



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE SEMENDE ADAM2(FERTİLİN)  
CATSPER VE SOX5 EKSPRESYONLARI VE SPERM  
FONKSİYONLARI İLE İLİŞKİSİ**

ÖZGE BIÇEROĞLU

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. ŞULE AYLA

İSTANBUL-2017

## TEZ ONAYI FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji  
Tez Sahibi : Özge BIÇEROĞLU  
Tez Başlığı : Erkek Infertilitesinde Semende Adam2(Fertilin), Casper ve Sox5 Ekspresyonları ve Sperm Fonksiyonları İle İlişkisi  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 17.08.2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

Yrd.Doç.Dr. Şule AYLA

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza



### Sınav Jüri Üyeleri

Doç.Dr.Gözde ERKANLI ŞENTÜRK

İstanbul Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr.İlknur KESKİN

İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06/09/2017 tarih ve 2017-25 - 07 sayılı karar ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nesrin AKKILI  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ÖZGE BİÇEROĞLU



## TEŞEKKÜR

Yükseklisans eğitimim boyunca gerek tezimin planlanması, yürütülmesi esnasında bilgi ve desteği ile gerekse hayat tecrübeleri iler her koşulda bana yol gösteren, benimle paylaşan çok değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Şule Ayla'ya,

Tez çalışmam ve yüksekisans eğitimim boyunca deneyim ve bilgileriyle her türlü yardımda bulunan Prof. Dr. Tangül Müdok'a, başta bölüm başkanımız Yrd. Doç. Dr. İlknur Keskin olmak üzere bölüm hocalarım Yrd. Doç. Dr. Bilal Ersen Kerman, Yrd. Doç. Dr. Seda Karabulut'a,

Hasta temin edilmesi aşamasında yanında bulunduğum ve tez dönemim boyunca beni her konuda motive eden, tüm bilgilerini benimle paylaşan ve destekleyen IVF ünitesi laboratuvarında değerli embriyolog Tuğba Varlı Yelke, Tuğba Şenel Ustabas ve Şebnem Yazıcı'ya,

Çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum ve her konuda yardımlarıyla bana destek olan çalışma arkadaşlarım Öğr. Gör. Hilal Eren Gözel, Arş. Gör. Bircan Kolbaşı, Arş. Gör. Mehmet Şerif Aydın, Arş. Gör. Nilüfer Ulaş, Arş. Gör. Duygu Gürsoy, Arş. Gör. Oya Korkmaz, bölüm arkadaşlarım Berna Yıldırım, Volkan Bülbül, Eşref Çelik ve sevgili arkadaşım Tuğçe Önel'e,

Tez dönemim boyunca tecrübe ve destekleriyle her türlü yardımda bulunan Koç Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç Dr. Serçin Karahüseyinoğlu ve değerli asistanları Gizem Şahin, Nida Karahan, Kübra Sarı'ya, Başta Prof. Dr. Gürkan Öztürk olmak üzere içerisinde bulunduğum tüm Remer ailesine,

Beni bu yaşıma kadar getiren, sevgi ve varlıklarıyla her koşulda arkamda olan, mutluluk ve huzur kaynağım canım babam Sinan Biçeroğlu, annem Serpil Biçeroğlu, abim Erdem Biçeroğlu'na ve tez dönemim boyunca uzaktada olsa desteğini üzerimden hiç çekmeyen canım kuzenim Mehmet Aykut Kurt'a,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET.....	10
2. ABSTRACT.....	12
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	14
4. GENEL BİLGİLER.....	16
4.1. İnfertilite Nedir?.....	16
4.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyolojisi.....	16
4.2. Erkek Üreme Sistemi.....	17
4.2.1. Spermatogenez.....	18
4.2.2. Spermin Yapısı.....	23
4.2.3. Fertilizasyon (Döllenme) Nedir?.....	24
4.3 Catsper Proteini Yapısı ve Özellikleri.....	27
4.3.1. Catsper Ekspresyon ve Lokalizasyon.....	28
4.3.2 Catsper Düzenlenmesi.....	29
4.3.3. Catsper ve Fertilizasyon İçin Önemi.....	32
4.4 Sox5 proteini.....	33
4.4.1. Sox5 ve Sperm Fonksiyonu İle İlişkisi.....	34
4.5 Fertilin (Adam2) Proteini.....	35
4.5.1. Fertilin Proteinin Fertilizasyon için Önemi.....	37
5. MATERYAL ve METOT.....	39
5.1. Hasta Grupları.....	39
5.2. Semen Analizi.....	40
5.3. Motilite Değerlendirilmesi.....	41
5.4. Spermac Stain Kit ile Morfolojik Değerlendirme.....	45
5.5. Apoptoz Tayin Protokolü.....	46
5.6. Sox5 Proteini için İmmünfloresan Boyama Prosedürü.....	47

