

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZUMO1 PROTEİNİNİN SPERM DEĞERLENDİRME
PARAMETRELERİYLE İLİŞKİSİNİN FERTİLİTE
STATÜSÜNE GÖRE İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SÜHEYLA ESRA ÖZKOÇER**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ÇİĞDEM ELMAS**

**ANKARA
MART 2018**

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZUMO1 PROTEİNİNİN SPERM DEĞERLENDİRME
PARAMETRELERİYLE İLİŞKİSİNİN FERTİLİTE
STATÜSÜNE GÖRE İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. SÜHEYLA ESRA ÖZKOÇER**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ÇİĞDEM ELMAS**

**ANKARA
MART 2018**

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ.....	1
2	GENEL BİLGİLER	3
2.1	Spermatogenez	3
2.1.1	Testis	3
2.1.2	Spermatogenez Aşamaları	4
2.2	Spermin Yapısı	10
2.3	Spermin Olgunlaşması	11
2.4	Sperm Kapasitesi	12
2.5	Fertilizasyon ve İzumo1	13
2.5.1	İzumo1 ve Juno	14
2.6	İnfertilite	15
2.6.1	Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi.....	15
2.6.2	İnfertilite Tedavisinde Sperm Kullanımı	17
3	GEREÇ VE YÖNTEM	21
4	BULGULAR	26
5	TARTIŞMA	47
6	SONUÇ	63
7	KAYNAKLAR.....	65
8	ÖZET	72
9	SUMMARY	74
10	EKLER.....	76
11	ÖZGEÇMİŞ	82

Tablolar Listesi

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımladığı normal semen parametreleri (25).....	16
Tablo 2: Yaş, semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, hareketli sperm ve ileri hareketli sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler.....	27
Tablo 3: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdesi ve baş, orta parça ve ana parça anomalisi izlenen sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler.	28
Tablo 4: Anilin mavisiyle boyanma özelliklerine göre değerlendirilen sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler.....	30
Tablo 5: Üç pozitif (İzumo1 ⁺ , CD46 ⁺ , DAPI ⁺) sperm ile tek pozitif (İzumo1 ⁻ , CD46 ⁻ , DAPI ⁺) sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler.....	40
Tablo 6: Tüm evrende normal morfoloji gösteren, baş anomalisi görülen, anilin mavisiyle boyanmayan, üç pozitif (İzumo1 ⁺ , CD46 ⁺ , DAPI ⁺) ve tek pozitif (İzumo1 ⁻ , CD46 ⁻ , DAPI ⁺) sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler	41

Resimler Listesi

Resim 1: Spermac boyasıyla morfoloji değerlendirmesine ilişkin örnekler (A-B, 1000x).	29
Resim 2: Asidik anilin mavisi boyama örnekleri (A-F, 1000x).	32
Resim 3: İmmü floresans inceleme örneği (A-D, 1000x).	34
Resim 4: İmmü floresans inceleme örneği (A-D, 1000x)	35
Resim 5: İmmü floresans inceleme örneği (A-D, 1000x)	36
Resim 6: İmmü floresans inceleme örneği (A-D, 1000x).	37
Resim 7: İmmü floresans inceleme örneği (A-D, 1000x)	38
Resim 8: İmmü floresans inceleme örneği (A-D, 1000x)	39

Grafikler Listesi

Grafik 1: Yaş (A), semen hacmi (B), sperm konsantrasyonu (C), toplam sperm sayısı (D), hareketli sperm yüzdeleri (E) ve ileri hareketli sperm yüzdelerinin (F) gruplar arasındaki farkları.	28
Grafik 2: Normal morfoloji gösteren (A), baş anomali görülen (B), orta parça anomali görülen (C) ve ana parça anomali görülen sperm yüzdelerinin (D) gruplar arasındaki farkları.	29
Grafik 3: Anilin negatif (A), anilinle kısmen boyanan (B) ve anilinle tamamen boyanan (C) sperm yüzdelerinin gruplar arasındaki farkları.	31
Grafik 4: Üç pozitif (İzumo1 ⁺ , CD46 ⁺ , DAPI ⁺) (A) ve tek pozitif (İzumo1 ⁻ , CD46 ⁻ , DAPI ⁺) (B) sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	40
Grafik 5: Anilin negatif sperm yüzdesinin, normal morfoloji ve baş anomali yüzdeleriyle ilişkisini gösteren grafikler.	42
Grafik 6: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdeleriyle üç pozitif (İzumo1 ⁺ , CD46 ⁺ , DAPI ⁺) ve tek pozitif (İzumo1 ⁻ , CD46 ⁻ , DAPI ⁺) sperm yüzdeleri arasındaki ilişkileri gösteren grafikler.	43
Grafik 7: Baş anomali görülen sperm yüzdeleriyle, üç pozitif (İzumo1 ⁺ , CD46 ⁺ , DAPI ⁺) ve tek pozitif (İzumo1 ⁻ , CD46 ⁻ , DAPI ⁺) yüzdeleri arasındaki ilişkileri gösteren grafikler.	44
Grafik 8: Anilin mavisıyla boyanmayan sperm yüzdeleriyle, üç pozitif (İzumo1 ⁺ , CD46 ⁺ , DAPI ⁺) ve tek pozitif (İzumo1 ⁻ , CD46 ⁻ , DAPI ⁺) yüzdeleri arasındaki ilişkileri gösteren grafikler.	46



**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı**

Adı ve Soyadı	Süneyla Esra Özkoçer
Baba Adı	Ali
Doğum Yeri/Tarihi	Sarısuni/ 13.07.1989
Diploma Tarihi / Diploma No	27.06.2013/ 13.392.048
Mezun Olduğu Fakülte	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 3 (Üç) Ay: 8 (Sekiz)
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Izumo1 Proteininin Sperm Değerlendirme Parametreleriyle İlişkisinin Fertile Statüsüne Göre İncelenmesi

JÜRİ KARARI:

Aday tezi başarı ile savunmuş, başarı ile geçmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ


ÜYE
Prof. Dr. Çiğdem ELMAS


BAŞKAN
Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL


ÜYE
Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, mesleki bilgisiyle, sabrıyla, bitmeyen yaşam enerjisiyle yanımda olan; tezimin her aşamasında yaptığı bütün bilimsel katkıların yanı sıra manevi desteğiyle zorlukları aşmamı sağlayan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, danışman hocam Prof. Dr. Çiğdem Elmas'a, engin bilgisi, zarif, özenli ve adaletli tavrıyla her zaman destek olan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Candan Özoğul'a, bilgilerini ve deneyimlerini cömertçe paylaştan hocalarım Prof. Dr. Gülnur Take Kaplanoğlu ve Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na, teşekkür ederim. Milli değerlere sahip çıkarak evrensel değerlere ulaşmayı, yılmadan çalışmayı ve araştırmayı öğrettikleri, mesleğimi aşkla yapmamı sağladıkları için bütün hocalarıma minnettarım. Çalışmalarım süresince her sıkıştığım da yardımına koşan, tezimi tamamlamam için desteğini eksik etmeyen Dr. Cemile Merve Seymen ve asistanlığım süresince çalışkanlığıyla örnek, dostluğuyla destek olan Dr. Duygu Dayanır başta olmak üzere tanımayı ve birlikte çalışmayı şans olarak gördüğüm tüm asistan arkadaşlarıma, bir eğitim ve araştırma kurumunu benim için yuvaya çeviren Gazi Histoloji ve Embriyoloji ailesinin tüm üyelerine teşekkür ederim. Bir fikrin teze dönüşmesi sürecinde yardımlarını esirgemeyen Op. Dr. Aslı Öcal ve Uzm. Dr. İskender Kaplanoğlu'na çok teşekkür ederim.

Son olarak kişisel kahramanlarım, her zaman yanımda olan aileme; Nuray Savari, Ali Savari, Mehmet Utku Savari, Selma Özkoçer, Hüseyin Özkoçer ve Selen Filizgök'e teşekkür ederim. Eşim Özkan Özkoçer ve oğlum Aras Özkoçer'e özverileri ve varlıklarının verdiği güç için teşekkür ederim.

KISALTMALAR

- An: Anneksin V
- ASA: Anti-Sperm Antikoru
- BSA: Sığır Serum Albümini; Bovine Serum Albumine
- cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat
- CatSper: Sperm Katyon Kanalı
- CD46: Kompleman Düzenleyici Protein 46
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DFİ: DNA Kırılma İndeksi
- DNA: Deoksi Ribonükleik Asit
- DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
- FSH: Folikül Uyarıcı Hormon
- GDNF: Glial Hücre Hattı Kaynaklı Nörotrofik Faktör; Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor.
- GFR α 1: GDNF Aile Reseptörü Alfa 1; GDNF Family Receptor α 1.
- ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu; Intra Cytoplasmic Sperm Injection.
- IMSI: İntrasitoplazmik Morfolojiye Göre Seçilmiş Sperm Enjeksiyonu; Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection
- IUI: İntra Uterin İnseminasyon, Intra Uterine Insemination
- IVF: İn Vitro Fertilizasyon
- LINC: Nükleoiskelet ve Sitoiskelet Bağlayıcı Protein; Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton.

- M: Molar
- mg/ml: miligram/ mililitre
- mmol/L: milimol/ Litre
- ml: mililitre
- μ M: mikromolar
- μ l: mikrolitre
- nM: nanomolar
- PBS: Fosfat Tamponlu Salin; Phosphate Buffered Saline
- PI: Propidium İodide
- PICSİ: Fizyolojik İnterasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu; Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection.
- Plzf: Promiyelositik lösemi çinko parmak; Promyelocytic leukemia zinc finger)
- RNA: Ribo Nükleik Asit
- SKH: Spermatogenik Kök Hücreler
- v/v: hacim/ hacim; volume/ volume
- ZP: Zona Pelusida Sperm Bağlanma Proteini

1 GİRİŞ

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından çiftte ait bir sorun olarak tanımlanır. Gelişmiş ülkelerde her on çiftten birini etkilediği düşünülmektedir. Tedavi yöntemlerinin yaygınlaşmasıyla bazı ülkelerde, in vitro fertilizasyonla doğan bebekler, yenidoğanların %4'ünü oluşturmaktadır. İnfertiliteyi çözmek için yapılan işlemler yeni nesillerin oluşmasını sağladığı için insanın evrimsel sürecine en doğrudan müdahaleleri oluşturmaktadır. Fertilizasyon ve implantasyon, pek çok mekanizmayla doğal seçilimi gerçekleştirir. İn vitro fertilizasyonla, bu süreçler ve doğal seçim etkilenmektedir (1).

İzumo1 proteini spermde bulunan, akrozom reaksiyonu gerçekleşikten sonra sperm yüzeyinde görülen ve spermin oosite tutunmasını sağlayan bir proteindir. Eksikliğinde ya da işlevi bozulduğunda fertilizasyonun engellenmesi, İzumo1 proteinini hayvan deneylerinde cinsiyete özgü infertiliteyle ilişkilendirmiştir (2).

Fertilizasyon ve implantasyon hakkında bilinenler, infertilite şikayetiyle başvuran çiftlere, şikayetlerinin nedenini ve çözümünü açıklamak için yeterli olmamaktadır. Semen analizinde değerlendirilen parametrelerin normal olduğu erkeklerde, sperm genetik materyalini, reaktif oksijen türlerini ya da sperm işlevini değerlendirmeye yönelik testlerle tanı koymaya çalışılmaktadır. Fizyolojik süreçlerin aydınlatılmasıyla, tanı ve tedavi yöntemleri geliştirilebilir (3, 4).

İzumol proteininin fertilizasyondaki önemi düşünülerek planlanan bu çalışmanın amacı; açıklanamayan infertilite şikayetiyle başvuran erkek hastalarla, fertilizasyon sorunu olmayanların spermeleri arasında, akrozom reaksiyonu sonrasında İzumol proteininin ifadenmesindeki farkı araştırmaktır. İkincil amaçlar ise semen analiziyle değerlendirilen parametreler ile sperm kromatin yoğunlaşmasının, CD46 ve İzumol protein ifadenmeleri ile ilişkisini göstermektir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Spermatogenez

Erkek üreme hücresi (gamet) olan sperm üretimine spermatogenez denir. Spermatogenez, erkek üreme sistemi organları içerisinde gerçekleşir. Erkek üreme sistemi organları; testis, kanal sistemini oluşturan yapılar, salgı bezleri ve penisten oluşur (5).

2.1.1 Testis

Testisler; skrotum içine yerleşmiş oval şekilli bir çift tübüloalveolar, birleşik tipte salgı bezidir. Abdominal kavite dışında yerleşmiş olması spermatogenez için gerekli 34-35°C'lik sıcaklığın sağlanması için gereklidir (5).

Testisler dışardan tunika albuginea adı verilen bağ dokudan bir kılıfla çevrilidir. Bu kılıfın iç kısmında kan damarları içeren gevşek bağ dokusu, tunika vasküloza bulunur. Rete testisin bulunduğu mediastinum bölgesinde kalınlaşan bağ dokusu kapsül organın içine doğru girerek oluşturduğu fibröz septalarla organı 250-300 lobüle böler. Her lobül 1-4 arasında değişen seminifer tübül içermektedir (5, 6).

Seminifer tübüller yaklaşık 150 µm çapında ve 80 cm uzunluğunda, iki ucu rete testise açılan “U” şeklinde kanal yapısındadır. Seminifer tübül epiteli, Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerden oluşan özel bir çok katlı epitel yapısındadır. Tunika propriya özel bir bağ dokusu yapısındadır. Seminifer tübülleri çevreleyen bazal lamina, miyoid hücreler ve kollajen fibrillerden zengin bir bağ dokusu ile çevrilidir (5, 6).

Sertoli hücreleri, spermatogenez için fonksiyonel ve metabolik desteği sağlayan prizmatik şekilli hücrelerdir. Puberteye kadar seminifer epitelin baskın hücre tipidir ve yaşlanmayla birlikte spermatogenezin azalması ile tekrar bu özelliklerini geri kazanırlar. Puberteden sonra mitoz bölünme gerçekleştirmezler. Çekirdek hücrenin bazaline yerleşmiştir ve büyük çekirdekçik izlenir. Çekirdekçik yanlardan karyozom adı verilen kendine has üç parçalı yapıda, RNA ve DNA içeren cisimcik çifti tarafından kuşatılmıştır. Sertoli hücreleri arasındaki yan yüz bağlantılarıyla **kan testis bariyeri** oluşur ve epitel bazal ve luminal kompartmana ayrılır. Kan testis bariyeri, zonula okludens, makula adherens ve oluklu bağlantılar gibi yan yüz bağlantıları içerir. Sertoli hücrelerinin yan yüzlerinde bulunan girintilerde spermatogenik hücreler yerleşiktir (5-7). Sertoli hücrelerinin seminifer tübül sıvısını salgılamak, fagositoz yapmak gibi görevleri de bulunmaktadır. Germ hücrelerinin sayısının sınırlandırılması Sertoli hücrelerinin görevidir ve türe özgüdür. Spermatogenezin hormonal kontrolü Sertoli hücreleriyle sağlanır (5, 6, 8).

2.1.2 Spermatogenez Aşamaları

Spermatogenez; mitoz bölünmelerin gerçekleştiği **spermatogonyal aşama**, mayoz bölünmenin gerçekleştiği **spermatosit aşaması** ve spermatidlerin olgun sperm hücrelerine farklılaştıkları **spermatid aşaması** olmak üzere üç aşamada incelenebilir (6).

2.1.2.1.1 Spermatogonyal Aşama

Seminifer tübül epitelinde kalıcı hücre popülasyonunu oluşturan Sertoli hücrelerinin yanı sıra spermatogenik hücreler bulunur. Puberteyle birlikte

primordial germ hücrelerinden köken alan spermatogenik kök hücreler (SKH) mitoz bölünmeyle çoğalırlar. Spermatogenik hücre dizisinin ilk hücresi **spermatogonyumlardır**. Spermatogonyumlar bazal membranın hemen üstünde, kan testis bariyerinin dışına yerleşirler. Tip A ve tip B olmak üzere iki ana sınıfta incelenirler (5, 6).

Tip A spermatogonyum: Oval ökromatik çekirdek, çekirdek zarına tutunmuş çekirdekçik içerir. Çekirdeğin koyu ya da açık olmasına göre **tip A koyu** ya da **tip A açık** olarak alt sınıflara ayrılır. Tip A koyu spermatogonyumların spermatogenik kök hücreler olduğu düşünülmektedir. Farklanmamış tek spermatogonyum $A_{s(single)}$ olarak adlandırılır ve $ID4^+$, $BMI1^+$, $PAX7^+$ olarak belirlenir. Mitoz bölünmeyle çoğaldıkça önce çift $A_{p(paired)}$ sonra sıralı $A_{a(aligned)}$ olarak adlandırılır (5, 6, 9).

Tip B spermatogonyum: Yuvarlak çekirdek, çekirdek zarıyla ilişkili heterokromatin alanlar, merkezi çekirdekçik görülür (5).

Spermatogenezin uzun yıllar devam etmesi kök hücre havuzunun sürekliliğinin sağlanması ile oluşur. Üretilen sperme karşılık kök hücrelerin de sayıca artması gerekir. Bu denge moleküler düzenlemelerle gerçekleşir. Spermatogenik kök hücrelerin c-kit tirozin kinaz reseptörüne, Sertoli hücresinden salgılanan kök hücre ligandı (stem cell ligand) bağlanarak kök hücrelerin farklanmasını uyarır. Kök hücrede c-kit tirozin kinaz reseptörü gen ekspresyonu, promiyelositik lösemi çinko parmak (**Plzf**: Promyelocytic leukemia zinc finger) transkripsiyon faktörü ile baskılanır ve kök hücre yenilenmesi engellenir. Retinoik asit, Plzf transkripsiyon faktörünü baskılayarak yenilenme sürecini başlatır.

Spermatik kök hücrelerde retinoik asit- Plzf üzerinden sağlanan c-kit gen ifadelenmesinin düzenlenmesi **otoregülatuvar yolak** olarak adlandırılır. Folikül uyarıcı hormon (FSH: follicle stimulating hormon), Sertoli hücrelerinden, Glial hücre hattı kaynaklı nörotrofik faktör (**GDNF**: Glial cell line-derived neurotrophic factor) salgılatır. GDNF, spermatogenik kök hücrelerdeki GDNF aile reseptörü $\alpha 1$ (**GFR $\alpha 1$** : GDNF family receptor $\alpha 1$) reseptörüne bağlanır. GFR $\alpha 1$ ilişkili RET'in intrasellüler parçasında gerçekleşen fosforilasyonla spermatogenik kök hücre farklılaşması uyarılır. Sertoli hücresiyle düzenlenen GDNF- GFR $\alpha 1$ - RET ve kök hücre ligandı- c-kit reseptörü ilişkileri **parakrin yolak** olarak adlandırılır (5).

2.1.2.1.2 Spermatosit Aşaması

Tip B spermatogonyum, son mitoz bölünmeyi gerçekleştirdikten sonra oluşan yavru hücreler, DNA sentez (S) fazını tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz fazına girer. Primer spermatositler birinci mayoz bölünmeyi gerçekleştirecek olan hücrelerdir. Spermatositler; seminifer tübülün adluminal kompartmanında, yerleşirler. Mayoz bölünme kan testis bariyerinin içinde gerçekleşir. Birinci mayoz bölünme tamamlandıktan sonra oluşan yavru hücreler sekonder spermatosit adını alırlar. Sekonder spermatositler DNA sentezi olmadan ikinci mayoz bölünmeyi gerçekleştirirler. Her sekonder spermatositten iki spermatid oluşur (5, 10).

2.1.2.1.3 Mayoz Bölünme

Eşeyli üreme pek çok ökaryotik canlının genetik çeşitliliğini sağlayan mekanizmadır. Mayoz bölünme çeşitliliğin sağlanması için ilk adımdır. Sentez (S) aşamasında DNA miktarını ikiye katlayan hücre, G2 (Gap 2) aşamasını

tamamlayıp mayoz bölünme evresine ulaşır. Birinci mayoz bölünmenin yaklaşık 10 gün süren uzun bir profaz evresi vardır. Profazın alt evreleri **leptoten**, **zigoten**, **pakiten**, **diploten**, **diakinez** olarak sıralanır. Leptoten evresinde, iki kardeş kromatid içeren kromozom çiftleri, çekirdek zarına tutunmuş ipliksi görünümündedirler. Zigoten evresinde, homolog kromozomlar arasında çekirdek zarına bağlı kısımlardan başlayarak sinaptonemal kompleksler oluşur. Pakiten evresinde, sinaptonemal kompleks tüm homolog kromozom boyunca tamamlanır. Kardeş olmayan kromatidler arasında parça değişimi (crossing-over) gerçekleşir. Diploten evresinde sinaptonemal kompleksler ayrılır. Diakinez evresinde ise kromozomlar birbirinden uzaklaşır. Uzun profaz evresini izleyen metafaz, anafaz ve telofaz evreleriyle birinci mayoz bölünme tamamlanır ve yavru hücreler oluşur. İkinci mayoz bölünme için DNA üretimi sadece hasar onarımı için gereklidir. Kardeş kromatidler birbirinden ayrılarak haploid yapıda yavru hücreler oluşur. Kardeş olmayan kromatinler arasındaki genetik materyalin değişimi, maternal ve paternal kromozomların yavru hücrelere rastgele dağıtılması genetik çeşitliliği sağlayan yollardır (2, 5).

2.1.2.1.4 Spermatid aşaması

Spermatidler hücre bölünmesi gerçekleştirmezler, morfolojik değişimler geçirirler. Haploid spermatidler Sertoli hücresinin sitoplazmasındaki nişlerde **erken (yuvarlak) spermatid** ve apikal yüzündeki derin invajinasyonların oluşturduğu kriptalarda bulunan **geç (elonge) spermatid** olarak ikiye ayrılır. Spermiyasyon, Sertoli hücrelerinin apikal yüzeyinde olgun spermatidin başını çevreleyen bölgede bulunan F- aktin içeren halkalar ile spermatidlerin lümene

itilmesidir. Spermatidler çekirdeğin karşıt kutuplarında konumlanmış Golgi-akrozom- akroplakzom kompleksi ve bağlantı parçası nedeniyle oldukça polarize hücrelerdir. Spermatogenezin son aşaması olan **spermiyogenez**, meydana gelen dört temel değişimle olgun spermatidlerin oluşmasını sağlar (5).

Akrozom gelişimi: Hidrolitik enzimler içeren akrozom dört evrede oluşur. **Golgi** evresinde, hiyalüronidaz, proakrozin ve diğer hidrolitik enzimleri içeren proakrozom vezikülleri, Golgi organından akroplakzoma, mikrotübüller ve aktin mikrofilamentleri üzerinde, motor proteinler aracılığı ile taşınırlar. Akroplakzom çekirdek zarı ilişkili aktin- sitokeratin içeren iskelet tabakasıdır. Proakrozomal veziküller burada birbirlerine bağlanarak önce akrozomal vezikülü sonrasında akrozomal keseyi oluştururlar. **Başlık** evresinde, büyüyen akrozomal kese uzayan çekirdekle paralel olarak kaudal inişini başlatır. Akroplakzom, keratin ara filamentlerini içeren desmozom benzeri marjinal halka ile çekirdek zarına bağlıdır. Bu bağlantıyla akrozomun dar iniş girintisi desteklenir ve akrozom başlık şeklini alır. Spermiyogeneze özgü nükleoiskelet ve sitoiskelet bağlayıcı protein (**LINC**: for linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) ile yoğun çekirdek laminası ile akroplakzomun F-aktin proteinleri bağlanır. **Akrozomal ve olgunlaşma** evresinde akrozom- akroplakzom uzayan sperm başına uygun şekil alır (5, 11).

