ve başarısız hiperaktif motilite bulguları ile erkek infertilitesine neden olur, ancak diğer belirgin anormallikler yoktur ⁶⁵. Tüm bu sonuçlar, Catsper1 ve Catsper2'nin insanlarda veya farelerde normal erkek doğurganlığı için gerekli olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, Catsper3 ve 4, sadece testislerde değil diğer dokularda da ortaya çıkan akrozom reaksiyonunda ve erkek fertilitesinde önemli bir rol oynamaktadır ⁶⁶. Öte yandan, Catsper1 ve Catsper2 yalnızca memeli testislerinde tespit edilmiştir. Toplu olarak bu sonuçlar, Catsper1 ve Catsper2'nin spermde Catsper3 ve Catsper4'ten daha önemli olan, oldukça özelleşmiş flagellar proteinler olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda ise CatSper 4

ekspresyonunun normospermide oldukça yüksek olduğunu gösterdik. Buna karşılık oligoastenoteratozoospermi ve astenoteratozoospermi olgularında çok düşük ekspresyon saptadık. Literatürde bu konuda hemen hiçbir çalışma bulunmamakta olup daha geniş hasta gruplarında ve ayrıca açıklanamayan infertil olgularda çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.



6. SONUÇ

Yapılan bu çalışmanın asıl amacı, kriyoprezervasyon işleminin insan sperm hücresinde bulunan CatSper4 katyon kanal proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkilerini göstermekti. Kriyoprezervasyon işleminin Catsper4 pozitifliği üzerine anlamlı negatif etkileri tüm gruplarda gözlemlenmiştir. Tüm hasta gruplarından alınan sperm örneklerinde kriyopreservasyon işlemi sonrası CatSper4 katyon kanal proteinlerinin negatif olarak etkilendiği normospermi grubunda en yüksek seviyede görülür iken, teratozoospermi, astenoteratozoospermi, oligoastenoteratozoospermi (OAT) gruplarında CatSper4 katyon kanal protein ekspresyonunun düşük seyrettiği anlaşılmıştır.

Yapılan çalışmalar da genellikle CatSper iyon kanal ailesinde meydana gelen mutasyonların infertiliteye sebep olduğunu göstermiştir dolayısıyla bahsedilen mutasyona sahip spermeler de yumurtaya yapışma gözlemlenirken hiperaktif ve motilite eksikliğinden dolayı oosite penetrasyon gerçekleşmez ve fertilizasyon meydana gelmez.

Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışma da kriyoprezervasyon işlemi sonrası özellikle normospermik olgularda meydana gelen CatSper4 pozitifliğindeki azalışı açıklamak için daha fazla olguyu içeren detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kriyoprezervasyon işlemi sonrası CatSper4 protein ekspresyonunda azalma gözlemlenmesi kriyoprezervasyonun normospermi, teratozoospermi, oligoastenozoospermi (OAT) ve astenoteratozoospermi gruplarında katyon kanallarının daha az fonksiyon gösterebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız kriyoprezervasyon işleminin Catsper iyon kanal proteinleri üzerinde olumsuz etki gösterdiğinden dolayı fertilizasyona engel teşkil edebileceği için bu alanda yapılabilecek çalışmalara destek sağlamaktadır. Ayrıca, CatSper iyon kanallarının fonksiyonları daha belirgin şekilde aydınlatıldığında, inhibitör ya da aktivatörlerin geliştirilmesi ile de çok sayıda infertil hastaya tedavi olanağı sağlanabilmektedir.

7. ÖZET

Sperm Kriyoprezervasyonunun Erkek İnfertilitesinde Catsper İyon Kanal Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin İmmunofloresan Yöntem Uygulanarak İncelenmesi.