5.7. Catsper 1 Proteinini için İmmü Floresan Boyama Prosedürü.....	48
5.8. Fertilin (ADAM2) Proteinini için İmmü Floresan Prosedürü.....	49
5.9. İmmunohistokimya Boyama Prosedürü .....	49
5.10. PCR Protokolü.....	51
5.11. Kullanılan Kimyasallar .....	54
5.12. Kullanılan Cihazlar .....	54
5.13. İstatiksel Analiz.....	56
6.BULGULAR.....	57
6.1. Morfolojik Değerlendirme.....	57
6.2. Apoptoz Bulguları.....	59
6.3. İmmü Floresan Bulguları.....	60
6.4. İmmunohistokimya Bulguları.....	66
6.5. Sox5 Ekspresyonu İstatiksel Değerlendirilmesi.....	70
6.6. DNA Fragmantasyon İndeksi.....	71
6.7. Catsper Protein Ekspresyon İstatiksel Değerlendirilmesi.....	72
6.8. PCR Bulguları.....	73
7. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	74
8. KAYNAKLAR .....	78
9. ETİK KURUL ONAYI.....	86
10. ÖZGEÇMİŞ .....	89

## KISALTMALAR

ABHD2:	: Progesterodependent lipit hydrolase
ADAM	: Disintegrin ve Metalloprotease Domain,
AG	: Araşidanoik Asit
ATM	: Ataxia-Telangiectasia Mutated
BSA	: Bovine Serum Albumin
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü( <i>World Health Organization</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
NORMO	: Normozoospermi
OAT	: Oligoastenoteratozoospermi
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PFA	: Paraformaldehit Asit
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
SRY	: Testis Belirleyici Gen
SPAG6	: Sperm İlişkili Antijen 6
TUNEL	: The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Deoxyuridine (TdU) Triphosphate (dUTP) Nick End Labelling Assay

## TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1.1.1	Erkek infertilitesinin başlıca etiyolojik nedenleri.....	16
Tablo 4.2.1	Erkek üreme sistemi şematik gösterimi.....	18
Tablo 5.1.1	Normozoospermi ve OAT grupta semen parametreler.....	40
Tablo 5.3.1	DSÖ Sperm Parametreleri .....	42
Tablo 5.3.3	DSÖ Semen Parametreleri.....	42
Tablo 5.3.4.	Morfolojik değerlendirme tablosu.....	43
Tablo 5.3.5.	Basit sperm analiz tablosu .....	44





## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.2.1.1	Memeli Spermatogenez Aşamaları.....	22
Şekil 4.2.1.2.	Memeli Spermiyogenez Aşamaları .....	22
Şekil 4.2.2.1	İnsan Sperm Yapısı Şematik Gösterimi .....	24
Şekil 4.2.3.1	Fertilizasyon Aşamaları.....	26
Şekil 4.2.3.2.	Sperm plazma membranı-Oosit plazma membranı füzyon şematik gösterimi.....	26
Şekil 4.3.1	Catsper kanalının fonksiyon ve regülasyonu.....	27
Şekil 4.3.1.1	Spermde Catsper protein lokalizasyonu .....	28
Şekil 4.3.2.1	Catsper kanal düzenlenmesi. ....	30
Şekil 4.3.2.2.	Catsper kanal heterodimerik yapısı .....	31
Şekil 4.3.2.3.	Catsper kanal lokalizasyon ve fonksiyonel önemi .....	32
Şekil 4.3.3.1	Catsper kanal proteinin fonksiyonel önemi.....	33
Şekil 4.4.1.1	Sox5 proteini fonksiyonel lokalizasyonu. ....	35
Şekil 4.5.1	Sperm-oosit füzyonunda Fertilin-İntegrin etkileşimi .....	37
Şekil 5.2.1	Makler kamera görüntü alanı.....	41
Şekil 5.2.2	Yayma preparat hazırlanması .....	41
Şekil 6.1.1	Normozoospermi grupta morfolojik değerlendirme.....	57
Şekil 6.1.2.	OAT grupta morfolojik değerlendirme .....	58
Şekil 6.2.1	Normozoospermi grubunda apoptoz değerlendirilmesi. ....	59
Şekil 6.2.2	OAT grubunda apoptoz değerlendirilmesi .....	60
Şekil 6.3.1	Normozoospermi grupta Sox5 protein ekspresyonu. ....	61
Şekil 6.3.2.	OAT grupta Sox5 protein ekspresyonu. ....	63
Şekil 6.3.3	Normozoospermi grupta Catsper1'in protein ekspresyonu.....	67
Şekil 6.3.4	OAT grupta Catsper1'in protein ekspresyonu.....	69
Şekil 6.3.5	Normozoospermigrupta Fertilin protein ekspresyonu.....	70
Şekil 6.3.6	OAT grupta Fertilinin protein ekspresyonu.....	66
Şekil 6.4.1	Normozoospermi grupta immunohistokimyasal Catsper1 protein ekspresyonu .....	67