Manşet gelişimi: Akrozom gelişiminin başlamasından sonra akrozom-akroplakzom kompleksinin kaudal kısımda mikrotübül içeren bir manşet gelişmeye başlar. Marjinal halkanın kaudalinde perinükleer halka bulunur. Perinükleer halkadan kaudale doğru uzanan mikrotübüller, organellerin

düzenlenmesinde ve motor proteinlerle birlikte intraflajellar iletimde rol oynarlar. Sperm başını çevreleyen Sertoli hücrelerinde bulunan F-aktin ve mikrotübüllerle sperm başının uzaması gerçekleşir. Bu sistemde oluşan hatalar sperm baş anomalileriyle sonuçlanır (5, 12).

Kuyruk gelişimi: Sentirol çiftinin, çekirdeğin Golgi kutbundan karşıya doğru göçüyle kuyruk gelişimi başlar. Distal sentiolden kuyruğun aksonemi gelişirken, proksimal sentirol ve perisentirol matriks bağlantı parçasını oluşturur. Bağlantı parçası spermin dalga benzeri hareketiyle oluşan mekanik stresten etkilenen kısımdır. (5)

Çekirdek kromatininin yoğunlaşması ve çekirdeğin şekillenmesi: Somatik histon proteinlerinin, arjinin ve lizinden zengin protaminlerle değişmesi sonucu DNA'nın sabitlenmesi ve korunması sağlanır. Spermlerde protaminin az olması DNA bütünlüğünün ve canlılığın azalmasıyla korelasyon gösterir. Çekirdek kromatininin yoğunlaşmasından sonra RNA transkripsiyonu olmaz (5, 13).

Spermatidin olgunlaşma sürecinde mitokondriler, dış yoğun fibrillerle çevrili aksonemin proksimal kısmına yerleşirler. Çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını tamamlar. Manşet distale doğru uzanarak ayrılır. Sitoplazmanın fazla kısmı (rezidüel cisim) Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilmek üzere salınır. Olgunlaşma sürecini tamamlayan spermlerin seminifer tübül lümenine salınması spermiasyon olarak adlandırılır. Spermiasyon için spermatidleri bağlayan sitoplazmik köprüler ayrılır. Spermler, adezyon moleküllerinin yıkılması ve hücre iskeleti bağımlı mekanizmalarla Sertoli hücrelerinin apikal kriptlerinden ayrılırlar.

Bu spermiler pasif hareketle duktus epididimise geçerler ve burada ileri hareket yeteneği kazanırlar (5, 12).

2.2 Spermin Yapısı

Olgun sperm baş, kuyruk ve bağlantı parçasından oluşur. Bu yapılar hücre zarıyla çevrilidir. Baş; uzun ve yoğun bir çekirdek ve çekirdeğin ön yarısını kaplayan akrozomdan oluşur. Akrozom, proteaz, hyaluronidaz, asit fosfataz gibi hidrolitik enzimleri içerir ve akroplakzomla çekirdek zarına tutunur. Akrozom, anterior akrozom ve posterior akrozom (ekvatoryal bölge) olarak iki bölgeye ayrılır. Akrozomun altında kalan kısım postakrozomal bölge olarak isimlendirilir. Sperm yüzeyinden çekirdeğe doğru hücre zarı, dış akrozom zarı, iç akrozom zarı ve çekirdek zarı olmak üzere dört zar yapısı görülür. Bağlantı parçası, sentriol çiftinden oluşur. Proksimal sentriol bağlantı parçasını çekirdek zarına bağlarken distal sentriol aksonemi oluşturur. Bağlantı parçası, fiziksel bağlantı sağlamasının yanında miyozinle ilişkili protein bağlantıları sayesinde sperm hareketinde etkilidir. Kuyruk; orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere bölümlere ayrılır. Orta parça, sarmal düzenlenmiş mitokondriler, dış yoğun fibriller ve aksonemi içerir. Ana parça, kuyruğun en uzun kısmıdır. Merkezdeki aksonemi çevreleyen dış yoğun fibriller ve fibröz kılıftan oluşur. Dış yoğun fibriller orta parçada dokuz, ana parçada yedi adettir. Fibröz kılıf, uzunlamasına iki kolon ve kolonlarla ilişkili ortak merkezli yarı halkalardan oluşur. Dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf spermin ileri hareketi sırasında sağlam bir yapı iskelesi olarak görev yapar. Kuyruğun son kısımda sadece aksonem görülür (5, 11, 12).

Testislerde üretilen spermin fertilizasyonu gerçekleştirebilmesi için epididimiste olgunlaşma ve dişi genital kanalda kapasitasyon süreçlerini tamamlaması gerekir (14).

2.3 Spermin Olgunlaşması

Spermin olgunlaşması; epididimiste morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik değişimler geçirerek ileri hareket yeteneği kazanmasıdır. Epididimis uzun kıvrımlı bir tüp yapısında olup dört ana bölümde incelenir: Başlangıç, baş, gövde ve kuyruk. Başlangıç kısmı kemirgenlerde belirginken insanda ayırt etmesi güçtür. Epididimisin farklı bölümlerinde, protein düzenlenmesinin ve lümendeki iyon konsantrasyonlarının değişmesi olgunlaşma için önemlidir. Epididimisin baş bölümünde görülen spermler olgunlaşmalarını tamamlamamışlardır. Kuyruk bölümünde ise olgunlaşmış olarak izlenirler. İnsan ve diğer memelilerde yapılan çeşitli araştırmalarda epididimisin baş ve kuyruk bölümünden alınan spermlerde morfolojik, proteomik, glikokaliks yapısı, sinyal yollarının uyarılması gibi farklılıklar görülmüştür. Morfolojik değişime neden olan sitoplazmik damlacıkların kuyruğun orta parçasından kaudale göçü enerji metabolizması ve iyon homeostazı açısından önemlidir. Epidimozom adı verilen veziküllerle, epididimis epitelinden sperme protein, lipid, RNA aktarımı yapılır ve bu veziküllerin içerikleri epididimisin bölgelerine göre değişim gösterir. Olgunlaşma sırasında sperm hücre zarında şeker ve lipid profilinde görülen değişimlere bağlı olarak zar akışkanlığı artmaktadır. Doymamış yağ oranındaki artış nedeniyle oksidatif strese karşı daha hassas olurlar. Sperm testisten ayrıldıktan sonra protein sentezi yapmaz. Bu nedenle protein yapısındaki değişimler post-translasyonel

yöntemlerle düzenlenir. Protein fosforilasyonu ile fertilizasyon için gerekli basamakların düzenlenmesi mümkündür. Fosfataz inhibitörleri ve cAMP gibi fosforilasyon yollarını etkileyen farmakolojik ajanlarla, spermde kuyruk hareketinin in vitro ortamda sağlanması olgunlaşmada sinyal yollarının önemini göstermektedir. Olgunlaşmanın tamamlanmaması kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon gibi basamakları da etkilemektedir (14, 15).

2.4 Sperm Kapasitasyonu

Kapasitasyon dişi genital kanallarında gerçekleşen spermin yapısında oluşan biyokimyasal değişikliklerdir. İnseminasyon sonrası dişi üreme kanalında ilerleyen spermiler isthmusa kadar diğer hücrelerle temas etmeden ilerlerler. Bu şekilde dişi bağışıklık sisteminden kaçarak. İsthmusa ise epitelle ilişki kurarak geçici bir rezervuar oluştururlar. Dişi genital kanal sıvılarıyla, sperm hücre zarında bulunan glikoproteinler ayrılır. Zarın akışkanlığını azaltan kolesterol oksidasyon yoluyla hidrofilik hale getirilir ve albümin gibi taşıyıcılarla zardan uzaklaştırılır. Hücre zarındaki değişikliklere bağlı olarak bikarbonat iyonlarının sperm içine girişiyle adenil siklaz aktivitesi artışı gerçekleşir ve cAMP seviyesi artar. Tirozin fosforilasyonu gerçekleşir. Sperm zarının kalsiyum geçirgenliği artar. Ana parçada bulunan pH bağımlı katyon kanallarıyla (**CatSper**) hücre içine doğru kalsiyum akışı başlar ve bu akım spermin baş kısmına doğru devam eder. Spermin asidik hücre içi pH'sı (6,5) voltaj bağımlı proton kanallarından hücre dışına proton atılmasıyla alkali (7,4) hale gelir ve kapasitasyon tamamlanır. Zonaya tutunma reseptörleri kapasitasyonun tamamlanmasıyla sperm yüzeyine çıkar. Hücre içi kalsiyum artışı ekzositozu uyarak akrozom reaksiyonunu

başlatır. Alkalizasyon, sıkıca paketlenmiş kromatinin çözülmesini ve hiperaktivasyonu sağlar. Hiperaktivasyon, kuyruğun simetrik düşük genlikli hareketten, yüksek genlikli asimetrik hareketlere geçmesi olarak tanımlanır. Ovulasyona ilişkin sinyallerin ulaşmasıyla spermiler hiperaktif olurlar ve rezervuardan ayrılırlar. Folikül hücrelerinden salgılanan bir hormon olan progesteron spermiler için ovulasyon sinyallerinden biridir. Progesteron, Catsper reseptörlerinin duyarlı hale gelmeleri ve hücre içi kalsiyum artışının sağlanması ile kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyon gibi süreçlerde rol oynar. Progesteron bir kemoatraktan olarak spermin fertilizasyon için oosite yönelmesini sağlar (5, 14, 16, 17).

2.5 Fertilizasyon ve İzom1

Fertilizasyon spermin oosite birleşerek zigot oluşturmasıdır. Spermilerin oosite ulaşmak için kumulus hücrelerini ve zona pellusidayı geçmeleri gerekir. Kumulus hücreleri arasında kuyruk hareketiyle ilerleyen spermiler akrozom reaksiyonu ile enzimatik olarak hücreler arası bağları yıkarlar. Kapasitasyon sırasında gerçekleşen hücre içi kalsiyum artışı sonrası akrozomun dış zarı hücre zarıyla birleşerek akrozomal enzimlerin ekzositozu gerçekleştirilir. Hiyalüronidaz korona radiatada bulunan kumulus hücrelerinin arasında bulunan matriksi yıkar. Oosit çevresinde mikrofilamentlerin kovalent olmayan bağlarla oluşturduğu ağı yapı spermin tutunmasını sağlayan glikoproteinler içerir. Farelerde bulunan ZP1, ZP2, ZP3 glikoproteinlerine ek olarak insanda ZP4 glikoproteini bulunmaktadır. Spermin ZP3'ün O-oligosakkaritine bağlanmasıyla akrozinin salgılanır. ZP3 türe özgü bağlanmayı kontrol eder. Fertilizasyon sonrası oosite hücre içi kalsiyum

artışı gerçekleşir. Oosit periferinde yer alan kortikal granüller ekzositozla ovastasin proteazını salgırlar. Kortikal reaksiyon olarak adlandırılan bu olay ZP3'ten oligosakkaritlerin ayrılmasını ve ZP2'nin parçalanmasıyla yeni spermilerin zona pelusidaya tutunmasını engeller (2, 5, 11).

Akrozom reaksiyonu, anterior akrozomda dış zar ve hücre zarının birleşmesiyle gerçekleşir. Ekvatoryal segment reaksiyona katılmaz. Bu nedenle akrozomal reaksiyon için kullanılan bazı belirteçler, süreç içinde farklı alanlarda gözlenir. Kompleman düzenleyici protein 46 (CD46), tip 1 zar glikoproteinidir. Spermde iç akrozom zarında yerleşmiştir ve akrozom reaksiyonu belirteci olarak kullanılır. CD46 akrozom stabilizasyonu sağlayarak kendiliğinden gerçekleşen akrozom reaksiyonunu azaltır. Anti-CD46 antikorları insan sperminin zona penetrasyonunu azaltır (11, 18).

2.5.1 İzumo1 ve Juno

Akrozom reaksiyonu sonrası zonayı geçen sperm zarı oosit zarına tutunur. Bu tutunma sperm İzumo1 ve oosit Juno proteinleri ile gerçekleşir (11).

İzumo1, ismini Japon evlilik tapınağından alan bir transmembran proteinidir. İzumo1 yapısal olarak; IZUMO parçası, immunglobulin benzer ekstrasellüler kısım ve kısa sitoplazmik kuyruktan oluşur. N-terminalde bulunan IZUMO parçası α -heliks yapısıyla sperm oosit adezyonundan sorumludur (19). Epididimiste post-translasyonel modifikasyon olarak İzumo1 fosforilasyonu gerçekleşir (20). İzumo1 akrozom reaksiyonunu gerçekleştiren spermin açığa çıkan iç akrozom zarında görülür (11). İzumo1'in akrozom reaksiyonu sonrasındaki yerleşimi apikal bölgeden ekvatoryal segmente doğru yayılan

dinamik bir olaydır (21). Oosit yüzeyinde bulunan Juno, İzumo1 reseptörüdür ve folat reseptör ailesinin üyesidir. İzumo1 ve Juno birleşerek zar füzyonunu başlatır. Sperm oosit füzyonu ekvatoryal segmentten başlar, oosit sitoplazmasına alınarak internalizasyonla tamamlanır (22). Sperm spesifik fosfolipaz C zeta (PLC ζ) ile oositte kalsiyum dalgalanması oluşur. Kalsiyum dalgalanması sonrasında oosit ikinci mayoz bölünmesini tamamlar. Sperm protaminleri oositte gelen histonlarla yer değiştirir. Kortikal granüller ekzositozla kortikal reaksiyonu gerçekleştirir. Juno ve İzumo1 veziküllerle perivitellin aralığa dağılarak polispermiyi önlemeye yardımcı olur (5, 23).

2.6 İnfertilite

Dünya Sağlık Örgütü infertiliteyi, bir yıl korunmasız cinsel ilişki sonrası gebeliğin oluşmaması olarak tanımlar. Çiftlerin yaklaşık %15'i ilk bir yılda gebelik oluşturamaz. Tanı için yapılan rutin incelemelerde çiftlerin %10-15'inde infertiliteyi açıklayacak neden bulunamazken (açıklanamayan infertilite), geri kalan kısımda erkeğe ilişkin faktörler %45-50'yi oluşturur (24).

2.6.1 Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Erkek infertilitesi değerlendirilirken öykü ve fizik muayene sonrası uygulanan ilk test semen analizidir. Semen en az iki en çok yedi günlük cinsel perhiz sonrası tercihen mastürbasyonla toplanarak değerlendirilir. Cinsel perhiz süresinin kısa olması sperm sayısının, uzun olması ise sperm hareketliliğinin azalmasına neden olur. Semen değerlendirilmesinin yapılması için beş ile otuz dakika arası oda sıcaklığında ya da inkübatörde likefiye olmalıdır (sıvılaşmalıdır). Semen likefiye olması prostat salgılarına, koagüle olması ise seminal vezikül

salgılarına bağlıdır. Semen viskozitesi, kokusu, rengi, hacmi değerlendirilir. Faz kontast mikroskopuyla Makler kamara, hemositometre gibi sayım kamaralarına alınan semende hücre sayımı yapılır, sperm hareketleri incelenir. Sperm hareketleri hareketsiz, yerinde hareketli, ileri doğru hareketli olarak değerlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımladığı normal semen parametreleri **Tablo1**'de belirtilmiştir (10, 25, 26).

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımladığı normal semen parametreleri (25)

Hacim	1,5 ml	İleri hareketlilik	%32
Sperm konsantrasyonu	$15 \times 10^6/\text{ml}$	Canlılık	%58
Toplam sperm sayısı	39×10^6	pH	7,2
Toplam hareketlilik	%40	Normal morfoloji	%4

Rutin semen analizi dışında semende ileri değerlendirmeler yapılabilir. Spermin antikorlarının değerlendirilmesi, akrozom reaksiyonunun değerlendirilmesi, zona bağlanma testleri ve sperm kromatin yapısının incelenmesi, DNA kırıklarının belirlenmesi gibi testlerle tanının konması ve uygun tedavinin planlanması amaçlanır (26).

Sperm DNA hasarı, rutin değerlendirmede incelenmeyen ancak fertilizasyona engel olabilen parametrelerden biridir. DNA hasarı spermde reaktif oksijen türleri, anormal paketlenme, tamir mekanizmalarının yetersizliği gibi nedenlere bağlı olarak görülebilir. DNA hasarı sonucunda apoptozis, inflamatuvar yanıt, fertilizasyon oranında düşüş ya da embriyo kaybı gibi istenmeyen olaylar görülebilir. Kromatin yoğunlaşmasını tamamlamayan spermelerde DNA hasarı gelişme riski artar. Kromatin yoğunlaşması sırasında

bazık histon proteinleri asidik protaminlerle değiştirilir. Asidik anilin mavisiyle pozitif reaksiyona giren histon proteinleri koyu renkte izlenirken, protaminler açık renkli izlenirler (25-27).

2.6.2 İnfertilite Tedavisinde Sperm Kullanımı

Yardımcı üreme tekniklerinde spermin kullanılabilmesi için farklı hazırlık yöntemleri kullanılır. Bu yöntemlerde fertilizasyon ve embriyo gelişimi için en uygun spermin seçilmesi amaçlanır. Tedavide kullanılacak spermier çoğunlukla mastürbasyonla elde edilir. Ejakulatta sperm olmaması (azospermi) gibi durumlarda duktus epididimisten ya da testisten girişimsel olarak alınabilir. Elde edilen spermierin in vitro olarak fizyolojik basamakları taklit edecek şekilde korunması ve işlem görmesi esastır. Semendeki dekapasitasyon faktörlerinin, ölü spermier ve epitel hücrelerinin uzaklaştırılması, hareketli spermierin elde edilmesi için basit yıkama, direkt yüzdürme (swim up) ve kesintili dansite gradyanları (density gradient) yöntemleri kullanılır. Hastanın durumu ve tedavi planına göre bu yöntemler birlikte kullanılabilir. Sıcaklık pH değişimi, oksidasyon, santrifüj ve toksik maddelerin spermier üzerine etkilerini en aza indirmek için protein ve tampon içerikli kültür solüsyonları ve inkübatörler kullanılır. Kültür solüsyonları kapasitasyonun sağlanması için yaklaşık 4 mg/ml insan serum albümini ve 25 mmol/L bikarbonat içerir. Kültür solüsyonlarında glikozun gerekli olup olmadığı tartışmalıdır. Fertilizasyon aşamasında glikoz içeren solüsyonların kullanılması önerilmektedir. Kültür solüsyonlarının uygun koşullarda saklamak, kontaminasyonu önlemek, sıcaklık ve pH değişimlerinden kaçınmak, santrifüj kuvvet ve süresini en az zararlı ve en etkin olacak seviyede tutmak sperm

kalitesini korumak ve fertilizasyon başarısı arttırmak için dikkat edilecek noktalardır (10, 25, 26).

2.6.2.1.1 Basit Yıkama

Yeterli sperm örneklerinde basit yıkama sonrası elde edilen spermler tedavide kullanılabilir. Direkt yüzdürme ve kesintili dansite gradyanları yöntemleriyle birlikte de kullanılmaktadır. Semen, eşit hacimli kültür solüsyonuyla seyreltilir ve santrifüj edilir. Elde edilen pellet kültür solüsyonuyla seyreltilir ve karıştırılır. Tekrar santrifüj edilerek elde edilen pellet kullanılır (10, 25, 26).

2.6.2.1.2 Direkt Yüzdürme (swim up)

Likefiye olmuş semenin üzerine bir mililitre kültür solüsyonunun ayrı bir katman oluşturacak şekilde eklenmesi ve bir saat inkübe edilerek hareketli spermlerin bu katmana yüzdürülmesiyle yapılır. Öncesinde yıkama işlemi yapılabilir ya da semen kültür solüsyonuyla seyreltilebilir. Semen kültür solüsyonunun üstüne eklenerek spermlerin aşağıya doğru yüzdürüldüğü “swim down” isimli bir yöntem de vardır (10, 25, 26).

2.6.2.1.3 Kesintili Dansite Gradyanları

Semendeki kaliteli spermlerin diğer hücrelerden ve seminal plazmadan kısa sürede ayrılabilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan tekniktir. Farklı derişimlerde silan kaplı kolloidal silika partikülleri içeren solüsyonlar hazırlanır. Yüksek dansiteli solüsyonun üzerine birbirleriyle karıştırmadan düşük dansiteli solüsyon eklenir. Kolloidal silika partikülleriyle sıvı formda bir filtre oluşturulur. Semen gradyanların üzerine eklenerek yeni bir katman oluşturulur. Santrifüj

edilerek, hareketli spermier diğer hücrelerden ve seminal plazmadan hızlı bir şekilde ayrılır. Elde edilen pellet kültür solüsyonuyla karıştırılır ve santrifüj edilerek yıkanır. Bu aşamayla spermier silika partikülleri gibi dansite gradyanlarının içerdiği maddelerden temizlenir. Elde edilen pellet kültür solüsyonuyla karıştırılarak kullanılır (10, 25, 26, 28).

Semen hazırlama yöntemleriyle elde edilen spermier intrauterin inseminasyon (IUI), in vitro fertilizasyon (IVF) ya da intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemlerinde kullanılabilir. İnterasitoplazmik sperm enjeksiyonunda oosit sitoplazmasına bir sperm enjekte edilir. Fertilizasyon için sperm seçimi, işlemi uygulayan kişi tarafından sperm hareketi ve morfolojisi değerlendirilerek yapılır. Fertilizasyon başarısını arttırmak için sperm seçiminde yeni yöntemler geliştirmek amaçlanmaktadır. Daha büyük büyütmelerin kullanıldığı, yüksek çözünürlüklü programlarla sperm organel morfolojisi dikkate alınarak sperm seçme yöntemi (IMSI: intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) geliştirilmiştir. Morfolojik olarak en kaliteli spermierin seçilmesi fertilizasyon, implantasyon ve gebelik başarısını arttırırken, kromozom anomalileri ve düşük oranlarında da önemli ölçüde düşüş sağlamıştır. Uygulamada embriyologların kritik önemi g r lm ştir. Yönteme alışma süresince uygulama sürelerinin artması işlemin başarısını azaltmıştır. İn vivo fertilizasyon için spermierin dişi genital kanalda kapasitasyonu tamamlaması, bağışıklık hücrelerinden kaçması, tuba uterina epiteline tutunup hiperaktivasyonla ayrılması, kumulus hücrelerini ve zona pellusidayı geçip oosite ulaşması gerekir. Bu basamaklar doğal seçilim sürecini oluşturur ve çeşitli reseptörlerle düzenlenir.