CatSper membran kanalları, katyon kanalları olarak spermin kemotaksis hareketi, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu dahil olarak fizyolojisinde önemli bir yer almaktadır. Katyon kanallarının infertil erkeklerde dağılımı konusunda insan çalışması bulunmamaktadır. Ayrıca sperm dondurma işleminin sperm DNA yapısı üzerine olumsuz etkilerinden söz edilmektedir, ancak kriyoprezervasyon işleminin CatSper kanal proteinleri üzerine etkileri konusunda da literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, oligoastenozoospermi, astenoteratozoospermi, teratozoospermi olarak üç hasta grubu ve kontrol grubu olmak üzere normozoospermik toplam dört grup çalışmaya dahil edilerek, sperm kriyoprezervasyonu işleminin semen analiz sonuçları farklı olan hasta gruplarında kontrolle kıyasla, Catsper4 iyon kanal ekspresyonlarına etkisinin immunofloresan yöntem uygulanarak araştırılması amaçlanmıştır.

CatSper 4 protein pozitifliğinin sperm boyun bölgesinde lokalize olduğu ve normozoospermik hasta grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek oranda olduğu görülmüştür. Dondurma öncesi ve sonrası CatSper4 proteininin pozitiflik değerleri normospermi grubunda karşılaştırıldığında konsantrasyon, motilite ve morfoloji değerleri yükseldikçe dondurma öncesi ve sonrası arasındaki farkın azaldığı görülmüştür. Astenoteratozoospermi teratozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi gruplarında Catsper4 proteini yüksek pozitifliğinin sperm motilitesi ve morfolojisi ile pozitif korelasyonu ve kriyoprezervasyonun Catsper4 protein pozitifliği üzerine negatif etkileri bulundu.

Sonuç olarak çalışmamız CatSper 4 iyon kanallarının özellikle astenoteratozoospermik ve teratozoospermik gruplarda sperm progressif motilitesi ile ilişkili olduğu ve kriyoprezervasyon sonrası bu iyon kanal protein kaybının ortaya

ıkabileceğini göstermiştir. Normozoospermik grupta ise kriyoprezervasyon sonucu bu farklılıklar gözlenmemiştir.



8. SUMMARY (ABSTRACT)

Study of the Effect of Sperm Cryopreservation on CatSper Ion Channel Expression in Male Infertile Patients By Using Immunofluorescence Technique

The CatSper membrane channels which is known as cation channels play an important roles in capacitation, acrosome reaction and chemotaxis movement of the sperm physiology. There is no any study about the cation channels distribution on the infertile male patients. In addition to these mentioned about, it is well known that, in the recent years studies include that, cryopreservation techniques have negative effects on the sperm DNA, but also there is no any analysis about the cryopreservation effects on the CatSper4 ion channel proteins in the literature.

In this study, we aimed to investigate the effect of sperm cryopreservation on a total of 47 patients consisting 4 groups as oligoasthenoteratozoospermia, asthenoteratozoospermia, teratozoospermia and normospermia which is controls applied by using immunofluorescence method compared to control group in patients with different semen analysis results.

CatSper4 protein positivity was found to be localized in the sperm acrosome region and was higher in the normozoospermic patient group compared to the other groups in the study. When the positivity values of CatSper4 protein before and after freezing process were compared in the normospermia group, the difference between before and after freezing process decreased as the concentration, motility and morphology values increased. In the asthenoteratozoospermia teratozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia groups, the positive correlation of CatSper4 protein high positivity with sperm motility and morphology and found out that, the negative effects of cryopreservation on CatSper4 protein positivity.

9. KAYNAKLAR

1. Dohle GR, Colpi GM, Hargrave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eu. Urol* (2005); 48: 702-712.
2. Coutton C, Satre V, Arnoult C, Ray P. Genetics of male infertility, the new players. *Médecine sciences* (2012); 28: 495-504.
3. Liping Z, HuaFeng W, BaoMing L. Sperm-Specific Ion Channels: Targets holding the Most Potential for Male Contraceptives in Development. *Contraception* (2013); 88: 483-490.
4. Estieves, (2014);
5. EAU Guidelines, Male Infertility, (2015).
6. W. Saunders Company ve Schoenwolf, GC. *Human Embryology*. 4th ed. (2008); Churchill Livingstone. 480-535.
7. Carlson, B.M, *Human Embryology and Developmental Biology*. 4th ed. (2009); MosbyElsevier. 422-426.
8. Murashima A, Kishigami S, Thomson A, Yamada G. Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochim Biophys Acta* (2014); 161-169.
9. Yanan H, Jingmei H, Yang L, Hao Y, Zheng L, Zuping H. The roles and regulation of sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* (2014); 29: 63-72.
10. Williams PL. *Reproductive Organs of the Male*. Gray's Anatomy 38th ed. (1995), New York:Livingstone.
11. Dacheux L, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* (2014); 147: 26-41.
12. Famiglietti G. Normal ultrasonographic anatomy and measurement of the scrotum. *Arch Ital Urol Androl* (2000) 72: 342-350.