Şekil 6.4.2 OAT grupta immunohistokimyasal Catsper1 protein ekspresyonu.....	68
Şekil 6.4.3 Fertilin immunohistokimyasal boyamaları.....	69
Şekil 6.5.1 Normozoospermi ve OAT grupları arasında Sox5 Ekspresyon oranları.....	70
Şekil 6.6.1 Normozoospermi ve OAT grupları arasında TUNEL (+) hücre sayısı oranları .....	71
Şekil 6.7.1 Normozoospermi ve OAT grupları arasında Catsper protein ekspresyon oranları .....	72
Şekil 6.8.1 Normozoospermi ve OAT grupları arasında ADAM2 (Fertilin) protein ekspresyon oranlar.....	73
Şekil 6.8.2 Normozoospermi ve OAT grupları arasında ADAM2 (Fertilin) protein ekspresyon oranları .....	73

## 1. ÖZET

### ERKEK İNFERTİLİTESİNDE SEMENDE ADAM2(FERTİLİN) CATSPER VE SOX5 EKSPRESYONLARI VE SPERM FONKSİYONLARI İLE İLİŞKİSİ

İnfertilite(kısırlık) toplumun %15'ini etkileyen bir durumdur. Çiftlerin yaklaşık %15'i infertilite tanısı ile tedavi olmaktadır.Bu çiftlerde erkek infertilitesi oranı %50'leri bulmaktadır.Erkek infertilitesinde idiopatik sebepler haricinde üzerinde durulan konu sperm yüzey proteinleridir.Spermatozoon membranı oositi çevreleyen membrana yapışma özelliğinin yanısıra, spermın genetik materyali ile membran yapısı arasında belirli bir ilişkinin bulunması açısından da önemlidir. Eğer genetik materyaldeki hatalar spermatozoon morfolojisindeki bozulma ile açıklanabilirse, bilinmeyen erkek infertilite sorunlarının da açıklanabilir duruma gelebileceği düşünülmektedir. Spermatozoon membran ve flagellum (kuyruk) üzerinde bulunan proteinler spermın oosit membranına tutunmasına ve ekstrasellüler matriks alanına girmesine yardımcı olmaktadır.Fertilin,disintegrin protein ailesi içinde yer alan,spermatozoon yüzeyinde bulunan, heterodimerik bir proteindir. Tetraspain protein ailesi üyesi olan CD9 ile birlikte, spermatozoon-oosit plazma membranlarının füzyonuna katılmaktadır. Catsper, heterotetramerik 4 ayrı por formlu  $\alpha$  altünitesinden oluşmuş  $Ca^{+2}$  kanalıdır. Sperm flagellum (kamçı) plazma zarında bulunur ve  $Ca$  iyonlarının sperm flagellar sitoplazmaya girişini sağlamada görevlidir ve hücre içi pH artışı ile tetiklenmektedir. Sox5 ise post-mayotik germ hücreleri ile round spermatidlerde yüksek seviyede bulunan, gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Catsper promotör bölgesi üzerinde Sox genlerinin bağlanma bölgesi bulunmaktadır ve Catsper gen ekspresyonunu kontrol eden bir konumdadır.Bu çalışmada 30 Normozoospermi ve 30 Oligoastenoteratozoospermi tanısı konmuş 60 kişi ile çalışılmıştır. Sperm motilitesi ve fonksiyonu üzerinde etkili olan fertilin, catsper ve Sox5 protein ekspresyonlarını değerlendirilmiştir. Bu bilgiler ışığında daha sonra yapacağımız çalışmalarla, tespit edilen bu proteinlere karşı antikolar oluşturularak bu proteine bağlanmaları ve dolayısı ile proteinin aktivitesini