Spermde bulunan hiyalüronik asit reseptörleri spermiyogenez sırasında hücre zarının şekillenmesinde zona pellusida bağlanma reseptörleriyle birlikte oluşturulur ve hiyalüronik asite bağlandığı zaman kuyruk atım frekansını artırır. Hiyalüronan kullanılarak spermlerden hiyalüronik asit reseptörleri taşıyanlar, kuyruk atımı artmış olarak ayırt edilebilir. Bu yöntemle fizyolojik olarak zona pellusidaya bağlanabilecek spermier intrasitoplazmik enjeksiyon için kullanılır (PICSİ: physiologic intracytoplasmic sperm injection). Hiyalüronana bağlanma aynı zamanda DNA bütünlüğünü koruyan spermieri yansıtmaktadır. Fakat intrasitoplazmik sperm enjeksiyonuila karşılaştırıldığında embriyo kalitesini arttırmasına karşın implantasyon oranlarında anlamlı etkisi görülmemiştir. Bu örnekler ışığında gelecekte üreme biyoteknolojisinde, in vivo fertilizasyon sürecinin moleküler düzeyde tanımlanması, infertilite nedenlerinin aydınlatılması ve yardımcı üreme tekniklerinde fizyolojik süreçlere daha uygun yeni yöntemlerin geliştirilmesiile infertilite tedavilerinin başarısı arttırılabilir (26, 29-31).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 10.04.2017 tarihli 156 numaralı kararıyla, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi'nin "90057706-900/EĞİTİM" sayılı izniyle yürütüldü. Haziran 2017- Kasım 2017 tarihleri arasında örnekler toplandı. Mart 2018'de değerlendirmeler tamamlandı. Çalışma için proje desteği alınmadı.

Kontrol ve deney grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu (32). Gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verildikten sonra, bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılarak sözlü ve yazılı onamları alındı.

Grup bir (Kontrol, fertil) katılma kriterleri:

- On sekiz yaşından büyük ve Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olmak,
- Bir yıl içinde eşinde spontan gebelik sağlamış olmak.

Grup iki (Deney, açıklanamayan infertilite) katılma kriterleri:

- On sekiz yaşından büyük ve Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olmak,
- En az iki yıl korunmasız cinsel ilişkiye karşın eşinde gebelik oluşmaması,
- Daha önce klinik gebelik oluşturmamış olmak (primer infertilite),
- Kendisinde ve eşinde infertiliteyi açıklayacak neden belirlenememesi.

Çalışmadan çıkarılma kriteri:

- Semen analizinde DSÖ'nün belirlediği normal değerlerin karşılanmaması.

Gönüllülerden mastürbasyon yoluyla alınan örneklerden semen analizi yapıldı (**Deney 1**). Çekirdek kromatin yoğunlaşması değerlendirildi (**Deney 2**). Kesintili dansite gradyan yöntemi uygulanarak elde edilen spermlerde progesteron

yardımıyla akrozom reaksiyonu gerçekleştirilmeye çalışıldı (**Deney 3**). Akrozom reaksiyonunun tamamlanması ve İzumo1 proteinin varlığı immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi (**Deney 4**).

Deney 1: Semen Analizi

Gönüllülerden üç gün cinsel perhiz sonrası semen örnekleri alındı. Oda sıcaklığında otuz dakika likefaksiyon sonrası Makler kamara kullanılarak sayım yapıldı. DSÖ'nün belirlediği değerler esas alınarak semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, hareketli sperm yüzdesi, ileri hareket eden sperm yüzdesi ve sperm morfolojisi değerlendirildi (25).

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için on mikrolitre semen lama damlatıldı. Temiz bir lam yardımıyla çekilerek ince yayma oluşturuldu. Havada kurutulan yayma %4'lük paraformaldehit solüsyonuyla tespit edildi. Tespit sonrası on dakika distile suyla yıkanan yaymalar Spermac boyasıyla (LOT: FP12S05, FertilPro) üretici talimatı takip edilerek boyandı (33):

1. Yaymalar A solüsyonuyla (kırmızı) bir dakika boyandı.
2. Çeşme suyuyla yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı.
3. B solüsyonuyla (açık yeşil) bir dakika boyandı.
4. İkinci adımdaki yıkama tekrarlandı.
5. C solüsyonuyla (koyu yeşil) bir dakika boyandı.
6. İkinci adımdaki yıkama tekrarlandı.
7. Havada kurutulan yaymalar ışık mikroskopunda immersiyon yağıyla 1000x büyütmede incelendi.

Deney 2: Kromatin Yoğunlaşmasının Değerlendirilmesi

Asidik anilin mavisi boyaması için likefiye olmuş semenden 10µl alınarak yayma yapıldı. Havada kurutulan yaymalar %4'lük paraformaldehitte oda sıcaklığında otuz dakika tespit edildi. Tespit sonrası on dakika distile suyla yıkanan yaymalar, beş dakika %2 asetik asit içinde %2,5 anilin mavisi (pH= 3.5) (B8563 LOT: SLBQ9814V, Sigma) solüsyonuyla boyandı. Çeşme suyuyla yıkanarak fazla boyadan arındırılan yaymalar havada kurutuldu. Işık mikroskopunda, immersiyon yağıyla 1000x büyütmede iki yüz sperm değerlendirildi (34).

Deney 3: Semen Hazırlanması ve Akrozom Reaksiyonu

Semen kesintili dansite gradyanı yöntemiyle hazırlanıp, bir saat 10 µM progesteron ile akrozom reaksiyonu gerçekleştirildi.

Kesintili dansite gradyan yöntemi:

1ml %90(v/v) medyum üzerine, 1 ml %45(v/v) medyum karıştırılmadan eklenerek kesintili dansite gradyanı hazırlandı (SpermRinse LOT: 506342, Vitrolife; SpermGrad LOT:506385, Vitrolife). Üzerine semen örneği eklenip on dakika 400 g santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, pellete 2,5 ml sperm yıkama solüsyonu eklendi. 400 g on dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pellet akrozom reaksiyonu gerçekleştirmek için ayrıldı (35).

Akrozom reaksiyonu:

Kesintili dansite gradyan yöntemi sonrası elde edilen pellete 10µM progesteron içeren stok kültür solüsyonundan 0,5 ml eklendi (Sperm Rinse LOT:

506342, Vitrolife; Progesteron P8783 LOT: SLBQ9723V, Sigma Aldrich). Bir saat 37°C inkübe edilerek akrozom reaksiyonu gerçekleştirildi (36)

Deney 4: İzumo1 Proteininin Belirlenmesi

Akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmiş spermelerde İzumo1 proteinin belirlenmesi için üçlü immunfloresans çalışma yapıldı. Akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmiş spermleri göstermek için CD46'ya karşı geliştirilmiş monoklonal fare antikor (sc-166159 LOT: E2416, Santa Cruz Biotechnology), İzumo1 proteinine karşı geliştirilmiş poliklonal tavşan antikor (ab211623 LOT: GR273252-4, Abcam) kullanıldı (37). CD46 için Alexa Fluor® 488 eşlenik, fareye karşı geliştirilmiş sekonder antikor (ab150113 LOT:GR315193-2, Abcam); İzumo1 için ise Alexa Fluor® 594 eşlenik, tavşana karşı geliştirilmiş sekonder antikor (ab150080 LOT: GR3192711-1, Abcam) kullanıldı. Üçlü immunfloresans boyama yöntemi şu şekilde uygulandı:

Akrozom reaksiyonu için inkübe edilen örnekten polilizinli lama yayma yapıldı. Havada kurutulan lamalar %4'lük paraformaldehitte oda sıcaklığında otuz dakika tespit edildi. Yaymalarda sperm yoğunluğunun incelemeye uygun olduğu alanlar hidrofobik kalemle çevrelendi. Belirlenen alanlar fosfat tampon çözeltisiyle (PBS AP-9009-10 LOT: BBI120127, Thermo) üç kez onar dakika yıkandı. Antijenlerin ortaya çıkartılması için pH değeri altı olan sitrat tampon çözeltisiyle (AP-90003-500 LOT: MK160614, Thermo) ısı yardımıyla antijen retrieval aşaması gerçekleştirildi. Örneklerin dehidrate olmamasına dikkat edilerek, beşer dakika azalan güçte mikrodalga kullanılarak on beş dakika antigen retrieval yapıldı. Oda sıcaklığına gelen örneklerde, üçer kez onar dakika fosfat

tampon çözeltisiyle yıkandıktan sonra antikorların özgöl olmayan bağlanmasının engellenmesi için antijen blokaması yapıldı. Bunun için yaymalar nemli ortamda iki saat süresince 0,3 M glisin (EC 200-272-2 LOT: 110407, Fisher) içeren %1 BSA- PBS'le (Bovine Serum Albumin, sığır serum albümini; LOT:311008, GERBU) inkübe edildi. Yaymalar anti-CD46 (1:50) ve anti-İzumo1 (1:150) antikorlarıyla eş zamanlı olarak +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Fosfat tampon çözeltisiyle üç kez beşer dakika yıkandı. Yaymalar karanlıkta Alexa Fluor® 594 eşlenik antikorla (1:800) aynı anda Alexa Fluor® 488 eşlenik antikorla (1:800) bir saat boyunca inkübe edildi. Bu aşamadan itibaren bütün işlemler karanlıkta gerçekleştirildi. Üç kez onar dakika fosfat tampon çözeltisiyle yıkama yapıldı. Çekirdek boyaması için DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) içeren kapama medyumuyla (ab104139, LOT: GR3182624-4, Abcam) beş dakika inkübe edilen yaymalar lamel ile kapatıldı ve ojeyle sabitlendi. Örnekler +4°C'de ışık almayacak şekilde saklandı. DM 4000 Leica Germany görüntülü analiz sistemleri ile 200 spermde floresans ışımlar değerlendirildi (37, 38).

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmeleri SPSS 25.0 programıyla yapıldı. Kolmogorov- Smirnov testiyle verilerin dağılımı değerlendirildi. Verilerin normal dağılım gösterdiği durumlarda iki grup arasında ortalama değerlerin farkı bağımsız t testi ile (ortalama $\pm$ standart sapma), değerlerin birbiriyle ilişkileri ise Pearson korelasyon analiziyle belirlendi. Verilerin normal dağılım göstermediği durumlarda ise iki grup arasındaki farklar Mann Whitney u testiyle, veriler arasındaki ilişkiler ise Spearman korelasyon testiyle belirlendi (39, 40).

4 BULGULAR

Çalışma süresince elli yedi (57) gönüllünün bilgilendirilmiş onamları alınarak semen değerlendirmesi yapıldı. İki (2) katılımcı sperm sayısının az olması (oligozoospermi), beş (5) katılımcı sperm hareketinin az olması (astenozoospermi), iki (2) katılımcı ise sperm hareketinin ve sayısının az olması (oligoastenozoospermi) nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Kalan on sekiz (18) katılımcı kontrol (grup 1: fertil), otuz (30) katılımcı ise deney grubunda (grup 2: açıklanamayan infertilite) olmak üzere toplam kırk sekiz (48) katılımcının örnekleri değerlendirildi.

Katılımcıların yaşları değerlendirildiğinde; ikinci grubun yaş ortalamasının ($31,33 \pm 5,222$) birinci grubun yaş ortalamasından ($29,83 \pm 6,308$) yüksek olduğu görüldü. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p= 0,378$).

Semen analiziyle aşağıdaki parametreler değerlendirildi:

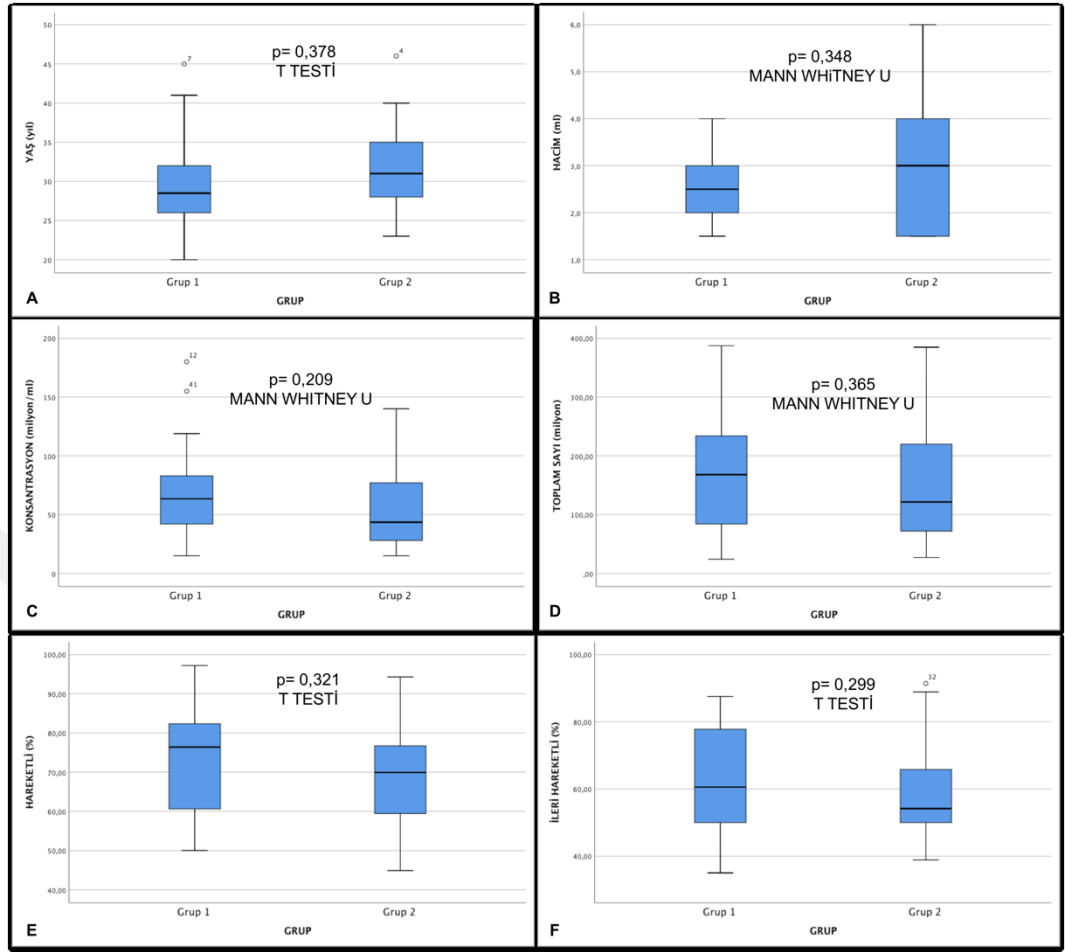
- a) Semen hacmi,
- b) Sperm konsantrasyonu,
- c) Toplam sperm sayısı,
- d) Hareketli sperm yüzdesi,
- e) İleri doğru hareket edebilen sperm yüzdesi,
- f) Normal morfoloji gösteren sperm yüzdesi,
- g) Baş, orta parça veya ana parça anomalisi görülen sperm yüzdeleri

Spermac boyası ile spermlerde; akrozom koyu yeşil, çekirdek kırmızı, orta parça ve ana parça açık yeşil olarak izlendi. Sperm morfoloji değerlendirmesi normal morfoloji gösterenler ve göstermeyenler olarak yapıldı. Her yaymada

toplam iki yüz sperm değerlendirildi. Normal morfoloji göstermeyenler değerlendirilirken; yalnız baş, orta parça veya ana parçada anomali gösterenler anomali gösterdikleri yerlere göre gruplandırıldı. Baş anomalisinin yanında orta parça ya da ana parçada anomali izlenen spermmler ise baş anomali grubuna dahil edildi. Akrozom anomalileri, şekil bozuklukları, büyük ya da küçük baş, sitoplazmik damlacıklar, baş anomalilerinin içinde incelendi. Orta parça anomalilerinde asimetrik çıkış, kalınlık, aşırı rezidüel sitoplazma varlığı; ana parça anomalilerinde ise bükük veya kıvrılmış ana parçalar değerlendirildi. Değerler yüzde olarak hesaplandı. Semen analizi parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Yaş ve semen analizine ilişkin tanımlayıcı veriler “**Tablo 2**” ve “**Tablo 3**”te, istatistiksel sonuçlar ise “**Grafik 1**” ve “**Grafik 2**”de verilmiştir. Normal sperm morfolojisi; baş, orta parça ve ana parça anomalilerine ilişkin örnekler “**Resim 1**”de gösterilmiştir.

Tablo 2: Yaş, semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, hareketli sperm ve ileri hareketli sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler.

	Grup	Ortalama Değer	Standart Hata	Ortanca Değer	Standart Sapma	En Düşük Değer	En Yüksek Değer
Yaş (yıl)	1	29,83	1,487	28,5	6,308	20	45
	2	31,33	0,953	31	5,222	23	46
Hacim (ml)	1	2,556	0,166	2,5	0,704	1,5	4
	2	2,95	0,229	3	1,255	1,5	6
Konsantrasyon (milyon/ml)	1	70,17	10,728	63,5	45,514	15	180
	2	51,97	5,612	43,5	30,737	15	140
Toplam Sayı (milyon)	1	178,83	26,920	168	114,215	24	387,5
	2	147,26	17,534	121,5	96,039	27	385
Hareketli (%)	1	73,04	3,228	76,41	13,698	50	97,22
	2	68,98	2,458	69,92	13,466	44,87	94,29
İleri Hareketli (%)	1	63,44	3,654	60,55	15,506	35	87,5
	2	58,83	2,599	54,14	14,236	38,89	91,43

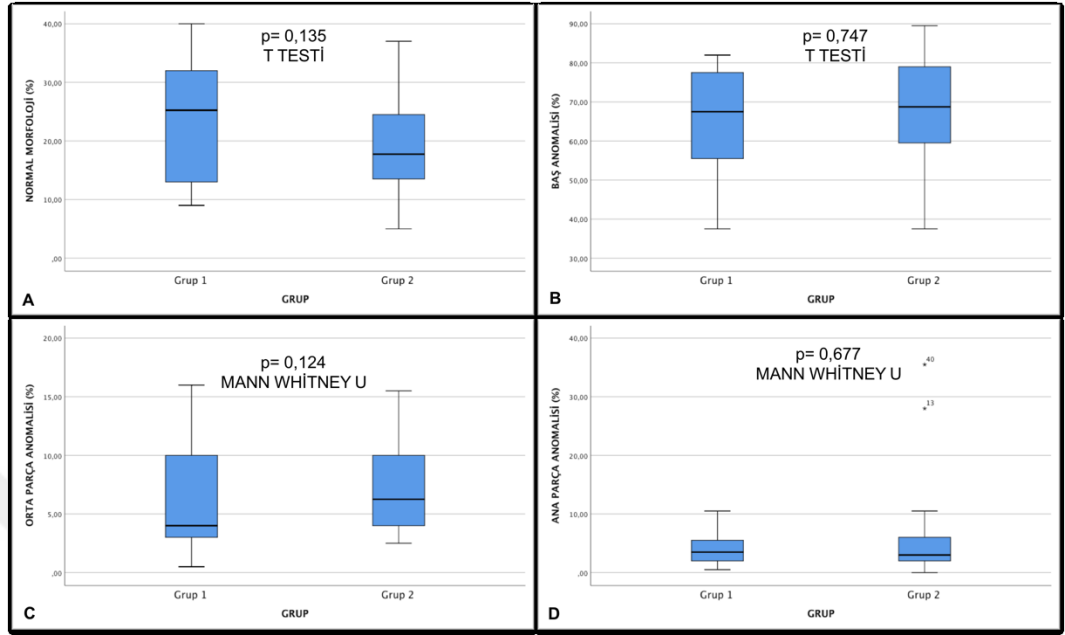


Grafik 1: Yaş (A), semen hacmi (B), sperm konsantrasyonu (C), toplam sperm sayısı (D), hareketli sperm yüzdeleri (E) ve ileri hareketli sperm yüzdelерinin (F) gruplar arasındaki farkları.

Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yapılan testler ve p değerleri grafiklerde belirtilmiştir.

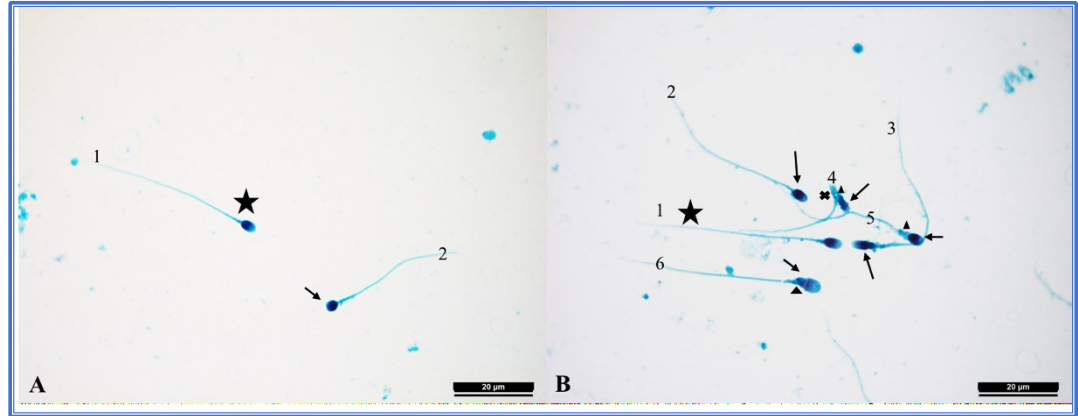
Tablo 3: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdesi ve baş, orta parça ve ana parça anomali izlenen sperm yüzdelерine ilişkin tanımlayıcı veriler.

	Grup	Ortalama Değer	Standart Hata	Ortanca Değer	Standart Sapma	En Düşük Değer	En Yüksek Değer
Normal Morfoloji (%)	1	23,91	2,569	25,25	10,902	9	40
	2	19,68	1,514	17,75	8,293	5	37
Baş Anomalisi (%)	1	66,02	3,372	67,5	14,310	37,5	82
	2	67,36	2,466	68,75	13,511	37,5	89,50
Orta Parça Anomalisi (%)	1	5,72	0,971	4	4,120	0,5	16
	2	7,4	0,711	6,25	3,898	2,5	15,5
Ana Parça Anomalisi (%)	1	4,33	0,718	3,5	3,048	0,5	10,5
	2	5,55	1,426	3	7,815	0	35,5



Grafik 2: Normal morfoloji gösteren (A), baş anomali görülen (B), orta parça anomali görülen (C) ve ana parça anomali görülen sperm yüzdelerinin (D) gruplar arasındaki farkları.

Gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yapılan testler ve p değerleri grafiklerde verilmiştir.