13. Nguyen T, Etzel J, Turek P. Normal human ejaculatory duct anatomy: a study of cadaveric and surgical specimens. *J Urol* (1996); 155: 1639-1642.
14. Smith JF, Walsh T, Turek J. Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North* (2008); 35: 220-224.
15. Comhaire H, Mahmoud A, Depuydt CE, Zalata A, Cristophe B. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod* (1999); 5: 392-397.
16. Phillips E, Carpenter C, Oates RD. Ejaculatory dysfunction. *Urol Clin North* (2014); 41: 110-125.
17. Akbal C. Sperm Oluşumu ve Fizyolojisi. Türkeri L, Özer A, Narter F , İstanbul: Üroonkoloji Derneği Moleküler Üroloji Kitabı. (2012): 654-658.
18. McLachlan R., The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2000); 14: 342-361.
19. Liu PY, Handelsman J. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum Reprod Update* (2003); 9: 10-24.
20. Strasinger SK, Lorenzo MS. *Urinalysis and Body Fluid*. 4th ed. Philadelphia: F. Davis Company, (2001).
21. Brass M, Lens W, Piederiet MH. *Laboratory aspects of in vitro fertilization*. Organon Pres, (1996).
22. Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Pres. Ltd., (1994): 1061-1174.
27. Gonzales F, Kortebani G, Mazzolli AB. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril* (1992); 56: 1055-1064.
28. Jequier M, Crich J. *Semen analysis*. Blackwell scientific publications in USA. (1986); 1-15.
29. Alexander NJ. *Male evaluation and semen analysis in gynecology and obstetrics*. Saunders Michigan. (1983); 462-481.

- 30.** Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol* (2009); 5: 559-573.
- 31.** Gervan C, Young J. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome in males. *Presse Med* (2014); 43: 159-163.
- 32.** Emil A. Tanagho, Jack W. McAninch. *Smith Genel Üroloji*. Kazancı G. s.698-706, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, (2009).
- 33.** Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet* (2004); 367: 270-287.
- 34.** Gao X, Chen G, Huang J, Bai Q, Zhao N, Shao M, et al. Clinical, cytogenetic, and molecular analysis with 46, XX male sex reversal syndrome: case reports. *J Assist Reprod Genet* (2013); 30: 433-438.
- 35.** Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon CJ, et al. The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46, XX maleness. *J Clin Endocrinol Metab* (1993); 76: 690-694.
- 36.** Akbal C. Fertilizasyonun Moleküler Temeli. Türkeri L, Özer A, Narter F (editörler). İstanbul: Üroonkoloji Derneği Moleküler Üroloji Kitabı, (2012): 662-668.
- 37.** Wetzels AMM, Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/ Theory* (1996); 229-244.
- 38.** Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvarı. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, (2008); 227-259.
- 39.** Bunge RG, Sherman JK. Fertilization capacity of frozen human spermatozoa. *Nature London* (1953); 172:767-769
- 40.** Cıncık M. Sperm kriyoprezervasyonu. *Gülhane Tıp Dergisi*. (2003) ; 45: 100-106.