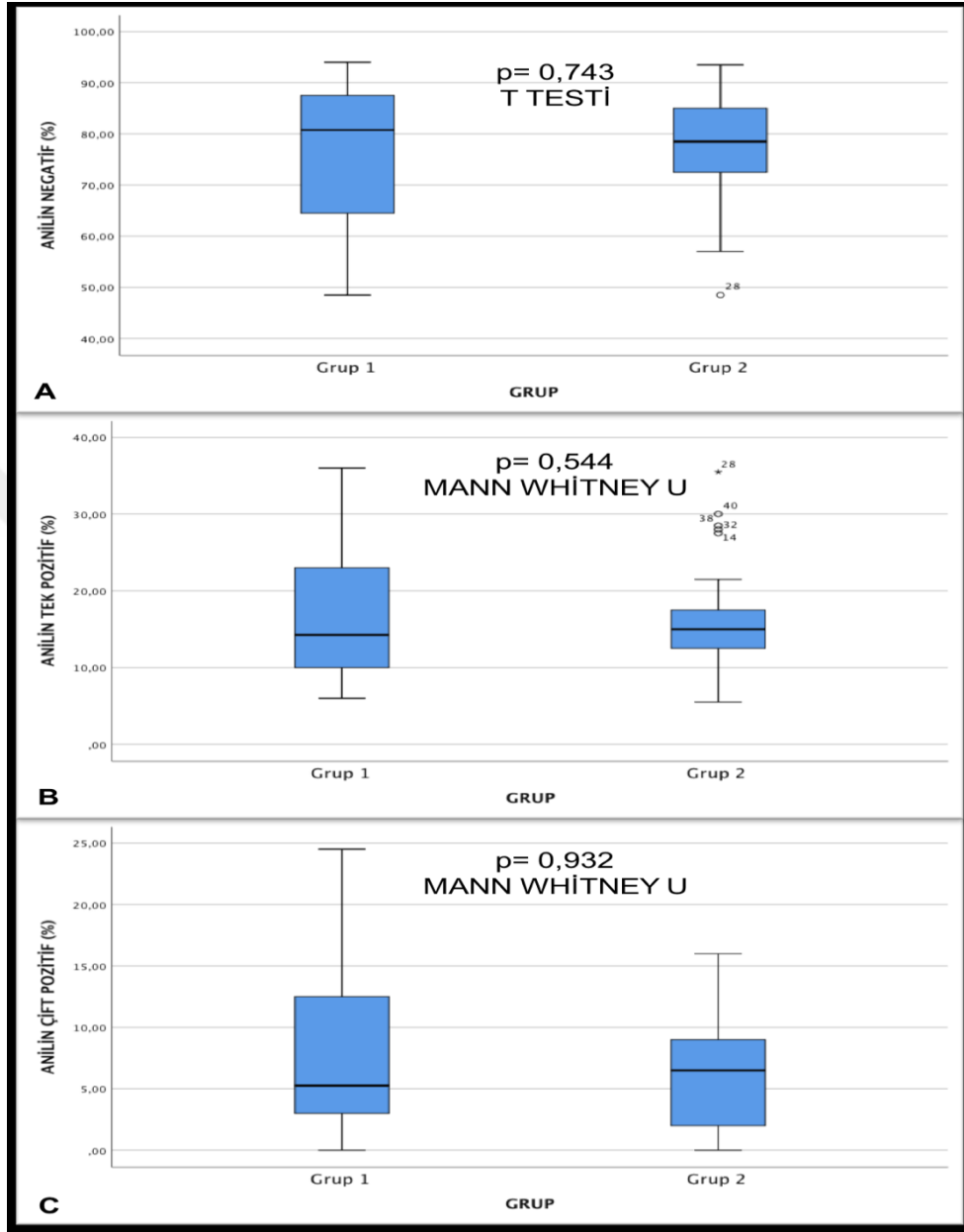
Resim 1: Spermac boyasıyla morfoloji değerlendirmesine ilişkin örnekler (A-B, 1000x).

Normal morfoloji gösteren sperm yıldız (★) işaretiyle, baş anomali okla (→), orta parça anomali üçgen (▲) işaretiyle ve ana parça anomali çarpı (x) işaretiyle gösterilmiştir. A1: Normal morfoloji. A2: Yuvarlak baş (globozoospermi), akrozom yok. B1: Normal morfoloji. B2: Sitoplazmik damlacık. B3: Baş koni şeklinde, akrozom küçük, orta parça kalın. B4: Şekilsiz (amorfe) baş, orta parça kalın, ana parça bükük. B5: Sitoplazmik damlacık, orta parça kalın. B6: Piriform baş, aşırı rezidüel sitoplazma, asimetrik orta parça.

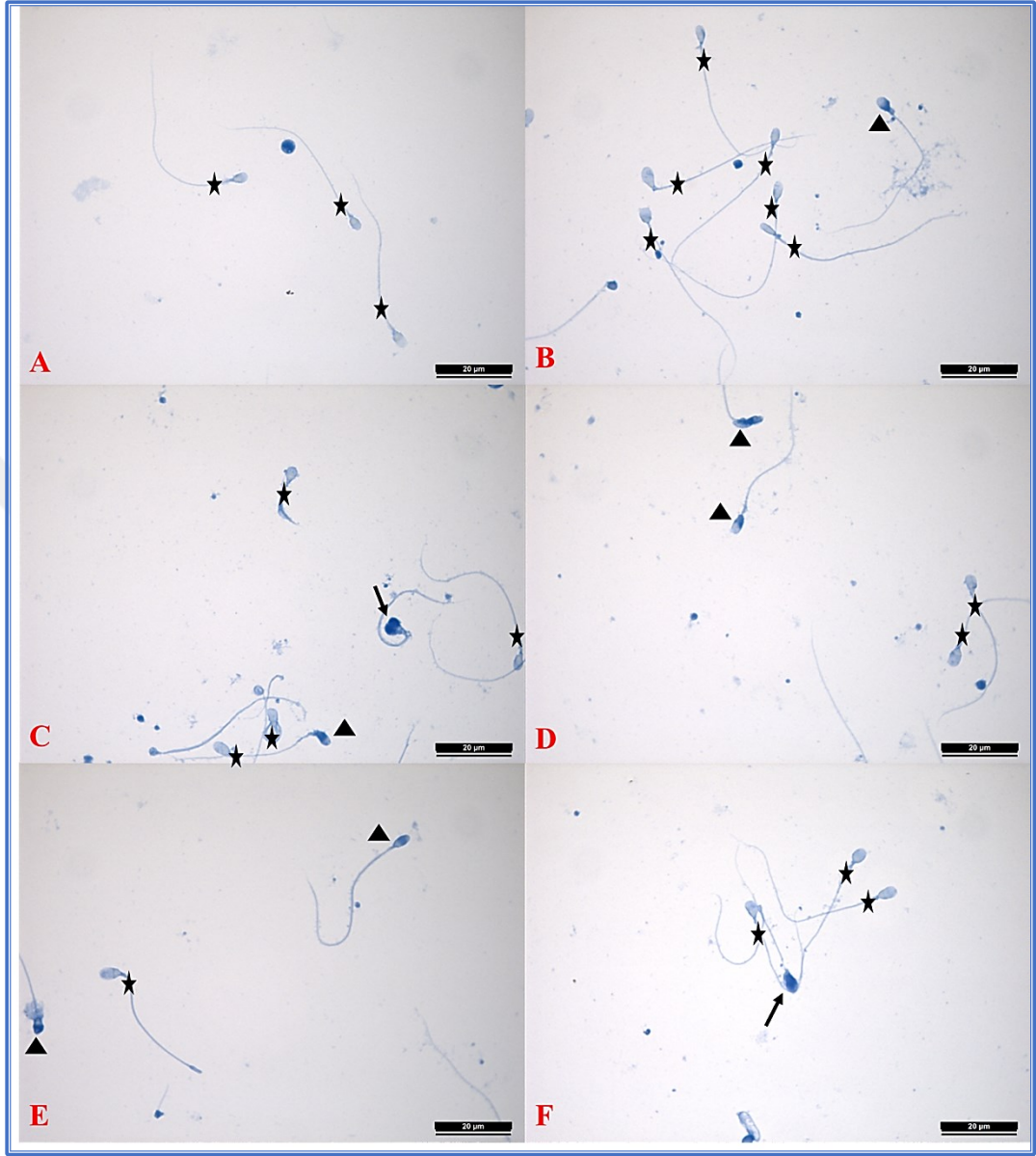
Sperm çekirdeğinde kromatinlerin yoğunlaşması asidik anilin mavisi boyamasıyla incelendi. Spermiler, asidik anilin mavisiyle boyanmayanlar (anilin negatif), kısmen boyananlar (anilin tek pozitif) ve tamamen boyananlar (anilin çift pozitif) olarak değerlendirildi. Grup bir ve grup iki, anilin mavisiyle boyanmayan spermilerin yüzdeleri açısından karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Anilin mavisi incelemelerine ilişkin tanımlayıcı veriler “**Tablo 4**”te, istatistiksel değerlendirmelere ait grafikler “**Grafik 3**”te verilmiştir. Asidik anilin mavisi boyamasına ilişkin örnekler “**Resim 2**”de gösterilmiştir.

Tablo 4: Anilin mavisiyle boyanma özelliklerine göre değerlendirilen sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.

	Grup	Ortalama Değer	Standart Hata	Ortanca Değer	Standart Sapma	En Düşük Değer	En Yüksek Değer
Anilin Negatif (%)	1	76,22	3,258	80,75	13,824	48,5	94
	2	77,38	1,909	78,5	109,357	48,5	93,5
Anilin Tek Pozitif (%)	1	16,16	1,934	14,25	8,208	6	36
	2	16,38	1,32	15	7,261	5,5	35,5
Anilin Çift Pozitif (%)	1	7,61	1,636	5,25	6,942	0	24,5
	2	6,23	0,833	6,5	4,567	0	16



Grafik 3: Anilin negatif (A), anilinle kısmen boyanan (B) ve anilinle tamamen boyanan (C) sperm yüzdelerinin gruplar arasındaki farkları.
Kullanılan test ve p değerleri grafiklerde belirtilmiştir.

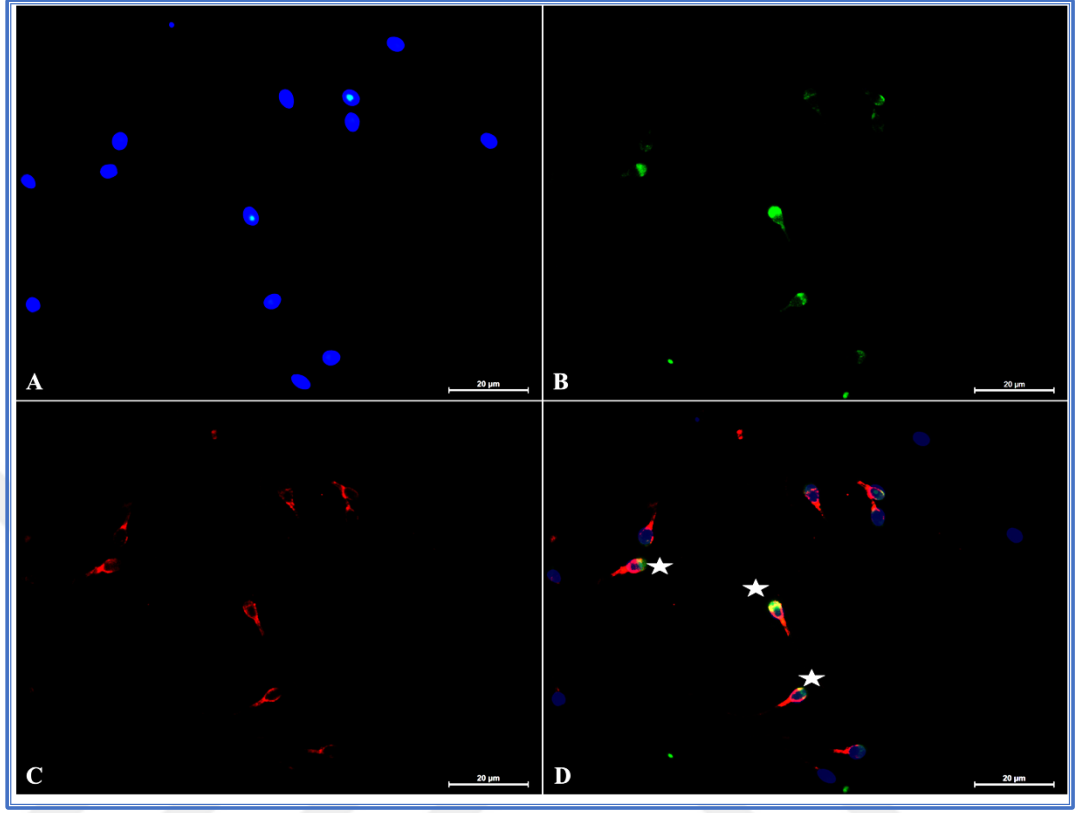


Resim 2: Asidik anilin mavisi boyama örnekleri (A-F, 1000x).

Asidik anilin mavisiyle boyanmayan çekirdekler yıldız (★), kısmen boyanan çekirdekler üçgen (▲), tamamen boyanan çekirdekler ise okla (→) gösterilmiştir.

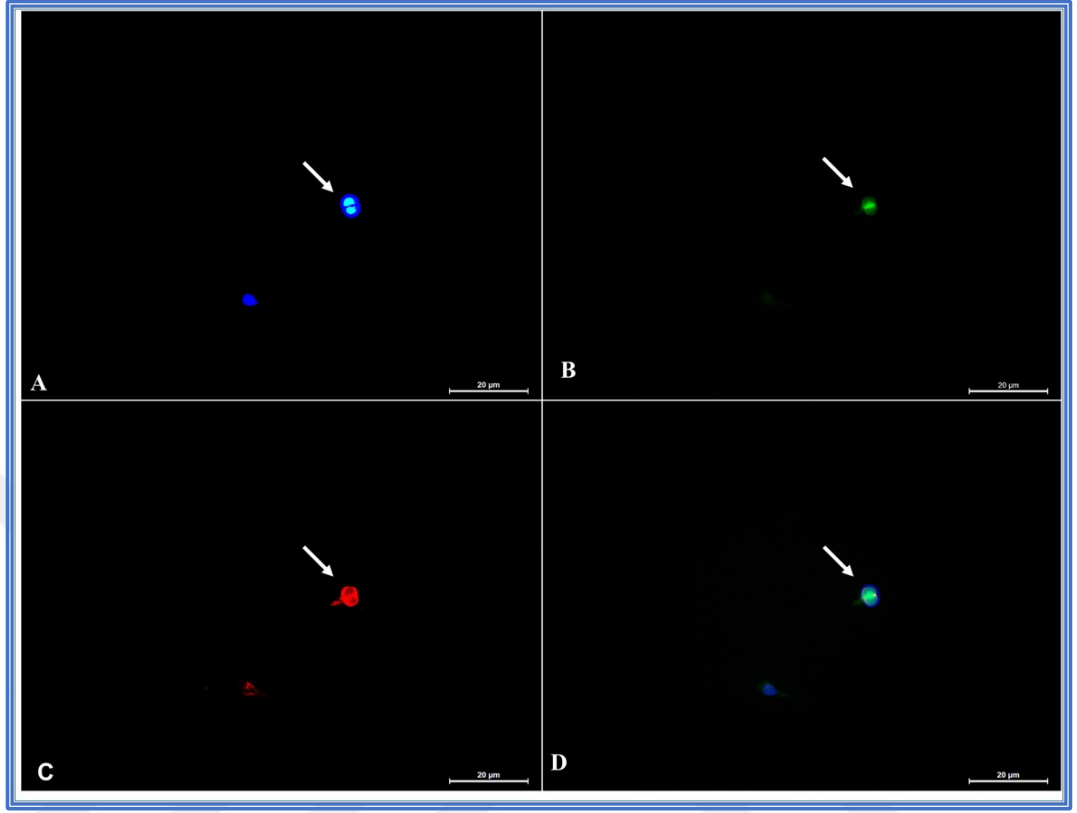
Yapılan immünfloresans incelemelerde İzumo1 antikoru, CD46 antikoru ve DAPI çekirdek boyası kullanıldı. İmmünfloresans incelemeye ilişkin örnekler “Resim 3”ten “Resim 8”e kadar gösterilmiştir. CD46 immünpozitifliği, spermilerin apikal bölgesinde değişen yoğunlukta izlendi. Bazı spermelerde CD46 immünreaksiyonu apikal bölgeden ekvatoryal bölgeye doğru hücre sınırlarında kalırken, bazı spermelerde immünreaksiyon anterior akrozom bölgesinde yaygın olarak izlendi. İzumo1 immünpozitifliği ise spermelerde periakrozomal alanda ve orta parçada izlendi. Spermier; CD46, İzumo1 ve DAPI immünreaksiyonları dikkate alınarak dört grupta değerlendirildi:

1. **Üç pozitif (İzumo1⁺, CD46⁺, DAPI⁺):** CD46, İzumo1 ve DAPI ile pozitif reaksiyon görülen spermier
2. **Tek pozitif (İzumo1⁻, CD46⁻, DAPI⁺):** Yalnız DAPI ile pozitif reaksiyon görülen spermier,
3. **İzumo1 negatif (İzumo1⁻, CD46⁺, DAPI⁺):** CD 46 ve DAPI ile reaksiyon görülen ama İzumo1 immünreaksiyonu görülmeyen spermier
4. **DAPI negatif (İzumo1⁺, CD46⁺, DAPI⁻):** İzumo1 ve CD46 ile pozitif immünreaksiyon gösterip DAPI ile reaksiyon göstermeyen spermier

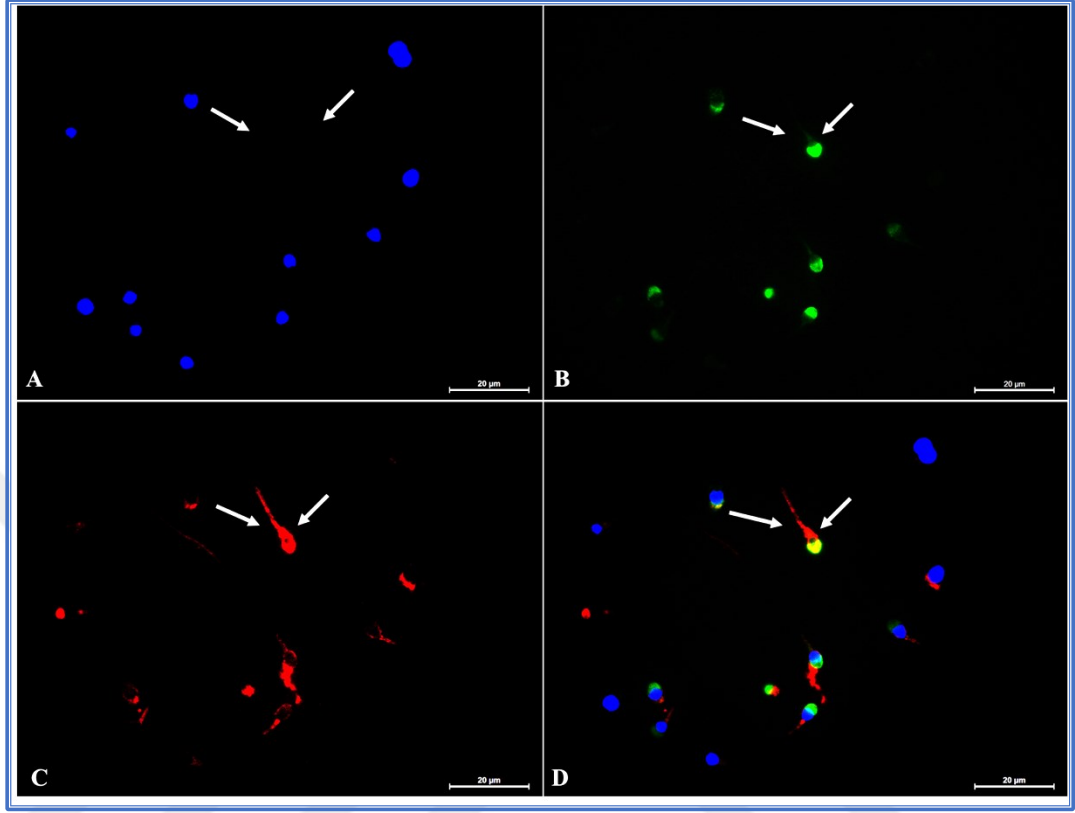


Resim 3: İmmünfloresans inceleme örneği (A-D, 1000x).

A: DAPI. B: CD46 immünpozitifliği akrozomal alanda izlenmektedir. C: İzumo1 immünpozitifliği periakrozomal alanda ve orta parçada görülmektedir. D: Birleştirilmiş görüntü. Üç pozitif (İzumo1⁺, CD46⁺, DAPI⁺) spermiler yıldız (★) işaretiyle gösterilmiştir

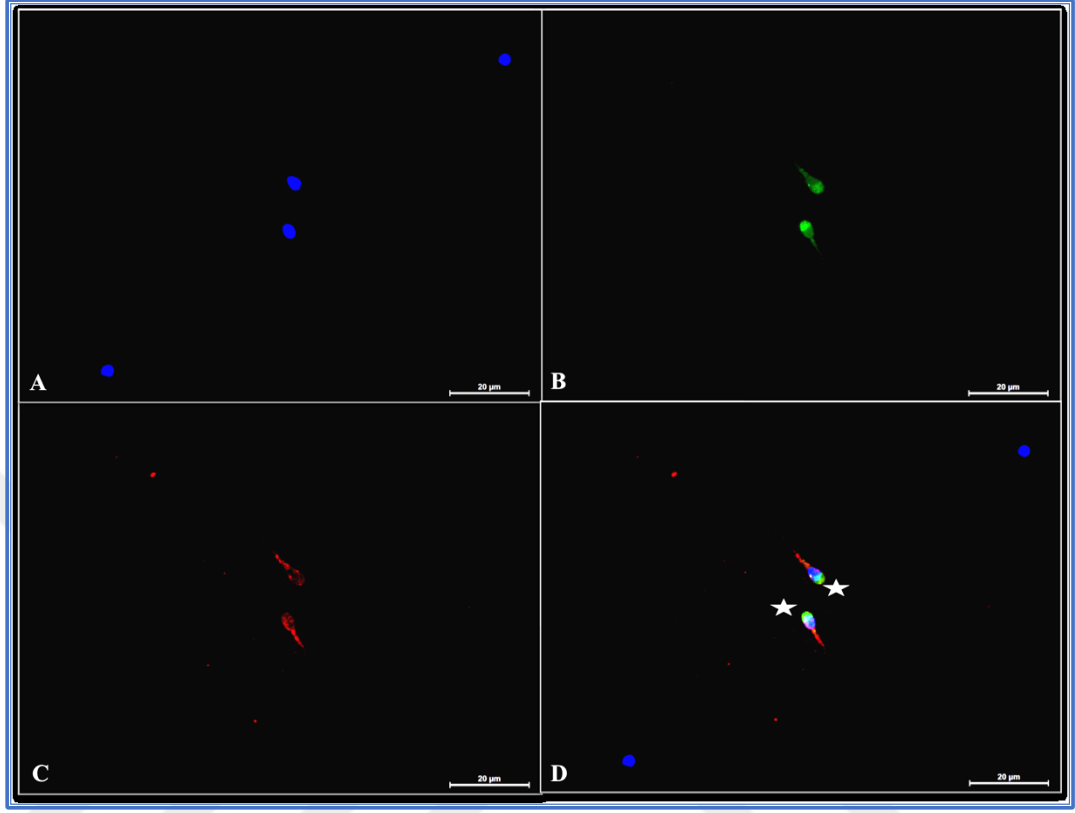


Resim 4: İmmünfloresans inceleme örneği (A-D, 1000x)
A: DAPI. B: CD46. C: İzumo1. D: Birleştirilmiş görüntü. Çift çekirdekli sperm ok (→) işaretiyle gösterilmiştir.



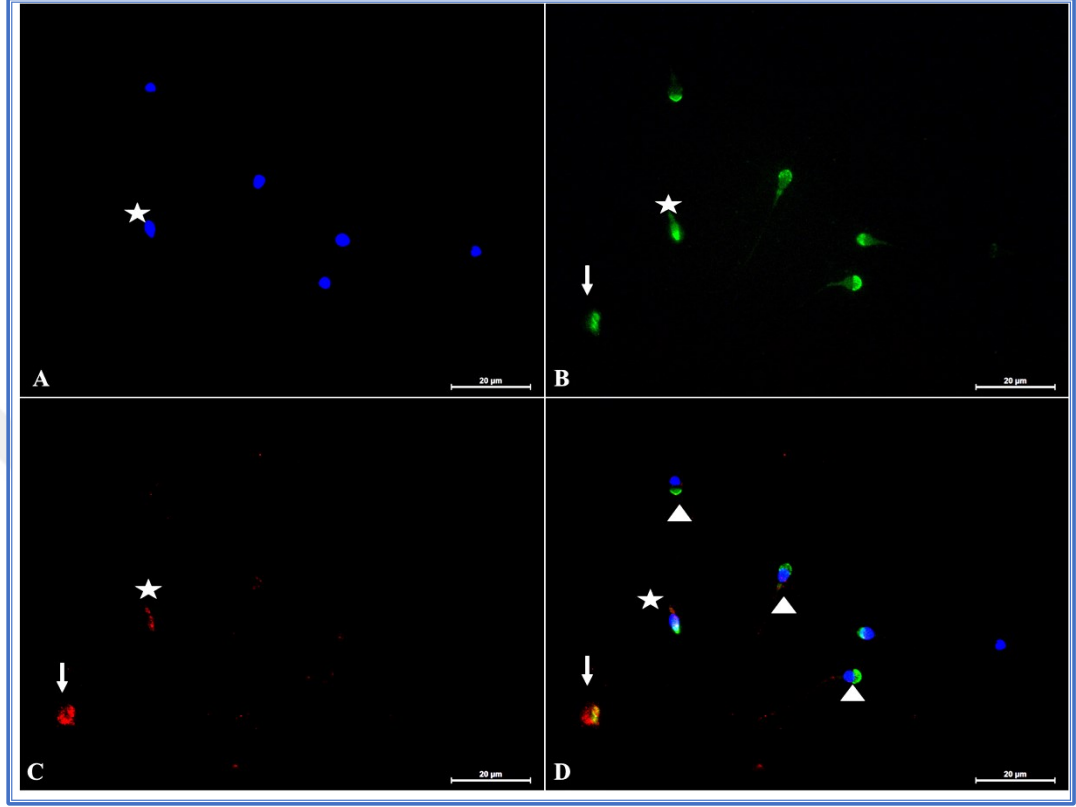
Resim 5: İmmünfloresans inceleme örneği (A-D, 1000x)

A: DAPI. B: CD46. C: İzumo1. D: Birleştirilmiş görüntü. DAPI negatif sperm ok (→) işaretiyle gösterilmiştir.



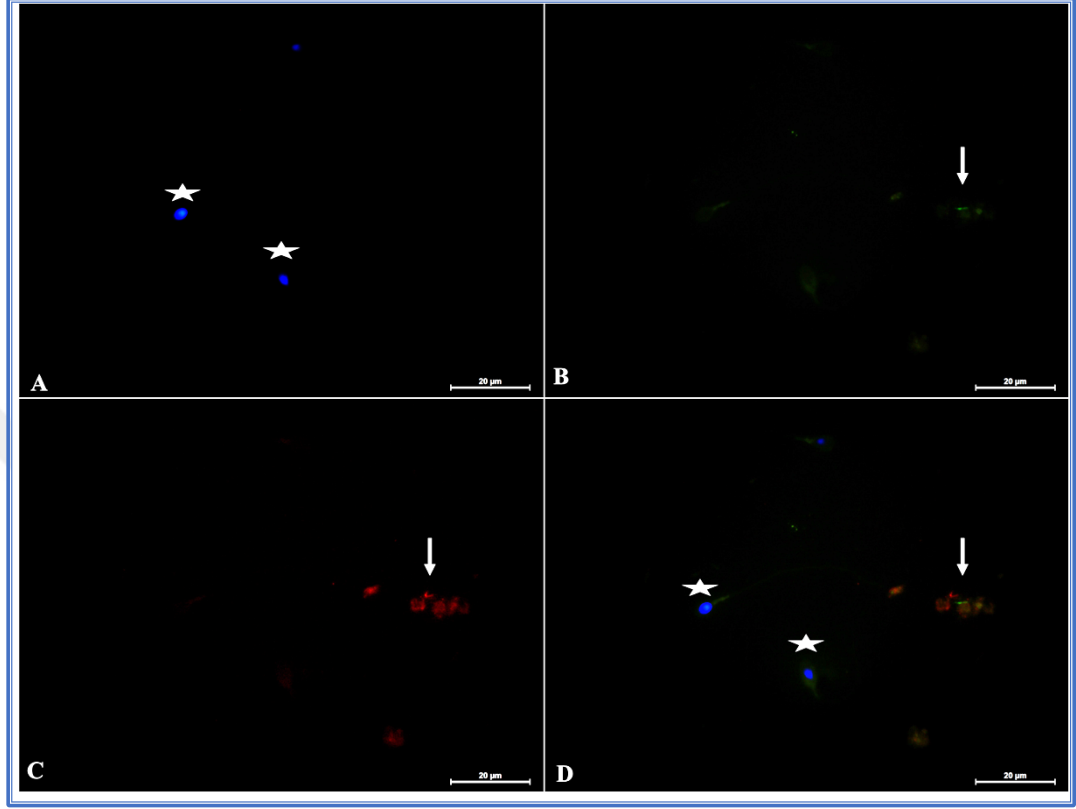
Resim 6: İmmünfloresans inceleme örneği (A-D, 1000x).

A: DAPI. B: CD46 immünpozitifliği akrozomal alanda izlenmektedir. C: İzumo1 immünpozitifliği periakrozomal alanda ve orta parçada görülmektedir. D: Birleştirilmiş görüntü. Üç pozitif (İzumo1⁺, CD46⁺, DAPI⁺) spermeler yıldız (★) işaretiyle gösterilmiştir.



Resim 7: İmmünfloresans inceleme örneği (A-D, 1000x)

A: DAPI. B: CD46 immünpozitifliği akrozomal alanlarda izlenmektedir. C: İzumo1 immünpozitifliği orta parçada görülmektedir. D: Birleştirilmiş görüntü. Üç pozitif (İzumo1⁺, CD46⁺, DAPI⁺) sperm yıldız (★) işaretiyle, İzumo1 negatif spermler üçgen (▲) işaretiyle, floresans ışına yapan artefaktlar okla (→) gösterilmiştir.



Resim 8: İmmünfloresans inceleme örneği (A-D, 1000x)

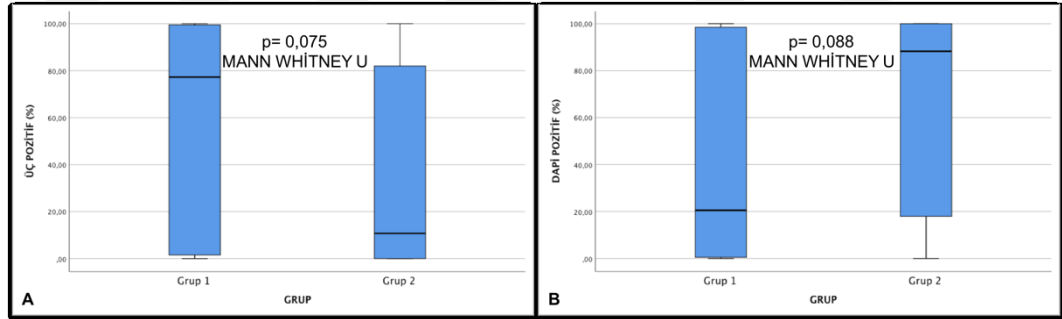
A: DAPI. B: CD46 immünpozitifliği görülmemektedir. C: İzumo1 immünpozitifliği görülmemektedir. D: Birleştirilmiş görüntü. Tek pozitif (İzumo1, CD46, DAPI⁺) sperm yıldız (★) işaretiyle, floresans ışına yapan artefaktlar okla (→) gösterilmiştir.

Dört grupta incelenen spermelerin yüzdeleri hesaplanarak istatistiksel değerlendirme yapıldı. DAPI negatif spermeler yalnız ikinci gruptaki bir örnekte (%2,5) görüldü. İzumo1 negatif spermeler; birinci grupta iki örnekte (%4,5, %4,5), ikinci grupta ise üç örnekte (%2,5, %1 ve %47) görüldü ve bu gruptaki spermelerde CD46 pozitifliği çoğunlukla hücre sınırlarında izlendi. Ayrıca çift çekirdek gibi anomalilere sahip spermelerde de CD46 ve İzumo1 pozitifliği görüldü. Diğer örneklerde spermelerin büyük çoğunluğu ya üç pozitif ya da tek pozitif olarak görüldü. Grup birdeki üç pozitif sperm yüzdesi (77,25), grup ikideki

üç pozitif sperm yüzdesinden (10,75) fazla olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,075$). Grup birdeki tek pozitif sperm yüzdesi (20,50), grup ikideki tek pozitif sperm yüzdesinden (64,9667) düşük bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,088$). Verilere ilişkin tanımlayıcı bilgiler “**Tablo 5**”te, istatistiksel değerlendirmeler “**Grafik 4**”te gösterilmiştir.

Tablo 5: Üç pozitif (İzumoI^+ , CD46^+ , DAPI^+) spermler ile tek pozitif (İzumoI^- , CD46^- , DAPI^+) sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler

	Grup	Ortalama Değer	Standart Hata	Ortanca Değer	Standart Sapma	En Düşük Değer	En Yüksek Değer
Üç Pozitif (%)	1	57,75	10,505	77,25	44,570	0	100
	2	33,25	7,245	10,75	39,682	0	100
Tek Pozitif (%)	1	41,75	10,508	20,5	44,582	0	100
	2	64,96	7,326	88,25	40,131	0	100



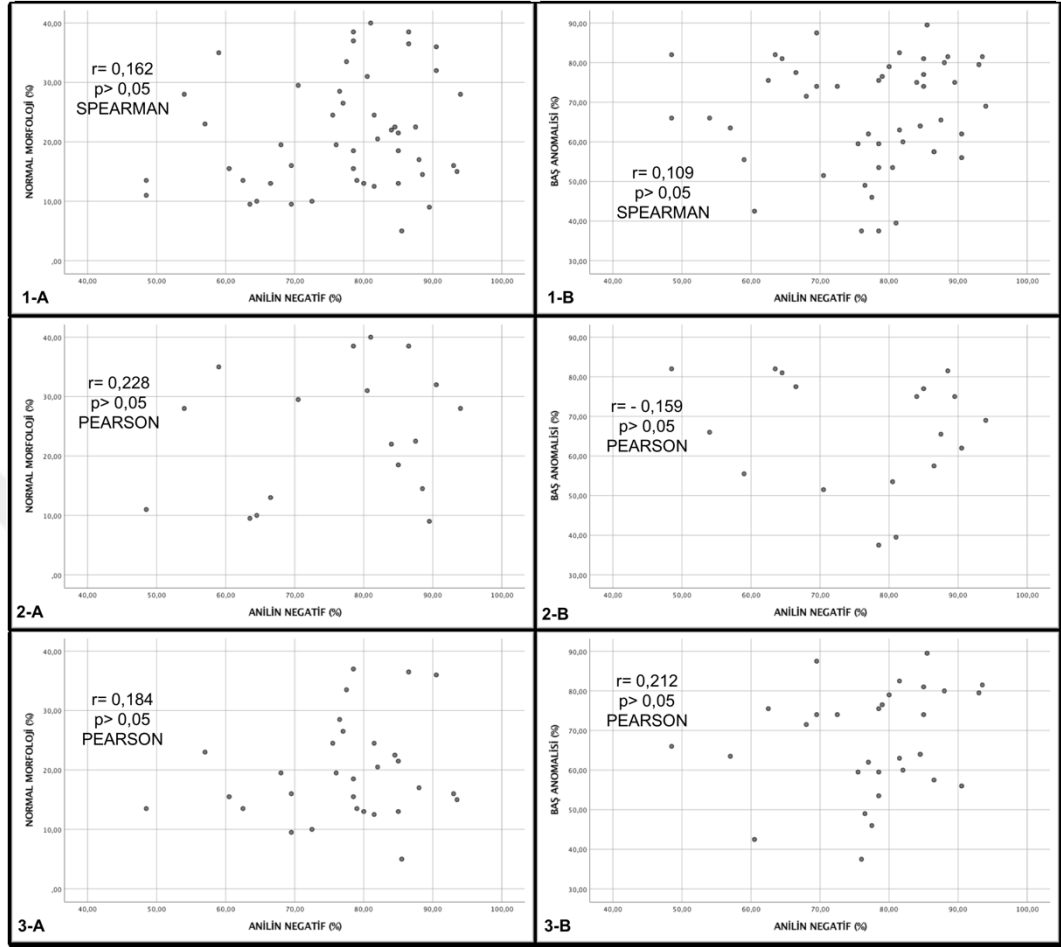
Grafik 4: Üç pozitif (İzumoI^+ , CD46^+ , DAPI^+) (A) ve tek pozitif (İzumoI^- , CD46^- , DAPI^+) (B) sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler. Kullanılan testler ve p değerleri grafiklerde verilmiştir.

Tüm araştırma evreninde, birinci ve ikinci gruplarda ayrı ayrı olmak üzere; morfoloji, kromatin yoğunlaşması ve immünohistokimya incelemesinin birbirleriyle ilişkileri istatistiksel olarak incelendi. Tüm araştırma evrenine ilişkin tanımlayıcı veriler “**Tablo 6**”da gösterilmiştir.

Tablo 6: Tüm evrende normal morfoloji gösteren, baş anomalisi görülen, anilin mavisiyle boyanmayan, üç pozitif (İzumol⁺, CD46⁺, DAPI⁺) ve tek pozitif (İzumol⁻, CD46⁻, DAPI⁺) sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler

	Grup	Ortalama Değer	Standart Hata	Ortanca Değer	Standart Sapma	En Düşük Değer	En Yüksek Değer
Normal Morfoloji (%)	1+2	21,27	1,367	19,5	9,47	5	40
Baş Anomalisi (%)	1+2	66,86	1,974	67,5	13,679	37,50	89,5
Anilin Negatif (%)	1+2	76,94	1,688	78,75	11,701	48,5	94
Üç Pozitif (%)	1+2	42,43	6,181	26,25	42,823	0	100
Tek Pozitif (%)	1+2	56,26	6,194	62,75	42,914	0	100

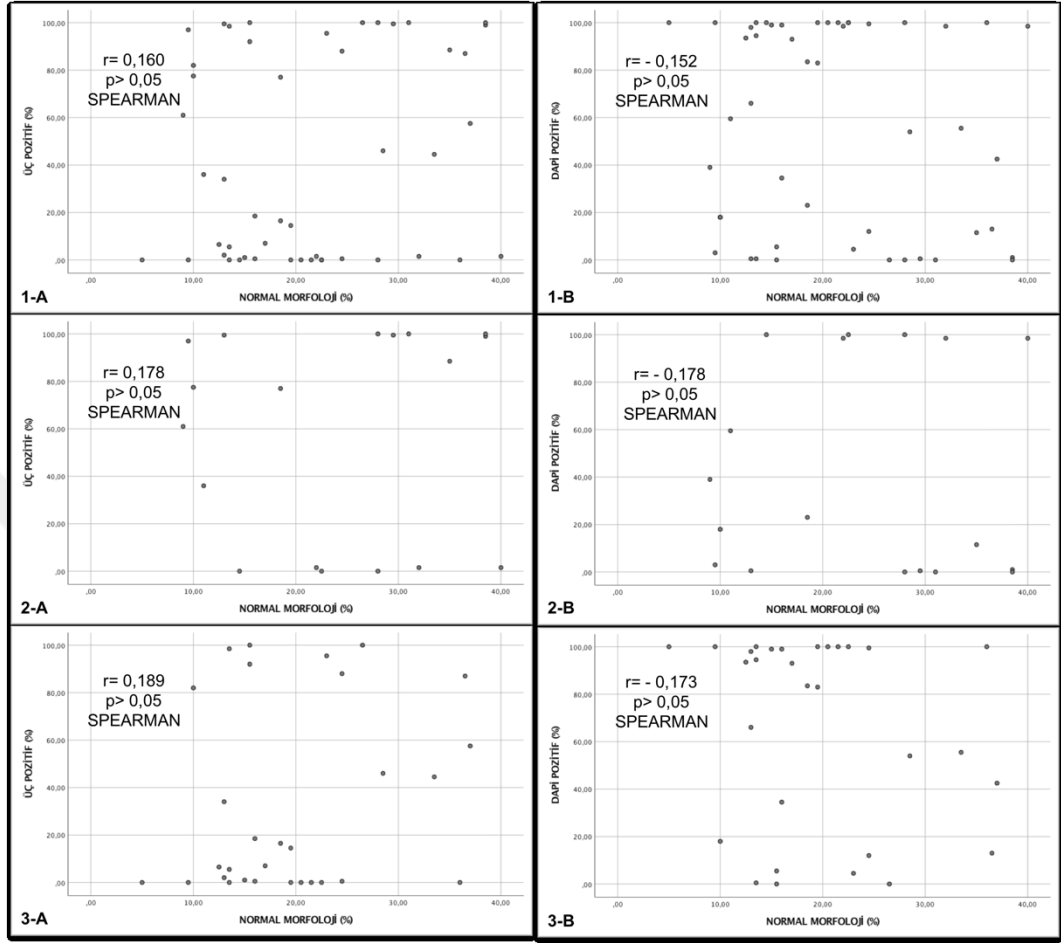
Tüm evrende ve gruplar içinde; normal morfoloji gösteren sperm yüzdesiyle, anilin negatif sperm yüzdesi arasında ve baş anomalisi görülen sperm yüzdesiyle, anilin negatif sperm yüzdesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (**Grafik 5**).



Grafik 5: Anilin negatif sperm yüzdesinin, normal morfoloji ve baş anomali yüzdesiyle ilişkisini gösteren grafikler.

Kullanılan testler, korelasyon katsayıları (r) ve p değerleri grafiklerde verilmiştir. **1-A:** Tüm evrende anilin negatif (%) ve normal morfoloji (%) ilişkisi. **1-B:** Tüm evrende anilin negatif (%) ve baş anomali (%) ilişkisi. **2-A:** Grup birde anilin negatif (%) ve normal morfoloji (%) ilişkisi. **2-B:** Grup birde anilin negatif (%) ve baş anomali (%) ilişkisi. **3-A:** Grup ikide anilin negatif (%) ve normal morfoloji (%) ilişkisi. **3-B:** Grup ikide anilin negatif (%) ve baş anomali (%) ilişkisi.

Tüm evrende ve gruplar içinde, normal morfoloji yüzdesiyle üç pozitif ve tek pozitif sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmedi (**Grafik 6**).

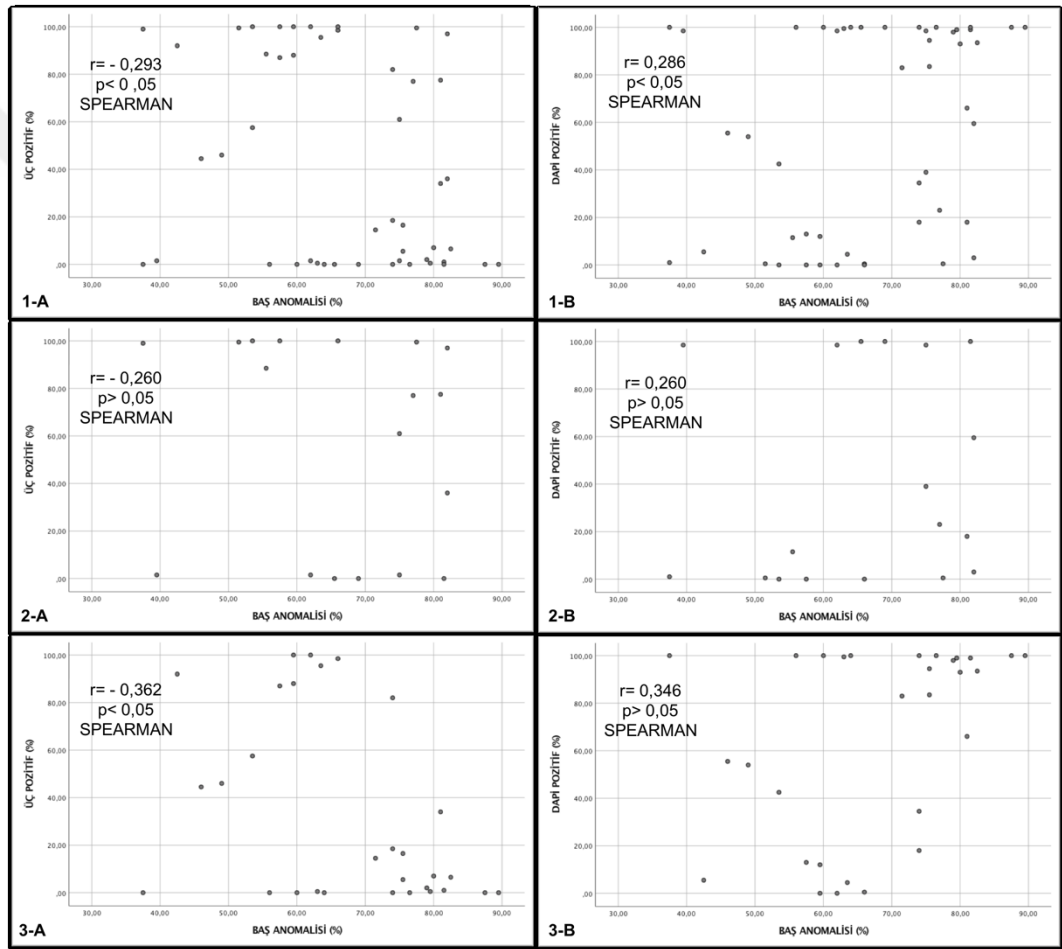


Grafik 6: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdeleriyle üç pozitif (İzumoI⁺, CD46⁺, DAPI⁺) ve tek pozitif (İzumoI⁻, CD46⁻, DAPI⁺) sperm yüzdeleri arasındaki ilişkileri gösteren grafikler.