- 41.** Editör: Ateş Kadioğlu. Who Laboratuvar El Kitabı. 5. Basım, İstanbul, Nobel Yayıncılık, (2011); 169-174.
- 42.** Lovelock J. Denaturation of lipid protein complexes as a cause of damage by freezing. Proceedings of the Royal Society of the London, series B (1957); 147:426-438.
- 43.** Elder K. Dale B. İn-Vitro Fertilizasyon. 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti., (2013); 190-219.
- 44.** Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, (2008); 229-258.
- 45.** Wowk B. Leidl E. Rasch CM. Mesbah-Karimi N. Harris SB. Fahy GM. Vitrication enhancement by synthetic ice blocking agents Cryobiology (2000); 40: 290-35.
- 46.** Tunç L, Bozkırlı İ. Sperm Dondurma: Yardımcı Üreme Tekniklerindeki Uygulamalar, [www.androloji.org.tr/images/file/27. Pdf/ infertilit4.pdf](http://www.androloji.org.tr/images/file/27.Pdf/infertilit4.pdf), (2013).
- 47.** Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. Journal of Urology (2012); 33: 777-789.
- 48.** Singh AP, Rajender S. CatSper channel, sperm function and male fertility. Reproductive Biomedicine (2015); 30: 25-39.
- 49.** Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson A.C, Hsu S, Shi Q, Tilly J.L, Clapham D.E. A. Sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature (2001); 413: 604–608.
- 50.** Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. (2007); 104: 1210–1224.
- 51.** Carlson AE, Burnett LA, Camino D, Quill TA, Hille B, Chong JA, et al. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. (2009); 4: 6847.

52. Carlson E, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Babcock DF. CatSper1 required for evoked Ca^{+2} entry and control of flagellar function in sperm. *USA* (2003); 100: 14869–14871.
53. Bhilawadikar R, Zaveri K, Mukadam L, Naik S, Kamble K, Modi D, Hinduja I. Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate. *J Assist Reprod Genet* (2013); 30: 513-523.
54. Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod* (2007); 77: 37–47.
55. Ren D., Navaro B., Perez G, Jackson A.C, Hsu S, Shi Q, Tilly J.L, Clapham D.E. A. Sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* (2001); 413: 600–605.
56. Smith JF, Syrityna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y, Lishko PV. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca^{+2} channel in a CatSper2- deficient infertile patient. (2013); 110: 6821–6829.
57. Tamburino L, Marchiani S, Minetti F, Forti G, Muratori M, Baldi E. The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone induced acrozone reaction. *Human Reproduction* (2014); 29: 411-426.
58. Marquez B, Igotz G, Suarez SS. Contributions of extracellular and intracellular Ca^{+2} to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Dev Biol* (2007); 303: 215–224.
59. Avenaris MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LL, Kahrizi K, et al. Human male infertility caused by mutations in the Catsper1 channel protein. *Am J Hum Genet* (2009); 84: 504–510.

- 60.** Avidan N, Tamar H, Dany O, Cattan D, Ariento A, Thulliez M, et al. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J.Hum Genetics* (2003); 11: 496–501.
- 61.** Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone induced Ca influx in human sperm. (2011); 471: 380–385.
- 62.** D. Ren and J. Xia Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology*,(2010); 253: (165-75).
- 63.** H. Qi and M. Moran and B. Navarro and J. Chong and G. Krapivinsky and L. Krapivinsky and Yuriy Kirichok and I. Ramsey and T. Quill and D. Clapham, All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2007); 104: (1219 – 1223).
- 64.** T. Nishigaki and Ana Laura Gonzalez-Cota and Gerardo Jos, Orta Salazar, CatSper in Male Infertility, (2014) *Biology*, doi:10.1007/978-3-642-40282-1_34Corpus ID: 85735465).
- 65.** Timothy A. Quill, Sarah A. Sugden, Kristen L. Rossi, Lynda K. Doolittle, Robert E. Hammer, and David L. Garbers, Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization, *PNAS* December 9, 2003 vol. 100 no. 25 14869–14874.
- 66.** Xiang-hong Sun, Ying-ying Zhu, Lin Wang, Hong-ling Liu, Yong Ling, Zong-li Li & Li-bo Sun The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*; (2017), vol.15, Article no: 65.

10. EKLER

EK 1

İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Değerli katılımcı, sizi ‘‘ Sperm kriyoprezervasyonunun erkek infertilitesinde Catsper iyon kanal ekspresyonları üzerine etkilerinin immunofloresan yöntem uygulanarak incelenmesi’’ konulu araştırmaya katılmaya davet ediyoruz.