Kullanılan testler, korelasyon katsayıları (r) ve p değerleri grafiklerde verilmiştir. **1-A:** Tüm evrende normal morfoloji (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **1-B:** Tüm evrende normal morfoloji (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi. **2-A:** Grup birde normal morfoloji (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **2-B:** Grup birde normal morfoloji (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi. **3-A:** Grup ikide normal morfoloji (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **3-B:** Grup ikide normal morfoloji (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi.

Tüm evrende; baş anomalisi gösteren sperm yüzdesiyle, üç pozitif sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, negatif yönde bir ilişki görüldü ($r = -0,293$, $p < 0,05$). Baş anomalisi gösteren sperm yüzdesiyle, tek pozitif sperm yüzdesi arasında, istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönde bir ilişki görüldü ($r = 0,286$, $p < 0,05$). Grup birde; baş anomalisi gösteren sperm yüzdesiyle üç pozitif ya da tek pozitif sperm yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki

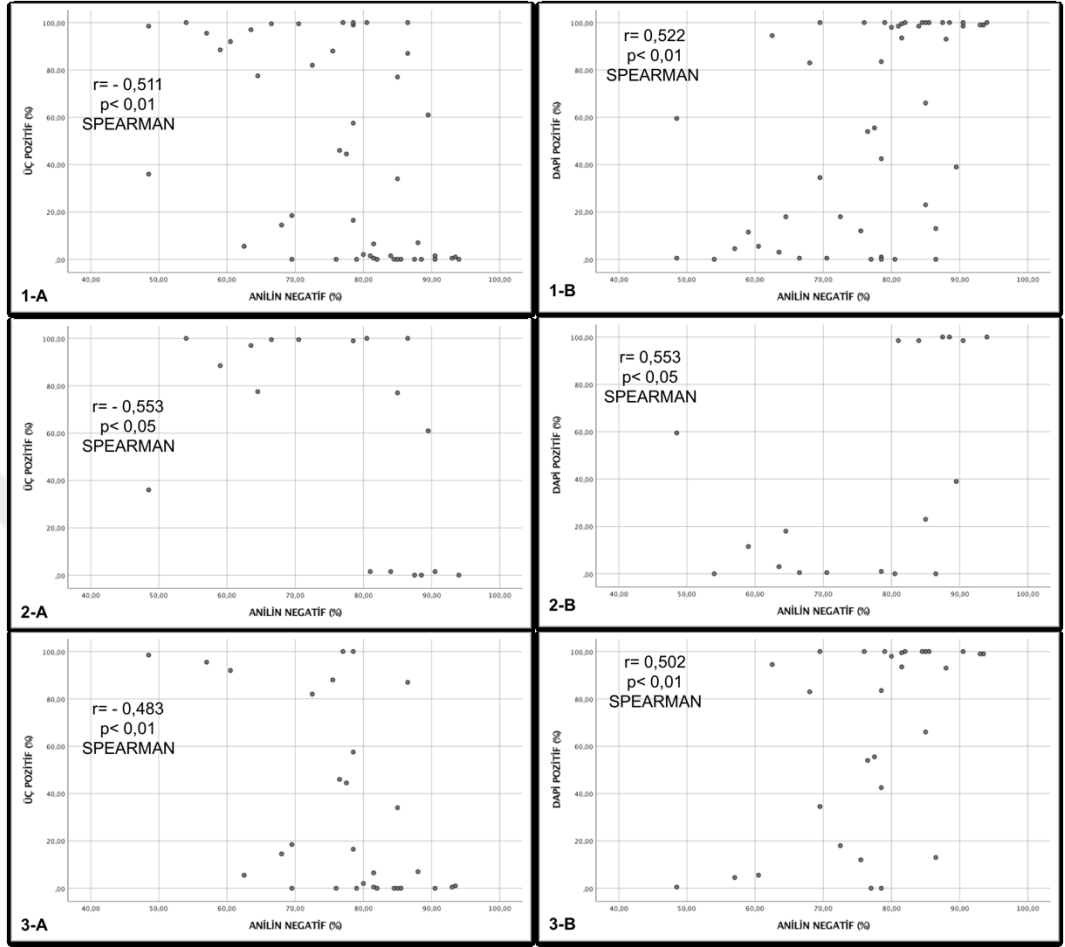
görülmüdü. Grup ikide; baş anomaliğ gösteren sperm yüzdesiyle, üç pozitif sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, negatif yönde bir ilişki görüldü ($r = -0,362$, $p < 0,05$). Baş anomaliğ gösteren sperm yüzdesiyle, tek pozitif sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmüdü. İstatistiksel değerdendirmeler “**Grafik 7**”de gösterilmiştir.



Grafik 7: Baş anomaliğ görülen sperm yüzdeleriyle, üç pozitif (İzumol⁺, CD46⁺, DAPI⁺) ve tek pozitif (İzumol⁻, CD46⁻, DAPI⁺) yüzdeleri arasındaki ilişkileri gösteren grafikler.

Kullanılan testler, korelasyon katsayıları (r) ve p değerdleri grafiklerde verilmiştir. **1-A:** Tüm evrende baş anomaliğ (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **1-B:** Tüm evrende baş anomaliğ (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi. **2-A:** Grup birde baş anomaliğ (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **2-B:** Grup birde baş anomaliğ (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi. **3-A:** Grup ikide baş anomaliğ (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **3-B:** Grup ikide baş anomaliğ (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi.

Tüm evrende; anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdesiyle, üç pozitif sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, negatif yönde bir ilişki görüldü ($r=-0,551$, $p<0,01$). Anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdesiyle, tek pozitif sperm yüzdesi arasında, istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönde bir ilişki görüldü ($r=0,522$, $p<0,01$). Grup birde; anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdesiyle, üç pozitif sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, negatif yönde bir ilişki görüldü ($r=-0,553$, $p<0,05$). Anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdesiyle, tek pozitif sperm yüzdesi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönde bir ilişki görüldü ($r=0,553$, $p<0,05$). Grup ikide; anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdesiyle, üç pozitif sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, negatif yönde bir ilişki görüldü ($r=-0,483$, $p<0,01$). Anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdesiyle, tek pozitif sperm yüzdesi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönde bir ilişki görüldü ($r=0,502$, $p<0,01$). İstatistiksel değerlendirmeler “**Grafik 8**”de gösterilmiştir.



Grafik 8: Anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdeleriyle, üç pozitif (İzumoI⁺, CD46⁺, DAPI⁺) ve tek pozitif (İzumoI⁻, CD46⁻, DAPI⁺) yüzdeleri arasındaki ilişkileri gösteren grafikler.

Kullanılan testler, korelasyon katsayıları (r) ve p değerleri grafiklerde verilmiştir. **1-A:** Tüm evrende anilin negatif (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **1-B:** Tüm evrende anilin negatif (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi. **2-A:** Grup birde anilin negatif (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **2-B:** Grup birde anilin negatif (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi. **3-A:** Grup ikide anilin negatif (%) ve üç pozitif (%) ilişkisi. **3-B:** Grup ikide anilin negatif (%) ve tek pozitif (%) ilişkisi.

5 TARTIŞMA

İnfertilite çiftlerin yaklaşık yüzde on beşini etkilemektedir. Çiftlerin yarıya yakınında erkeğe bağlı nedenler görülmektedir. İnfertilite tanısında erkeğe bağlı etkenlerin uygun şekilde değerlendirilmesi önemlidir. İnfertilite şikayetiyle başvuran erkeklerde öykü ve fizik muayeneden sonra gelen ilk değerlendirme yöntemi semen analizidir (41). Semen analiziyle değerlendirilen parametrelerin düşük olması, erkek infertilitesini düşündürür. Semen analizi spermin işlevine ilişkin verileri sağlamadığı için değerlerin normal sınırlarda olması infertiliteyi dışlamaz. Bu nedenle semen analizi, fertilite potansiyelini öngörmek için yeterince güvenilir değildir (42, 43). Açıklanamayan erkek infertilitesinde semen analizi sonuçları normaldir. Reaktif oksijen türleri ve DFİ (DNA fragmentation index) gibi ileri değerlendirmelerle açıklanamayan erkek infertilitesinde, fertil erkeklerden farklı sonuçlar alınabilmektedir (44, 45). Bizim çalışmamızda gruplar arasında semen analiziyle değerlendirilen parametreler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklar ortaya koyulmamıştır. Literatürde benzer olarak semen analizinde istatistiksel olarak anlamlı farkların görülmediği çalışmanın yanı sıra hareketli sperm yüzdesi ve normal morfoloji görülen sperm yüzdelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulunduğu bir araştırma da görülmüştür (45, 46). DSÖ semen analizi için alt sınırlar belirlemiştir. Bu sınırlar belirlenirken her değer için beşinci persentil değerleri dikkate alınmıştır. Semen profilini belirlerken ellinci persentil değerlerini de göz önünde bulundurmanın daha uygun olduğunu belirten çalışmalar vardır (44).

Yaş ve infertilite arasındaki ilişki özellikle çocuk sahibi olma yaşının ilerlediği toplumlarda önem kazanmıştır. İnfertilite tedavisi söz konusu olduğunda maternal yaş ile tedavi başarısı arasındaki negatif ilişki bilinmektedir. Paternal yaş ve tedavi başarısı arasında da benzer bir ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (47). Paternal yaşın artmasının sperm kalitesi ve testis işlevi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Kromozom anomalileri, DNA bütünlüğü ve epigenetik değişiklikler de paternal yaşın artmasından etkilenmektedir. Günümüzde kadınlar için üreme sağlığı ve tedavi başarısı değerlendirilirken 35 yaş sınır olarak kabul edilmektedir. Erkekler için 40 yaşından sonra DNA hasarının arttığı, semen parametrelerinde değişiklik görülmesine bile çocuk sahibi olma potansiyelinin azaldığı ve üremeye yardımcı tedavilerin başarısının düştüğü görülmüştür. Yaşlanmaya bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin artmasının ve DNA tamir mekanizmalarının bozulmasının, infertiliteye neden olduğu ve tedaviyi etkilediği düşünülmektedir (48-50). Bizim çalışmamızda grupların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Açıklanamayan infertilite grubunun yaş ortalamasının ($31,33 \pm 5,222$) 40'ın altında olması, infertilitenin paternal yaşla ilişkilendirilmesini engellemektedir. İki gruptaki yaş dağılımlarının benzer olması, gruplar arasında diğer parametrelerin karşılaştırılması sırasında daha nesnel sonuçların ortaya koyulmasını sağlamaktadır.

Sperm üretimi sırasında DNA paketlenmesi için histon proteinleri protaminlerle yer değiştirerek kromatin yoğunlaşmasını sağlar. Kromatin yoğunlaşması, sperm oosite ulaşana kadar DNA'nın korunmasına yardımcı olur

(51). Varikosel, tekrarlayan düşükler, İVF ve İÜİ başarısızlığı görülen hastaların spermelerinde kromatin yoğunlaşmasının fertil erkeklere göre daha az olduğu gösterilmiştir (52) Obstrüktif azospermi hastalarında epididimisten alınan ve normozoospermik hastaların ejakülatlarından alınan spermelerin, kromatin yoğunlaşmasının karşılaştırıldığı çalışmada; normozoospermik hastalarda kromatin yoğunlaşmasının ve fertilizasyon hızının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (53). Farklı çalışmalarda tekrarlayan düşük şikayetiyle başvuran kadınların eşleriyle, fertil erkeklerin spermelerinin kromatin yoğunlaşması da karşılaştırılmıştır. Fertil erkeklerden alınan spermelerde asidik anilin mavisiiyle boyanmayanların istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olduğu gösterilmiştir (54-56). Gebeliğin oluşması ve devam etmesiyle ilgili problemlerin görüldüğü hasta gruplarında yapılan bu çalışmalar sperm kromatin yoğunlaşmasının fertilité için önemini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda anilin mavisiiyle boyanmayan sperm yüzdeleri, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir. Bu nedenle araştırmamızda kromatin yoğunlaşmasındaki fark infertiliteyi açıklamamaktadır. Gruplar arasında anilin mavisiiyle boyanmayan sperm yüzdelerinin birbirine yakın olması nedeniyle literatürdeki anilin mavisii sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmıştır. Anilin negatif sperm yüzdeleri gruplar arasında ve literatürdeki açıklanamayan infertilite değerleriyle benzerlik göstermektedir. Fakat literatürde erkek infertilitesi nedeniyle epididimisten alınan spermelerde daha fazla olgunlaşmamış sperm görülmüştür. Akrozom yanıtıyla olgunlaşma arasındaki ilişkilerin farklı infertilite

gruplarında incelenmesiyle spermiyogenezin sperm işlevleri üzerine etkileri ortaya konabilir (53).

Yüksek büyütmede morfolojiye göre seçilen spermle yapılan intrasitoplazmik enjeksiyonda fertilizasyon başarısı artmaktadır (57). Morfoloji ve kromatin yoğunlaşmasının ilişkisini inceleyen bir çalışmada, oligoastenoteratozoospermi ve İVF başarısızlığı olan hastalardan alınan semenden kesintili dansite gradyanıyla seçilen spermle yüksek büyütmede baş ve sitoplazmik damlacık durumuna göre değerlendirilmiştir. Baş anomali ve sitoplazmik damlacık görülen spermlede kromatin yoğunlaşmasının tam olmadığı bu nedenle enjeksiyon için kullanılmasının başarıyı azaltacağı sonucuna ulaşılmıştır (58). Bizim çalışmamızda ise kromatin yoğunlaşmasıyla sperm morfolojisi arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Buna incelemeyi semenden yapmamız neden olabilir. Santrifüj sonrası elde edilen spermlelerin daha benzer özellikler göstermesi karşılaştırılan parametrelerdeki ilişkinin kuvvetlenmesini sağlayabilir.

İnfertiliteyi açıklayacak hücre yüzey reseptörü araştırmalarının sonucunda üç proteini kodlayan genlerin susturulmasıyla, hayvanlarda cinsiyete özgü infertilite oluşturulmuştur. Bu proteinlerin ikisi oosit yüzeyinde bulunan CD9 ve Juno, diğeri ise sperm yüzeyinde bulunan İzumo1'dir (2). Sperm yüzey proteinlerinin kapasitasyon sırasında değişim gösterdiği hipoteziyle yola çıkılan bir çalışmada OBF 13 proteinine karşı geliştirilmiş antikor kullanılarak, bu proteininin kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu sonrasında sperm yüzeyinde görüldüğü bulunmuştur (59). Spermleler OBF 13 antikorlarıyla inkübe edildiğinde

in vitro fertilizasyon oranlarının düştüğü görülmüştür (60). Sperm OBF 13 proteininin fertilizasyondaki rolü nedeniyle Japon evlilik tapınağından esinlenilerek İzumo adı verilmiştir. İzumo geninin susturulduğu dişi farelerin fertil olmasına karşılık, erkek farelerde infertilite görülmüştür. İnfertilite görülen bu farelerde sperm, normal morfoloji göstermesine, dişi genital kanallarda ilerleyerek akrozom reaksiyonu gibi fonksiyonel basamakları tamamlamasına karşılık oositle birleşmeyi gerçekleştirememişlerdir. İntrasitoplazmik enjeksiyon sonrası fertilizasyonun oluşması ile İzumo proteininin sperm ve oosit hücre zarlarının birleşmesi için gerekli olduğu ortaya koyulmuştur (61). Daha sonra farklı İzumo proteinlerinin tanımlanmasıyla sperm oosit birleşmesinden sorumlu, büyük bir hücre dışı parça içeren tip 1 transmembran proteini İzumo1 olarak adlandırılmıştır (62). İzumo1 proteinin hücrelerin birleşmesi için önemi anlaşıldıktan sonra çeşitli yapısal değişimleri ile fertilizasyon arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Proteinin immünglobulin benzeri parçasındaki N-glikozilasyonunun olmadığı farelerde, fertilizasyon hızının azaldığı fakat fertilizasyonun tamamen engellenmediği görülmüştür (63). İzumo1 proteininin testiste ve epididimiste farklı bölgelerden fosforilasyonu ile işlevsel değişikliği gösterilmiştir (20). Testise özgü serin kinaz 6 (Tssk6) geninin susturulduğu farelerde morfolojik olarak normal olan spermelerde akrozom reaksiyonu sonrası İzumo1 dağılımının değiştiği görülmüştür. Bu farelerde oluşan infertilite, İzumo1 proteininin fosforilasyonundaki bozuklukla açıklanmıştır (64). İzumo1 proteininden elde edilen antijenlerin, doğum kontrol aşısı olarak kullanılarak dişi farelerde İzumo1 antikoru oluşturulmuş ve yaklaşık dokuz ay süresince fertilité

engellenmiştir (65). Sperme karşı oluşturulmuş antikorlar (ASA: anti-sperm antikor) nedeniyle infertilite görülen hastalarda İzumo1'e karşı geliştirilmiş antikor varlığının araştırıldığı bir çalışmada; kadınlarda fertil kontrollere göre daha yüksek anti-İzumo1 antikor titresi saptanmıştır. Erkeklerde ise İzumo1'e karşı antikor görülmemiştir (66). İn vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik enjeksiyon başarıları ile ilişkili İzumo1 gen polimorfizmi gösterilememiştir (67). Sperm sayısı az olan (oligozoospermi) ve sperm hareketinin az olduğu (astenozoospermi) hastalarla yapılan bir çalışmada, bir saatlik akrozom reaksiyonu sonrası CD46 pozitif bütün spermelerde açığa çıkan iç akrozom zarında İzumo1 pozitifliği gösterilmiştir (37). İn vitro fertilizasyon kliniğine başvuran bazı hastaların İzumo1 proteininin fosforilasyonunun daha az olduğu görülmüştür. Bu nedenle fertilizasyon kapasitesinin azalmış olabileceği düşünülmüştür (68). Bizim çalışmamızda açıklanamayan infertilite grubuyla kontrol grubu arasında, İzumo1 proteininin sperm yüzeyinde sitokimyasal yöntemlerle gösterilmesi sonucunda anlamlı bir fark görülmemiştir. İzumo1 immünpozitifliğinin CD46 pozitifliğine eşlik etmediği spermelerin görülmesiyle Hayasaka ve arkadaşlarının çalışmasından ayrılmaktadır (37). İzumo1 pozitifliğinin görülmediği spermelerin çoğunda CD46 tutulumunun hücre sınırlarında izlenmesi, akrozom reaksiyonunun tamamlanmadığını ve İzumo1 proteininin yüzeye dağılmadığını düşündürmüştür. CD46 tutulumunun akrozomal alanda yaygın olmasına karşılık İzumo1 pozitifliğinin izlenmediği spermeler de bulunmaktadır. Bu spermeler, akrozom reaksiyonunu gerçekleştiren her spermin fertilizasyonu gerçekleştiremeyeceğini düşündürmüştür. İzumo1 fosforilasyonunun fertilizasyon potansiyeliyle ilişkili

olması gibi, proteinin akrozom reaksiyonu gerçekleştikten sonraki dağılımında gözlenen farklar, posttranslasyonel mekanizmalara bağlı olabilir (68).

Spermin dişi genital kanalında gerçekleştirdiği işlevsel değişimler biyokimyasal olarak düzenlenmiş bir süreçtir (69). Progesteron, kumulus ve granüloza hücrelerinden salgılanan bir steroid hormondur. Steroid hormonların ortak özelliği olan genomik etkilerinin yanında progesteronun hızlı etkileri olarak izlenen işlevleri de bulunmaktadır. Sperm gibi protein sentezinin yapılmadığı bir hücrede progesteronun hızlı etkileri önem kazanmaktadır. Sperm hücre zarında progesteron reseptörlerinin gösterildiği çalışmalar hızlı etkilerin açıklanması için öncü olmuştur (70). Progesteronun hücre içine girmeden, hamster spermelerinde hiperaktivasyon oluşturduğu ve bu etkinin fosfolipaz C üzerinden tirozin fosforilasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir (71). Sperm baş bölgesinde hücre zarında bulunan progesteron reseptörleri uyarıldıklarında hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonu artışı gerçekleşir ve akrozom reaksiyonu başlar (72). Progesteron konsantrasyonunda ve inkübasyon süresindeki değişimler, spermde farklı etkilere neden olmaktadır. Kumulus mikroçevresinde progesteron konsantrasyonları mikromolar düzeyinde olmasına karşın spermler nanomolar düzeyindeki progesteron konsantrasyonuna yanıt oluşturabilmektedir. 0,3 nM'dan 3 µM'a artan konsantrasyonda progesteron, spermelerde hücre içi kalsiyum konsantrasyon dalgalanmaları gerçekleştirmektedir. Bu dalgalanmaların gerçekleştiği hücrelerde akrozom reaksiyonunun daha az gerçekleştiği görülmüştür (73). Hücre içi pH azalmasının da kalsiyum dalgalanmalarına neden olabildiği ve progesteronun uyardığı akrozom reaksiyonunu engellediği görülmüştür (74). Kobay

spermelerinde progesteronun, fosfolipaz A₂ yoluyla akrozom ekzositozunu gerçekleştirdiği görülmüştür (75). 2,5 µM ve 15 µM progesteronla 15 dakika inkübe edilen fare spermelerinde gerçekleşen akrozom reaksiyonu incelendiğinde artan konsantrasyonun akrozom ekzositozunu arttırdığı izlenmiştir. Progesteronla birlikte gama amino bütirik asit (GABA) ve GABA antagonisti kullanıldığında; akrozom ekzositozunda progesterona ek olan GABA'nın olumlu, antagonistinin ise olumsuz etkisi izlenmiştir. Bu nedenle progesteronun GABA_A reseptörü üzerinden işlev gösterdiği düşünülmüştür (76). Progesteronun hücre zarı potansiyelini değiştirdiği de gösterilmiştir (77). Diğer bir önemli reseptör ana parçada bulunan pH bağımlı kalsiyum reseptörü "Catsper"dir. Bu reseptör hem hücre içi pH değişimiyle hem de progesteronla uyarılabilir. Catsper reseptörü uyarıldığında hücre içi kalsiyum artışı gerçekleşir. Kalsiyum artışıyla hiperaktivasyon gerçekleşir. Reseptörün bulunduğu yer nedeniyle kemotaksis sağlanır. Kalsiyum artışının başa doğru yayılmasıyla akrozom ekzositozu gerçekleşir. İnsan sperminde progesteron nanomolar düzeyindeki konsantrasyonlarla Catsper reseptörünü uyarabilir. Fakat fare sperminde 10 µM progesteronla bile insan spermindeki etki oluşturulamamıştır (78). Üç saatlik direkt yüzdürme ve kapasitasyon sonrası progesteronla inkübe edilen spermelerde Casper1 reseptörlerinin incelendiği bir çalışmada, astenozoospermik hastalarda Catsper1 reseptörünün daha az olduğu görülmüştür. Ayrıca hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının direkt yüzdürme yöntemiyle seçilmiş spermelerde daha yüksek olduğu görülmüştür (36). Bir saatlik direkt yüzdürme sonrasında 1 µM progesteronla 30 dakika inkübe edilen bir çalışmanın sonuçları ilgi

uyandırmaktadır. Akrozom reaksiyonu gerçekleştiren sperm yüzdesi progesteron kullanılmayan grupta %10'a ulaşamazken, progesteronla %20'yi geçmiştir. Progesteronun bu etkisi Catsper reseptör antagonistleriyle engellenebilmiştir (79). Progesteronun akrozom reaksiyonunu gerçekleştiren Catsper'den farklı reseptörler üzerinden işlev gösterdiğini düşündüren çalışmalar da vardır. Düşük konsantrasyonda progesteronun (10 ve 100 nM) tirozin kinaz artışıyla sperm hareketini arttırırken, yüksek konsantrasyonda (1, 5 ve 10 μ M) hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonunu gerçekleştirdiği görülmüştür. Çalışma sırasında progesteronun doz etkisinin yanı sıra inkübasyon süresiyle işlevi arasındaki ilişki de incelenmiştir. On dakika, otuz dakika ve bir saat süresince inkübe edilen spermelerde akrozom reaksiyonunun süreyle birlikte arttığı görülmüştür. Farklı proteinlerin fosforilasyonunun da artması, progesteronun yüksek dozda, çoklu kinaz yollarını etkilediği şeklinde yorumlanmıştır (80). Akrozom reaksiyonunu gerçekleştiren spermelerin üremeye yardımcı tedavilerle ilişkisini inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Fertil ve infertil erkeklerin ejakülatlarında akrozom reaksiyonu geçirmiş spermelerin değerlendirildiği bir çalışmada, erkek faktör infertilitesi görülen hastaların ejakülatlarında akrozom bütünlüğü korunmuş spermelerin fertil kontrollere göre az olduğu görülmüş, bunun fertilizasyon başarısızlığıyla sonuçlanabileceğini düşünülmüştür. Ayrıca normozoospermik infertil hastalarda da akrozom bütünlüğünün koruyan spermelerin az olduğu vakalarda fertilizasyon başarısızlığı olabileceği, bu nedenle tedavi yönteminin seçilmesinde akrozom durumunun değerlendirilmesinin yararlı olabileceği belirtilmiştir (81). Progesteronla akrozom reaksiyonu gerçekleştiren sperm

yüzdeleriyle in vitro fertilizasyon sonuçları da karşılaştırılmıştır. Progesteronla akrozom reaksiyonu gerçekleştiren sperm yüzdelerinin arttığı fakat bu sonucun fertilizasyon hızı ve embriyo kalitesiyle anlamlı bir ilişkisinin olmadığı gösterilmiştir (82). İzumo1 proteininin akrozom ekzositozunu tamamlamış spermelerde izlenmesi nedeniyle çalışmamızda akrozom reaksiyonu gerçekleştirmeye çalışıldı. Akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmek için kesintili dansite gradyanıyla seçilen spermeler, bir saat yüksek doz (10 μ M) progesteronla inkübe edildi. Bunun sonucunda grup birde akrozom reaksiyonu gerçekleştirmeyen (tek pozitif) sperm yüzdesinin, grup ikiden az olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu nedenle progesteronla uyarılmış akrozom reaksiyonunun gerçekleşmemesi, infertiliteyi açıklayabilecek bir neden olarak gösterilememektedir. Ayrıca progesteron dozunun ve süresinin akrozom reaksiyonu üzerinde etkileri göz önünde bulundurularak, doz ve süre değişimleriyle akrozom reaksiyonunu gerçekleştirilerek İzumo1 pozitifliğinin değerlendirmesi yapılabilir. Progesteronun etkilerini farklı reseptörler ve yollar üzerinden gerçekleştirdiği düşünüldüğünde, akrozom ekzositozunu tamamlamayan spermelerde bu yolların incelendiği çalışmalarla infertilite nedenlerine ilişkin sonuçlar araştırılabilir.

Yaptığımız deneyler sonucunda iki grupta da tek pozitif sperm yüzdesinin sıfır ya da yüz olarak bulunduğu örnekler görüldü. Aynı koşullar altındaki spermelerde böylesine uç yanıtlar alındığı için, tek pozitiflikle ilişkili olabilecek parametreler araştırıldı. Bu nedenle grup bir, iki ve tüm araştırma evreninde normal morfoloji, baş anomalisi ve anilin negatifliğiyle tek pozitif spermelerin

ilişkisi incelendi. Gruplar içinde ve toplu olarak yapılan değerlendirmelerde, tek pozitif (%) ve normal morfoloji (%) parametreleri arasında anlamlı ilişki bulunmadı. Tüm araştırma evreninde baş anomalisi (%) ve tek pozitiflik arasında zayıf pozitif ilişki görülürken gruplar içinde böyle bir ilişki bulunmadı. Bu sonuçlar infertilite statüsünden bağımsız şekilde, semen analizi sonuçları normal sınırlarda olan kişilerin ejakülatlarında baş anomalisi görülen spermilerin fazla olduğu örneklerde progesteronla uyarılmış akrozom reaksiyonunu gerçekleştiremeyen spermilerin daha fazla olduğunu göstermektedir. Ayrıca üç pozitif sperm yüzdelerinin baş anomalileriyle ilişkisi karşılaştırıldığında tüm evrende ve grup ikide anlamlı negatif ilişki görülmüştür. Grup birde ise anlamlı ilişki izlenmemiştir. İzumo1 negatifliği ve DAPI negatifliği gibi kısıtlı sayıda örnekte görülen farklar bu değişimlere neden olabilir. Özellikle grup ikide üç pozitif spermilerle baş anomalisinin anlamlı negatif ilişki göstermesine karşın, tek pozitiflik ve baş anomalisinin ilişki göstermemesi istatistiksel hesaplamalara bağlı bir değişim olduğunu düşündürmektedir. Grup ikide tek pozitif ve baş anomalisi ilişkisinin Pearson korelasyon testiyle değerlendirilmesi sonrası anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Ancak veriler normal dağılım göstermediği için Spearman katsayısıyla değerlendirilmesi ve anlamlı bir ilişkinin olmadığı sonucu daha uygun bulunmuştur. Morfoloji değerlendirmesinde, DSÖ alt sınırı normal morfoloji gösteren spermier için belirlemiştir. Sperm anomalilerindeki çeşitlilik ve çalışmalarda bu anomalilere ilişkin ayrıntılı bilgiler verilmemesi gibi nedenlerle morfoloji ve infertilite ilişkisi kurulan durumlar spermilerin tamamına yakınının etkilendiği globozoospermi gibi hastalıklardır. Morfoloji

değerlendirmesinin daha güvenilir hale getirilmesi için anomalilerin ayrıntılı olarak değerlendirildiği indekslerin geliştirilmesi önerilmektedir (83). Çalışmamızda, çekirdek ve akrozom anomalileri gibi farklı anomalilerin içinde bulunduğu baş anomalilerinin ayrıntılı şekilde incelenmemesi kurulan ilişkinin gücünü azaltmış olabilir. Ekzositozu düzenleyen pek çok olayın gerçekleştiği baş bölgesinde morfolojik olarak saptanan anomalilerin akrozom reaksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir. Ana parçada yer alan Catsper reseptörlerinin akrozom reaksiyonu üzerindeki etkisi vardır. Bizim çalışmamızda baş anomalisine eşlik eden orta ve ana parça anomalileri birlikte değerlendirilmiştir. Anomalilerin değerlendirmesinin ayrıntılı olarak yapılmaması çalışmamızı kısıtlamaktadır. Sperm fenotipinin ayrıntılı şekilde belirlenmesi altta yatan patolojiye yönelik kesin bilgi sunmasa da klinik, genetik ve epidemiyolojik çalışmalarda yarar sağlayabilir (84).

Sperm seçiminde en yaygın kullanılan yöntemler kesintili dansite gradyan ve direkt yüzdürme yöntemleridir. Kesintili dansite gradyan santrifüjüyle, kısa sürede daha yüksek kapasitasyon potansiyeline sahip spermeler seçildiği için çalışmamızda bu yöntem kullanılmıştır (85). Yüksek yoğunluktaki solüsyonlarla santrifüj edilen semenden, hareket ve morfoloji yönünden daha iyi spermeler ayrılır (86, 87). Protamin eksikliği ve DNA kırıklarının görüldüğü sperm yüzdelerinin santrifüj sonrası, semendekine göre azaldığı görülmüştür (88). Ayrıca direkt yüzdürme yöntemiyle seçilen spermelerde in vitro fertilizasyon için inkübasyon sonrası gelişen DNA hasarı, kesintili dansite gradyanıyla seçilenlere göre daha fazla görülmüştür (89). Bizim çalışmamızda anilin mavisiyle protamin eksikliği

olan spermiler gösterilmiştir. Çalışmamızı planlarken santrifüj ve akrozom reaksiyonu sonrasında protamin değerlendirilmesinin hipotezimizin test edilmesi için gerekli olduğu düşünülmemiştir. Bu parametrelerin de değerlendirildiği başka çalışmalar planlanabilir.

Akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmeyen spermle (tek pozitif), protamin eksikliği olmayan spermle (anilin negatif) arasında tüm araştırma evreninde ve gruplar içinde istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki görülmektedir. Olgun spermle daha yüksek oranda izlendiği örneklerde progesterona yanıtın az olması spermin fizyolojik süreçte izlediği yolların gözden geçirilmesini gerektirmektedir. Kapasitasyon spermin dışı genital kanalda geçirdiği değişimdir ve saatler sürebilir. İn vitro kapasitasyon gerçekleştirildikten sonra anilin mavisiyle pozitif reaksiyon gösteren sperm yüzdesinin artmasına karşın bu artışa DNA hasarı eşlik etmemektedir. Kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesiyle kromatinde çözümler artarken DNA hasarının görülmemesi fertilizasyonun gerçekleşmesi için yapılan hazırlık olarak yorumlanmaktadır. Kromatin yoğunlaşması sırasında protaminle yer değiştirmeyen histonlar embriyonik gelişim için gerekli genle ilişki içindedir. Bu ilişki sperm genetik materyalinin paketlenmesinin fertilizasyon sonrası kullanılacak genlerin önceliğinin dikkate alınarak yapıldığını düşündürmektedir (90). Fosfatidilserin hücre zarının iç katmanında bulunur. Anneksin V (An) hücre zarının dış katmanına çıkmış fosfatidilserinleri işaretlerken, propidium iodide (PI) hücre zarının bütünlüğünün bozulduğu durumlarda hücreye girebilir. Bu nedenle $An^{+}PI^{+}$ hücrelerin apoptozisin erken evresinde, $An^{+}PI^{+}$ hücrelerin ise geç

evresinde olduğu düşünülür. Fosfatidil serinin hücre zarının dış yaprağında görülmesi kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda da gerçekleşir. Erken apoptozis belirteci olan An^+PI^- kapasitasyonu da temsil etmektedir. Bu nedenle kapasitasyon, fertilizasyonu gerçekleştiremeyen spermi bekleyen sonun başlangıcı olarak yorumlanır. Kapasitasyonu gerçekleştiren sperm yüzdesinin artması intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrası fertilizasyon hızını arttırmaktadır. Kromatin yoğunlaşmasını tamamlamamış sperm yüzdesiyle geç apoptozis arasında negatif ilişki belirlenmişken, kapasitasyon arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (91). Bizim çalışmamızda ise olgun spermlerin daha çok olduğu örneklerde, anlamlı olarak daha az spermin akrozom reaksiyonunu tamamladığı görülmüştür. Kapasitasyon belirteçleri incelenmediği için spermlerin kapasite olup olmadıklarına ilişkin yorum yapılamamaktadır. Fakat kromatin yoğunlaşmasını tamamlamamış spermlerin çok olduğu örneklerin progesteronla akrozom ekzositozunu gerçekleştirmeleri, kromatin yoğunlaşması sürecinde spermde gerçekleşen olayların sperm işlevi üzerine etkili olabileceğini düşündürmektedir. Olgun spermlerde bulunan mRNA'lar spermatogenez ve spermiyogenezin mirasları olarak değerlendirilir. Bu mRNA'ların fertilizasyon potansiyeli ve embriyo gelişimi için önemli olduğu bilinmektedir. İlerleyen çalışmalarda, akrozom reaksiyonu için önemli olan mRNA'lar değerlendirilerek çalışmamızda bulunan akrozom reaksiyonu ve kromatin yoğunlaşması ilişkilerinin nedenleri açıklanabilir (92).

Fertilizasyonu gerçekleştiren spermi, ejakulatta bulunan diğer spermlerden ayıran en önemli özelliği dışı tarafından seçilmesidir. Bu seçimde tuba uterina

epiteli, kumulus hücreleri ve oositin rolü vardır. Üremeye yardımcı tedavilerde bu seçimler atlanmaktadır. Bunun insanın evrimsel sürecine etkileri göz önünde bulundurularak planlanması gerekmektedir (93). 1978’de ilk İVF bebeği Louise Brown’ın doğmasının ardından hızla gelişen yöntemlerle günümüzde dünya genelinde yılda yüzbinlerce İVF bebeği dünyaya gelmektedir. Yapılan hesaplamalarla İVF bebeklerinin logaritmik bir şekilde artacağı öngörülmektedir (94). 1945’te “Penisilinin Keşfi” nedeniyle verilen Nobel Tıp Ödülü’nün üstünden yüz yıl geçmemişken antibiyotik direnci tüm dünyada sağlık sisteminde en önemli sorunlardan biri haline gelmiştir (95). Bu tıbbi gelişmelerin kontrolsüz kullanımına en etkileyici örneklerden biridir. 2010 yılında Nobel Tıp Ödülü “İn Vitro Fertilizasyonun Geliştirilmesi” nedeniyle verilmiştir. İlk İVF bebeğinden bugüne kadar dünyaya gelmiş milyonlarca bebeğin yanı sıra başarısızlıkla sonuçlanmış çok daha fazla tedavi girişimi bulunmaktadır. İnsan üretmenin getirdiği sorumlulukla, yapılan bütün işlemlerin bilimsel gelişmelere uygun olması gerekmektedir. Üreme biyolojisine ilişkin ortaya konulan her bilgi yeni soruları ortaya çıkarmaktadır. Tedavi başarılarının arttırılması gibi ölçülebilir sonuçlar bilinmeyenlerin çözülmesine bağlıdır. Çalışmamızda açıklanamayan infertilitenin, fertilizasyon için gerekli İzumo1 proteininin sperm yüzeyinde görülmesindeki azalmayla açıklanıp açıklanamayacağı araştırılmış ve yalın olarak İzumo1 negatifliği ile infertilite açıklanamamıştır. Akrozom reaksiyonunu gerçekleştirdiği halde İzumo1 proteini görülmeyen spermlerin olması, spermin fizyolojik işlevlerini yerine getirebilmesinin fertilizasyonu gerçekleştirebileceği anlamına gelmediğini düşündürmüştür. Çift başlı ya da çekirdeksiz spermlerde

akrozom reaksiyonu sonrası İzumo1 proteini görülmüştür. Anomalilere sahip olan hatta çekirdeği olmayan hücrelerin bile fertilizasyonu gerçekleştirme ihtimali bulunmaktadır. Tüm gebeliklerin %10 -15'inin ilk üç ay içinde düşükle sonuçlandığı ve bu düşüklerin çoğunun nedeninin kromozom anomaliler olduğu düşünülürse fertilizasyonun “mükemmel” olduğunu iddia etmek yanlış olur (96). İzumo1 proteiniyle ilgili verilerin yanında akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesine ilişkin bulgularımız yeni araştırma konularının belirlenmesine yardımcı olmuştur. Akrozom reaksiyonunu gerçekleştirme, kromatin yoğunlaşması ve morfoloji gibi yapısal ve işlevsel özelliklerin birlikte değerlendirilmesiyle sperme ilişkin bilinmeyenler aydınlatılabilir. Gametogenezden başlayarak fertilizasyona kadar devam eden maratonun her parkuru infertilite araştırmalarında değerlendirilmelidir. Bu çalışmayla tedavide kullanılacak “mükemmel” spermin bulunmasına ilişkin sonuç ortaya konulmamıştır. Mükemmeli bulmak yerine, elimizdekileri tanıma ve en uygunu seçme yöntemlerinin geliştirilmesi daha gerçekçi ve ulaşılabilir bir hedef olabilir.

6 SONUÇ

Açıklanamayan infertilite hastalarıyla (grup iki, n=30), fertilizasyon sorunu bulunmayan gönüllülerin (grup bir, n=18) iki gruba ayrıldığı bu çalışmada ulaşılan sonuçlar şu şekildedir:

- ◆ Gruplar arasında yaş ortalaması ve semen analiziyle değerlendirilen parametreler (semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, hareketli sperm yüzdesi ve ileri hareketli sperm yüzdesi) karşılaştırılması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.
- ◆ Kromatin yoğunlaşmasının değerlendirildiği asidik anilin mavisiiyle boyanmayan sperm yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterilememiştir.
- ◆ Akrozom reaksiyonunu gerçekleştiren sperm yüzdesi açıklanamayan infertilite grubunda düşük olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı değildir.
- ◆ Akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmesine karşın, İzumo1 pozitifliği izlenmeyen spermilerin yanı sıra, çekirdeksiz ya da çift çekirdekli spermelerde İzumo1 pozitifliği görülmüştür.
- ◆ Akrozom reaksiyonunun gerçekleştiği sperm yüzdesinin, %0 dan %100 e, iki uç noktada izlenmesi nedeniyle farklı parametrelerle akrozom ekzositozunu tamamlama ilişkisi incelenmiştir. Bu inceleme tüm araştırma evreninde, grup bir ve grup ikide ayrı ayrı yapılmıştır:
 - Tüm araştırma evreninde, grup bir ve grup ikide kromatin yoğunlaşmasını tamamlamış sperm yüzdesiyle sperm morfolojisi arasında anlamlı ilişki görülmemiştir. Tüm araştırma evreninde, grup bir ve grup ikide normal

morfoloji gösteren sperm yüzdesiyle akrozom reaksiyonu gerçekleştiren sperm yüzdesi arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir.

- Tüm araştırma evreninde **baş anomalisi** görülen sperm yüzdesiyle **akrozom reaksiyonu gerçekleştiren** sperm yüzdesi arasında istatistiksel olarak **anlamlı negatif yönde** bir ilişki gösterilmiştir. Grup ikide benzer bir ilişki görülürken, grup birdeki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Örneklem büyümesiyle ve baş anomalilerinin ayrıntılı değerlendirilmesiyle daha kuvvetli ilişkilerin ortaya koyulabileceği düşünülmüştür.
- Tüm araştırma evreninde, grup bir ve grup ikide **kromatin yoğunlaşmasını tamamlayan** ve **akrozom reaksiyonu gerçekleştiren** sperm yüzdeleri arasında istatistiksel olarak **anlamlı negatif yönde** bir ilişki gösterilmiştir. Kromatin yoğunlaşmasıyla akrozom reaksiyonu gerçekleşmesi arasındaki bu ilişkinin spermiyogenez sırasında meydana gelmiş olabilecek bir değişim nedeniyle oluşabileceğini düşündürmüştür.
- ◆ Örneklem sayısı çalışmanın en büyük kısıtlılığıdır. Gruplar arasında akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da akrozom ekzositozunu tamamlamak gibi işlevsel bir özelliğin, baş anomalisi ve kromatin yoğunlaşması gibi yapısal özelliklerle ilişkili olması çalışmanın sonuçları arasında dikkat çekmektedir. Bu bağlamda, spermin yapısal ve işlevsel özellikleri arasındaki ilişkilerin nedenlerini ortaya koyacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7 KAYNAKLAR

1. Hanevik HI, Hessen DO, Sunde A, Breivik J. Can IVF influence human evolution? *Human Reproduction*. 2016;31(7):1397-402.
2. Bianchi E, Wright GJ. Sperm Meets Egg: The Genetics of Mammalian Fertilization. *Annu Rev Genet*. 2016;50:93-111.
3. Sabetian S, Shamsir MS. Deficiency in Sperm–Egg Protein Interaction as a Major Cause of Fertilization Failure. *The Journal of Membrane Biology*. 2017;250(2):133-44.
4. Esteves SC, Sharma RK, Gosálvez J, Agarwal A. A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility. *International Urology and Nephrology*. 2014;46(6):1037-52.
5. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and cell biology : an introduction to pathology*. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2016.
6. Ross MH, Pawlina W, Baykal B. *Histology : konu anlatimi ve atlas*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2014.
7. Piprek RP. *Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development*: Springer; 2016.
8. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*. 2004;25(5):747-806.
9. de Rooij DG. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*. 2017;144(17):3022-30.
10. Delilbaşı L. *İn Vitro Fertilizasyon Laboratuvar Yöntemleri: Güneş Tıp Kitabevi*; 2008.
11. Ito C, Toshimori K. Acrosome markers of human sperm. *Anatomical science international*. 2016;91(2):128-42.
12. Chen S-R, Batool A, Wang Y-Q, Hao X-X, Chang C-S, Cheng CY, et al. The control of male fertility by spermatid-specific factors: searching for contraceptive targets from spermatozoon's head to tail. *Cell death & disease*. 2016;7(11):e2472.
13. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *Journal of Andrology*. 2006;27(6):890-8.
14. Gervasi M, Visconti P. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*. 2017;5(2):204-18.
15. Sullivan R, Mieusset R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human reproduction update*. 2016;22(5):574-87.
16. Aitken RJ, Nixon B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular human reproduction*. 2013;19(12):785-93.
17. Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization. *International journal of molecular medicine*. 2016;38(4):979-86.
18. Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, et al. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(7):2614-22.

19. Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N, Shimizu T. Structure of IZUMO1–JUNO reveals sperm–oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature*. 2016;534(7608):566.
20. Baker MA, Hetherington L, Weinberg A, Naumovski N, Velkov T, Pelzing M, et al. Analysis of phosphopeptide changes as spermatozoa acquire functional competence in the epididymis demonstrates changes in the post-translational modification of Izumo1. *Journal of proteome research*. 2012;11(11):5252-64.
21. Sebkova N, Ded L, Vesela K, Dvorakova-Hortova K. Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction. *Reproduction*. 2014;147(2):231-40.
22. Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm–egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci*. 2012;125(21):4985-90.
23. Aydin H, Sultana A, Li S, Thavalingam A, Lee JE. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature*. 2016;534(7608):562.
24. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*. 2012;62(2):324-32.
25. WHO. WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi: Türk Üroloji Derneği; 2011.
26. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of assisted reproductive techniques fourth edition: volume 1: Laboratory perspectives: CRC press; 2012.
27. Chi H-J, Kwak S-J, Kim S-G, Kim Y-Y, Park J-Y, Yoo C-S, et al. Efficient isolation of sperm with high DNA integrity and stable chromatin packaging by a combination of density-gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2016;43(4):199-206.
28. Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, Asghar W. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnology advances*. 2016;34(5):578-87.
29. Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *Journal of andrology*. 2010;31(6):566-72.
30. Huang M-T, Kuo-Kuang Lee R, Lu C-H, Chen Y-J, Li S-H, Hwu Y-M. The efficiency of conventional microscopic selection is comparable to the hyaluronic acid binding method in selecting spermatozoa for male infertility patients. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 54(1):48-53.
31. Beck-Fruchter R, Shalev E, Weiss A. Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2016;32(3):286-98.
32. Esteves SC, Chan P. A systematic review of recent clinical practice guidelines and best practice statements for the evaluation of the infertile male. *International urology and nephrology*. 2015;47(9):1441-56.