Söz konusu çalışma, bir yüksek lisans tez çalışmasıdır.

Bu Çalışmanın Amacı: CatSper membran kanalları, katyon kanalları olarak spermin kemotaksis hareketi, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu dahil olarak fizyolojisinde önemli bir yer almaktadır. Bu çalışmada semen analizi ile birlikte alınan örneklerde Katyon kanal analizi yapılacaktır. Ayrıca sperm dondurma ve çözme işleminin bu kanal proteinleri üzerine olumsuz etkilerinin varlığı araştırılacaktır.

Kullanılacak Yöntemler: Bu çalışmaya, 1.grup oligozoospermili vaka, 2.grup astenozoospermi vaka, 3.grup teratozoospermili vaka ve 4. Grup normospermili bireyler olarak toplam dört grup dahil edilecektir. Tüm gruplara standart semen analizi uygulanacaktır. Spermiyogram analizi sonrasında, her bir grubun aynı semen örneği 2’ye bölünüp, ½ semen örneğine kriyopreservasyon işlemi öncesi CatSper iyon kanal ekspresyon analizi için immunofloresan yöntem uygulanırken, diğer kalan ½ semen örneğine ise kriyopreservasyon işlemi sonrası immunofloresan yöntem uygulanacaktır.

Açıklamalar:

Bu çalışmaya katılmayı kabul ederseniz, sizin 20 dakikanızı alacak bir anketi cevaplamanız istenecektir. Elde edilecek tüm veriler anonim olup, tamamen gizli kalacaktır. Hiçbir veri başka bir formatta başka bir amaçla yayınlanmayacaktır. Veriler güvenli bir ortamda saklanacak ve sadece araştırmacı erişime sahip olacaktır. Herhangi bant kaydı veya yazılı metin kullanıcı tarafından çalışma tamamlandığında yok edilecektir.

Bu çalışmaya katılım gönüllüdür. Bu çalışmaya katılmak veya katılmamak, Yeni Yüzyıl Üniversitesi ile mevcut veya gelecekteki ilişkilerinizi etkilemez. Eğer katılmaya karar verirsiniz, istediğiniz zaman ayrılma hakkına sahip olup tüm verilerinizin tahrip edilmesini isteyebilirsiniz.

İletişim ve Sorular için lütfen Gen.Bio.Müh. Nergis Özlem Kılıç 'ın 0532 660 65 86 numaralı telefonu ile irtibata geçiniz.

Rıza Beyanı :

Yukarıdaki bilgileri okudum ve aydınlatıldım.

Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

İmza:

Tarih :

Araştırmacı İmzası:

Tarih :

ORİJİNALLIK RAPORU			
%3	%2	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ İNTERNET KAYNAKLARI		YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
docplayer.biz.tr			
İnternet Kaynağı			
Submitted to Marmara University			
Öğrenci Ödevi			
Submitted to Harran Üniversitesi			4/01
Öğrenci Ödevi			
Serkan Carkci, Ebru Onalan Eterm Seda Ozaydin, Ahmet Karakeci, Ahmet Tektemur, Tunc Ozan, İrfan Orhan. "Ion channel gene expressions in infertile men: A case-control study", International Journal of Reproductive Bioivmedicine, 2017			4/01
Yayın			
Submitted to Kocaeli Üniversitesi			
Öğrenci Ödevi			
İssuu.com			4/01
İnternet Kaynağı			

İssuu.com

İnternet Kaynağı

4/01

Submitted to Koc University

Öğrenci Ödevi

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

4/01

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

40/01

10 CAGILTAY, Eylem, Mustafa KAPLAN, İsmail YILMAZ, Murat TEREKECI, Ferhat DENİZ, Arif

YONEM, and Cihan TOP. "The Frequency of KISS1 Inactivating Mutation at Male Hypogonadotropic Hypogonadizm and Its Relationship with Hypothalamic- Pituitary-Gonad Axis", Gülhane Medical Journal, 2015.

Yayın

journals.plos.org

İnternet Kaynağı

4/01