33. Chan PJ, Corselli JU, Jacobson JD, Patton WC, King A. Spermac stain analysis of human sperm acrosomes. *Fertility and sterility*. 1999;72(1):124-8.
34. Torabi F, Binduraimhem A, Miller D. Sedimentation properties in density gradients correspond with levels of sperm DNA fragmentation, chromatin compaction and binding affinity to hyaluronic acid. *Reproductive biomedicine online*. 2017;34(3):298-311.
35. Bungum M, Spano M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART. *Human Reproduction*. 2007;23(1):4-10.
36. Tamburrino 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 acrosome reaction. *Human Reproduction*. 2014;29(3):418-28.
37. Hayasaka S, Terada Y, Inoue N, Okabe M, Yaegashi N, Okamura K. Positive expression of the immunoglobulin superfamily protein IZUMO on human sperm of severely infertile male patients. *Fertility and sterility*. 2007;88(1):214-6.
38. Kashir J, Buntwal L, Nomikos M, Calver BL, Stamatiadis P, Ashley P, et al. Antigen unmasking enhances visualization efficacy of the oocyte activation factor, phospholipase C zeta, in mammalian sperm. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2017;23(1):54-67.
39. Belloc S, Benkhalifa M, Junca AM, Dumont M, Bacrie PC, Ménéz Y. Paternal age and sperm DNA decay: discrepancy between chromomycin and aniline blue staining. *Reproductive biomedicine online*. 2009;19(2):264-9.
40. Ren H, Ferguson K, Wong E, Chow V, Ma S. The consequences of somatic sex chromosomal abnormalities on meiosis and sperm production in infertile men. *Fertility and Sterility*. 2016;106(3):e235-e6.
41. Pan MM, Hockenberry MS, Kirby EW, Lipshultz LI. Male Infertility Diagnosis and Treatment in the Era of In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Medical Clinics of North America*. 2017.
42. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and sterility*. 2014;102(6):1502-7.
43. Somigliana E, Paffoni A, Busnelli A, Filippi F, Pagliardini L, Vigano P, et al. Age-related infertility and unexplained infertility: an intricate clinical dilemma. *Human Reproduction*. 2016;31(7):1390-6.
44. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained male infertility: diagnosis and management. *International braz j urol*. 2012;38(5):576-94.
45. Venkatesh S, Shamsi M, Deka D, Saxena V, Kumar R, Dada R. Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men. *The Indian Journal of Medical Research*. 2011;134(3):396.
46. Zandieh Z, Vatannejad A, Doosti M, Zabihzadeh S, Haddadi M, Bajelan L, et al. Comparing reactive oxygen species and DNA fragmentation in semen samples of unexplained infertile and healthy fertile men. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*. 2017.

47. Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing research reviews*. 2015;19:22-33.
48. Alshahrani S, Agarwal A, Assidi M, Abuzenadah AM, Durairajanayagam D, Ayaz A, et al. Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):103.
49. Kaarouch I, Bouamoud N, Madkour A, Louanjli N, Saadani B, Assou S, et al. Paternal age: Negative impact on sperm genome decays and IVF outcomes after 40 years. *Molecular reproduction and development*. 2018.
50. Sharma R, Agarwal A, Rohra VK, Assidi M, Abu-Elmagd M, Turki RF. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015;13(1):35.
51. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2009;16(1):30-6.
52. Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V, Balaiah D. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Andrologia*. 1999;31(5):277-82.
53. Sadeghi M, Lakpour N, Heidari-Vala H, Hodjat M, Amirjannati N, Hossaini Jadda H, et al. Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):645-51.
54. Talebi A, Vahidi S, Aflatoonian A, Ghasemi N, Ghasemzadeh J, Firoozabadi R, et al. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia*. 2012;44(s1):462-70.
55. Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, et al. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2009;26(11-12):591-6.
56. Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, Kammoun M, Meniaoui I, Sallem A, et al. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility*. 2016;105(1):58-64.
57. Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, Jellad S, Vanderzwalmen P, Balet R, et al. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertility and sterility*. 2009;92(5):1616-25.
58. Cassuto NG, Hazout A, Hammoud I, Balet R, Bouret D, Barak Y, et al. Correlation between DNA defect and sperm-head morphology. *Reproductive BioMedicine Online*. 2012;24(2):211-8.
59. Okabe M, Adachi T, Takada K, Oda H, Yagasaki M, Kohama Y, et al. Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads

- and its relation to fertilization rate in vitro. *Journal of reproductive immunology*. 1987;11(2):91-100.
60. Okabe M, Yagasaki M, Oda H, Matzno S, Kohama Y, Mimura T. Effect of a monoclonal anti-mouse sperm antibody (OBF13) on the interaction of mouse sperm with zona-free mouse and hamster eggs. *Journal of reproductive immunology*. 1988;13(3):211-9.
 61. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 2005;434(7030):234.
 62. Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, et al. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development*. 2013;140(15):3221-9.
 63. Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;377(3):910-4.
 64. Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, Yoon S-Y, Fissore RA, Johnson GR, et al. Tssk6 is required for Izumo relocation and gamete fusion in the mouse. *Journal of cell science*. 2009;122(15):2741-9.
 65. Naz RK. Immunocontraceptive effect of Izumo and enhancement by combination vaccination. *Molecular Reproduction and Development*. 2008;75(2):336-44.
 66. Clark S, Naz RK. Presence and Incidence of Izumo Antibodies in Sera of Immunoinfertile Women and Men. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013;69(3):256-63.
 67. Granados-Gonzalez V, Aknin-Seifer I, Touraine R-L, Chouteau J, Wolf J-P, Levy R. Preliminary study on the role of the human IZUMO gene in oocyte-spermatozoa fusion failure. *Fertility and sterility*. 2008;90(4):1246-8.
 68. Young SA, Aitken J, Baker MA. Phosphorylation of Izumo1 and its role in male infertility. *Asian journal of andrology*. 2015;17(5):708.
 69. Sun X-h, Zhu Y-y, Wang L, Liu H-l, Ling Y, Li Z-l, et al. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017;15(1):65.
 70. Jin S-K, Yang W-X. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*. 2017;8(2):3600.
 71. Noguchi T, Fujinoki M, Kitazawa M, Inaba N. Regulation of hyperactivation of hamster spermatozoa by progesterone. *Reproductive Medicine and Biology*. 2008;7(2):63-74.
 72. Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(1):46.
 73. Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte induction of $[Ca^{2+}]$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(44):46315-25.
 74. Esperanza M-M, Alberto D. pH-dependent Ca^{+2} oscillations prevent untimely acrosome reaction in human sperm. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018.

75. Shi Qx, Chen W, Yuan Y, Mao L, Yu S, Chen A, et al. Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Journal of cellular physiology*. 2005;205(3):344-54.
76. Roldan E, Murase T, Shi Q. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*. 1994;266(5190):1578-81.
77. Patrat C, Serres C, Jouannet P. Progesterone induces hyperpolarization after a transient depolarization phase in human spermatozoa. *Biology of reproduction*. 2002;66(6):1775-80.
78. Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*. 2011;471(7338):387.
79. Ghanbari H, Keshtgar S, Kazeroni M. Inhibition of the CatSper Channel and NOX5 Enzyme Activity Affects the Functions of the Progesterone-Stimulated Human Sperm. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2018;43(1):18.
80. Sagare-Patil V, Galvankar M, Satiya M, Bhandari B, Gupta S, Modi D. Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *International journal of andrology*. 2012;35(5):633-44.
81. Egeberg Palme DL, Rehfeld A, Bang AK, Nikolova KA, Kjærulff S, Petersen MR, et al. Viable acrosome-intact human spermatozoa in the ejaculate as a marker of semen quality and fertility status. *Human Reproduction*. 2018.
82. Jiang T, Qin Y, Ye T, Wang Y, Pan J, Zhu Y, et al. Correlation analysis of the progesterone-induced sperm acrosome reaction rate and the fertilisation rate in vitro. *Andrologia*. 2015;47(8):945-50.
83. Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri R. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*. 2017.
84. Auger J, Jouannet P, Eustache F. Another look at human sperm morphology. *Human Reproduction*. 2015;31(1):10-23.
85. Luppi S, Martinelli M, Giacomini E, Giolo E, Zito G, Garcia RC, et al. Comparative proteomic analysis of spermatozoa isolated by swim-up or density gradient centrifugation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015;13(1):36.
86. Yao Y, Ng V, Yeung W, Ho P. Profiles of sperm morphology and motility after discontinuous multiple-step Percoll density gradient centrifugation. *Andrologia*. 1996;28(2):127-31.
87. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Systems biology in reproductive medicine*. 2015;61(1):1-12.
88. Tavalae M, Parivar K, Shahverdi A-H, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. Status of sperm-born oocyte activating factors (PAWP, PLC ζ) and sperm chromatin in uncapacitated, capacitated and acrosome-reacted conditions. *Human Fertility*. 2017;20(2):96-103.

89. Zhang X-D, Chen M-Y, Gao Y, Han W, Liu D-Y, Huang G-N. The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. *Human Fertility*. 2011;14(3):187-91.
90. Lamirande E, Gabriel M, Zini A. Human sperm chromatin undergoes physiological remodeling during in vitro capacitation and acrosome reaction. *Journal of andrology*. 2012;33(5):1025-35.
91. Tavalae M, Deemeh M, Arbabian M, Kiyani A, Nasr-Esfahani M. Relationship between fertilization rate and early apoptosis in sperm population of infertile individuals. *Andrologia*. 2014;46(1):36-41.
92. Galeraud-Denis I, Lambard S, Carreau S. Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. *Asian journal of andrology*. 2007;9(5):587-92.
93. Firman R. Postmating sexual conflict and female control over fertilization during gamete interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018.
94. Faddy MJ, Gosden MD, Gosden RG. A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018.
95. Tacconelli E, Sifakis F, Harbarth S, Schrijver R, van Mourik M, Voss A, et al. Surveillance for control of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18(3):e99-e106.
96. Massalska D, Zimowski JG, Bijok J, Pawelec M, Czubak-Barlik M, Jakiel G, et al. First trimester pregnancy loss: clinical implications of genetic testing. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2017;43(1):23-9.

8 ÖZET

İzumo1 proteininin sperm değerlendirme parametreleriyle ilişkisinin fertilite statüsüne göre incelenmesi

Açıklanamayan infertilite, infertilite şikayetiyle başvuran çiftlerin yaklaşık %15'ini oluşturur. İzumo1 proteini, akrozom reaksiyonu sonrasında spermden görülen, spermin oositle birleşmesi için gerekli bir proteindir. Bu çalışmada açıklanamayan infertilitede İzumo1 proteininin görülmesinde azalma olup olmadığı; İzumo1 proteininin, semen analizi sonuçları ve kromatin yoğunlaşmasıyla ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun izniyle yürütüldü. İki yıl korunmasız cinsel ilişkiye karşı gebelik oluşturamamış, açıklanamayan infertilite hastası 30 gönüllü (grup 2) ve bir yıl içinde kendiliğinden gebelik oluşturabilmiş 18 gönüllüden (grup 1) bilgilendirilmiş onam sonrası semen örnekleri alındı. Semen analizi sonrası anilin mavisi ile kromatin yoğunlaşması değerlendirildi. Kesintili dansite gradyanıyla elde edilen spermelerde, 10 µM progesteronla bir saat inkübasyon sonrası akrozom reaksiyonunun gerçekleştirilmesi hedeflendi. İzumo1 ve CD46 proteinlerine karşı geliştirilmiş antikorlarla ve DAPI ile immünfloresans inceleme yapıldı. Veri dağılımının özelliğine göre uygun istatistik testleri kullanıldı.

Gruplar arasında yaş, semen analizi, kromatin yoğunlaşmasını tamamlamış sperm yüzdeleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Üçlü immünfloresans inceleme sonrası spermeler dört gruba ayrıldı: Üç pozitif, İzumo1 negatif, DAPI pozitif ve DAPI negatif. DAPI negatif ve İzumo1

negatif spermiler az sayıda örnekte görüldüğü için istatistiksel değerlendirme yapılmadı. Üç pozitif sperm yüzdesi grup birde fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi. Anilin negatif ve üç pozitif sperm yüzdeleri arasındaki ters ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Baş anomalisi ve üç pozitif sperm yüzdeleri arasındaki ters ilişki, grup birde anlamlı değilken grup ikide anlamlıydı.

Bu çalışmayla, açıklanamayan infertilite hastalarında infertilite İzumo1 eksikliğiyle ilişkilendirilemese de İzumo1 proteininin akrozom reaksiyonunu tamamlayan her spermde olmadığı, spermin yapısal (kromatin yoğunlaşması, baş anomalisi) özellikleriyle işlevsel özelliklerinin (akrozom reaksiyonu) ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yapısal ve işlevsel ilişkilerin inceleneceği çalışmalarla infertilite tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesi sağlanabilir.

Anahtar kelimeler: Akrozom, İzumo1, sperm

9 SUMMARY

Examination of relationship between Izumo1 protein and sperm parameters, according to fertility status.

Unexplained infertility accounts to 15% of infertile couples. Izumo1 protein is necessary for sperm oocyte fusion and seen after acrosome reaction. Aim of this study is examine whether decrease in the appearance of Izumo1 protein in unexplained infertility and evaluate the relationship between Izumo1, semen analysis results and chromatin condensation.

The study was conducted with the permission of Gazi University Clinical Research Ethics Committee. Semen samples obtained after informed consent from male partner of couples belong group 1 and 2. 30 unexplained infertile patients which had no spontaneous pregnancy in two years (group 1) and 18 subjects had spontaneous pregnancy within last one year (group 2). After semen analysis chromatin condensation examined with aniline blue. Sperms selected with density gradient centrifugation. Acrosome reaction is induced with 10 μ M progesterone in 1 hour. Appropriate statistical analysis were carried out based on data distribution.

Age, semen analysis and chromatin condensation results didn't show significant differences between groups. "Triple positive", "DAPI positive", "Izumo1 negative" and "DAPI negative" classification was made based on triple immunofluorescence results. Since limited number of Izumo1 negative and DAPI negative sperms statistical analyzes haven't conducted. Despite triple positive sperm percent was higher in group 1 than 2, the difference was statistically insignificant. There is significant negative correlation between aniline negative

and triple positive sperm percent. The negative correlation between head anomalies and triple positive sperm percent was significant in group 2 but not in group 1.

There wasn't sufficient data that explains infertility by Izumo1 deficiency. However it is reported that Izumo1 protein couldn't be seen in every sperm undergoes acrosome reaction and structural properties of sperm (head anomalies, chromatin condensation) are related with sperm function (acrosome reaction). With studies about sperm's structural and functional relations, infertility diagnosis and treatment modalities can be improved.

Keywords: Acrosome, Izumo1, sperm

10 EKLER

- **Ek 1:** Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Girişimsel Olmayan Araştırmalar Kabul Formu (2 sayfa)
- **Ek 2:** Sağlık Bilimleri Üniversitesi Etik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi İzin yazısı (1 sayfa)
- **Ek 3:** Orjinallik Değerlendirme Programı (Turnitin) Değerlendirme Sonucu (2 sayfa)

- Ek 1: Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Girişimsel Olmayan Araştırmalar Kabul Formu (2 sayfa)

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU							
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu					
	ACIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara					
	TELEFON	0312 202 69 58					
	FAKS	0312 202 46 73					
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr					
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İzumol proteininin sperm değerlendirme parametreleriyle ilişkisinin fertilité statüsüne göre incelenmesi					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Çiğdem ELMAS					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Histoloji ve Embriyoloji A.D. /G.Ü.T.F.					
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)						
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Uzmanlık Tezi					
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05.04.2017	1	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐	
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	05.04.2017	1	Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒					
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐					
	DİĞER	☐					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 136 Toplantı tarihi: 10.04.2017						
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.						
GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik (13.04.2013), İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Canan ULUOĞLU					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza	
Prof. Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.T.F	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Birol DEMİREL BAŞKAN YARD.	Adli Tıp AD.	G.Ü.T.F	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji AD.	G.Ü.T.F.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Bülent BOYACI ÜYE	Kardiyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		

Prof. Dr. Öznur L. BOYUNAGA ÜYE	Radyoloji AD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya A.D.	G.Ü.T.F.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik AD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Aslı KURUOĞLU ÜYE	Psikiyatri AD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Hakan KAYIR ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	COMMAT Ldt.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Mutlu DOĞAN ÜYE	İç Hast. AD. Tıbbi Onkoloji BD.	Ank. Numune Eğt. ve Araşt. Hast.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. N. Arda DEMIRKAN ÜYE	Genel Cerrahi AD.	A.Ü.T.F.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Anıl TAPISIZ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hast. AD. Ç. Nör. BD.	G.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Pınar ÖZDEMİR ÜYE	Biyoistatistik AD.	H.Ü.T.F.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Mustafa GÖKSU ÜYE	Hukukçu	G.Ü. Hukuk Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Aysel ÖZER ÜYE	Sivil Temsilci	Emekli Öğr. Üyesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

Ek 2: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi İzin yazısı (1 sayfa)

Evrak Tarih ve Sayısı: 31/07/2017-E.40622

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
ANKARA İLİ 2. BÖLGE KAMU HASTANELERİ BİRLİĞİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ANKARA ETLİK ZÜBEYDE HANIM KADIN HASTALIKLARI E.A.H - EZH
TIBBİ EĞİTİM (EPK) BİRİMİ
25/07/2017 16:43 - 90057706 - 714 01 06 - E.167
0004973182

Sayı : 90057706-900/EĞİTİM
Konu : Araştırma İzni/ Süheyla Esra ÖZKOÇER

İADELİ TAAHHÜTLİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Personel Daire Başkanlığı
ANKARA
Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Personel Daire Başkanlığı 06500 Teknikokullar- ANKARA

Üniversiteniz Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Süheyla Esra ÖZKOÇER'in "İzomol Proteininin Sperm Değerlendirme Parametreleriyle İlişisinin Fertilité Statüsüne Göre İncelenmesi" konulu uzmanlık tezi projesinin; gönüllü denek onam formunun yeniden düzenlenmesi, kontrol grubunu oluşturacak gönüllü hastaların hastane dışından seçilmesi koşuluyla kabulüne, 07.06.2017-11 sayılı TUEK kararı ile kabul edilmiş olup çalışma sonucunun Bakanlığımızın bilgisi dışında ilan edilmemesi, başka bir amaçla kullanılmaması, başka makam ve kişilere verilmemesi, çalışma ayrıca söz konusu çalışma sonucunun bir örneğinin Ankara İli 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliğine gönderilmesi hususunda;

Bilgilerinize arz ederim.

Doç. Dr. Özlem MORALOĞLU TEKİN
Hastane Yöneticisi

Güvenli Elektronik İmza
25.7.2017
Kamusal
Evrak Kayıt Birimi

Adres: Etlik Zübeyde Hanım KH EAH Yeni Etlik Cad. No:55 Y.Mahalle/ANKARA İletişim: R. AĞIRMAN- 312 567 47 24- 4725
Telefon: 312 567 40 00 Fax: 312 322 01 84 e-posta: ezhegitim@gmail.com

Evrakın elektronik imzalı suretine <http://e-belge.saglik.gov.tr> adresinden 202b9dd6-c5c3-4d0c-9028-098a33c69bee kodu ile erişebilirsiniz.
Bu belge 5070 sayılı elektronik imza kanuna göre güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

- **Ek 3:** Orjinallik Değerlendirme Programı (Turnitin) Değerlendirme Sonucu (2 sayfa)

İzumo1 proteininin sperm değerlendirme parametreleriyle ilişkisinin fertilite statüsüne göre incelenmesi

Yazar Süheyla Esra Özkoçer

Gönderim Tarihi: 23-Mar-2018 01:08PM (UTC+0200)

Gönderim Numarası: 934981033

Dosya adı: Dr._Esra_ZKO_ER.pdf (7.86M)

Kelime sayısı: 14971

Karakter sayısı: 104796

İzumo1 proteininin sperm değerlendirme parametreleriyle ilişkisinin fertilité statüsüne göre incelenmesi

ORJİNALLIK RAPORU

% 3	% 2	% 2	% 0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Besen, Dilek, and Aynur Esen. "The Adaptation of the Acceptance of Illness Scale to the Diabetic Patients in Turkish Society", TAF Preventive Medicine Bulletin, 2011. Yayın	% 1
2	e-dergi.atauni.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<% 1
4	www.bulenttiras.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
7	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1

11 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Süheyla Esra Özkoçer

Doğum Tarihi: 13.07.1989

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Okul/Üniversite	Yıl	Derece
Tıpta Uzmanlık	Histoloji ve Embriyoloji	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi	2013-	Tıpta Uzmanlık
Lisans	İngilizce Tıp	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	2006-2013	Lisans
Ortaöğretim	Lise	İstanbul Atatürk Fen Lisesi	2003-2006	Ortaöğretim
İlköğretim	Ortaokul	60. Yıl İlköğretim Okulu/ İstanbul	2002-2003	İlköğretim
İlköğretim	Ortaokul	Osmaniye İlköğretim Okulu/ İstanbul	2001-2002	İlköğretim
İlköğretim	Ortaokul	Hüseyin Turgut Karabağlı İlköğretim Okulu/ Muğla	2000-2001	İlköğretim
İlköğretim	İlkokul	Cumhuriyet İlköğretim Okulu/ Muğla	1997-2000	İlköğretim
İlköğretim	İlkokul	Yıldırım Beyazıt İlköğretim Okulu/ Ankara	1995-1997	İlköğretim

Yabancı Dil: İngilizce

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi Dr.	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD	14/07/2014 -
Tabip	Ağrı Merkez Toplum Sağlığı Merkezi, Ağrı	01/10/2013-11/07/2014



Eserler

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında

(Proceedings) basılan bildiriler:

ÖZKOÇER SÜHEYLA ESRA,ELMAS ÇİĞDEM,BULUT DENİZ İREM,SEYMEN CEMİLE MERVE,TAKE KAPLANOĞLU GÜLNUR,ŞENER DİLA,ERDOĞAN DENİZ (2017). Effects of DBP on medial prefrontal cortex and hippocampus. Can resveratrol prevent the damage?. 15th ICHC (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:3824460)

Katıldığı Bilimsel Kongre, Toplantı ve Kurslar:

1. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan- 03 Mayıs 2016, İzmir
2. XIX.Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, 23-31 Mayıs 2016, Gazi Üniversitesi Ankara
3. Tıpta İletişim Becerileri Temel Eğitimi, 28-29 Mart 2017, Gazi Üniversitesi, Ankara
4. Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitim Etkinliği: THED-Akdeniz- 2017, 15-17 Mayıs 2017, Antalya
5. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 18-21 Mayıs 2017, Antalya
6. Akım Sitometri Tekniğinin Üreme Biyoteknolojisinde Kullanım Alanları Kursu, 05 Ocak 2018, Ankara

Üyesi Olduğu Kuruluşlar:

- Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği (THED)