inhibe etmeleri sonucunda erkekte doğum kontrolünde (kontrasepsiyon) kullanılan bir yöntem olarak katkı sağlamayı amaçlamaktayız.

**Anahtar Kelimeler:**Catsper, Fertilin (ADAM2), Motilite, Sperm, Sox5.

Bu alışma İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No:2016-16)



## 2. ABSTRACT

### FERTILIN (ADAM2), SOX5, CATSPER EXPRESSION IN SEMEN FOR MALE INFERTILITY AND RELATION WITH SPERM FUNCTION

Infertility is a condition that affects 15% of the population. Approximately 15% of the couples are treated with the infertility diagnosis. The rate of male infertility is 50% in couples who cannot have children. Apart from idiopathic causes, sperm surface proteins are another reason for male infertility. The proteins on spermatozoon membrane and flagellum (tail) help to attach to sperm to oocyte membrane and to enter extracellular matrix area. Specifically, spermatozoon membrane is important in terms of having a specific relationship between genetic material of spermatozoon and membrane structure, as well as adhesion properties to the membrane which surrounds oocyte. If defects in genetic material can be understood by deterioration of spermatozoon morphology, it is thought that unknown male infertility problems can be explained by studying spermatozoon membrane. Therefore, this study was conducted on 30 patients with normozoospermia and 30 patients with OAT. We evaluated expressions of Fertilin, Catsper and Sox5 proteins, which are effective on sperm motility and function. Fertilin from the disintegrin protein family is a heterodimeric protein located on surface of spermatozoon. Tetraspanin is involved in fusion of spermatozoon-oocyte plasma membranes with CD9 a protein family member. Catsper is a heterotetrameric  $\text{Ca}^{+2}$  channel composed of 4 subtypes of pore-shaped  $\alpha$  subunits. The sperm flagellum is located in plasma membrane and is responsible for the entry of Ca ions into sperm flagellar cytoplasm and is triggered by intracellular pH increase. Sox5 is a transcription factor that regulates gene expression at high levels in post-meiotic germ cells and round spermatids. There is a binding region of the Sox genes on the Catsper promoter region and Catsper is in a position to control gene expression. Together with current and future researches, we intend to establish a method for controlling fertility in a man by binding present proteins to antibodies, and inhibiting present protein activities.

**Keyword:** Catsper, Fertilin (ADAM2), Motility, Sperm, Sox5.

This work was supported by the Medipol University Scientific Research Projects Commission of Istanbul. Project id(2016-16).



### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite (kısırlık) çiftlerin bir yıl boyunca korunmasız olarak cinsel birleşme sonrası gebelik elde edememe durumudur. Dünya nüfusunun %15'ini etkileyen, günümüzde hala sebebi bilinmeyen infertilite sorunları bulunmaktadır ve hem maddi hem manevi olarak çiftlerin yaşadığı sıkıntılı bir süreçtir. Erkeklerde infertilite esas olarak, yetersiz sperm konsantrasyonu, azalan toplam semen hacmi, düşük sperm canlılığı, sperm morfolojisinde anormallik ve düşük sperm hareketliliği nedeniyle yetersiz sayıda spermden kaynaklanmaktadır[1].

Bununla birlikte tüm bu kriterlere bakmak konvansiyonel sperm analizleri sperm verimliliği ve nedenlerini tahmin etmek için sınırlı bir değerdedir. Gebeliği belirleyen sadece hareket yeteneği olan sperm olmamakla birlikte spermlerin işlevsel yetkinliğidir. Bu yüzden spermin yapısı daha ayrıntılı olarak incelenmeli ve diğer parametreler göz önüne alınmalıdır. Servikal mukus penetrasyonu ve hareketliliği, hiperaktivasyon, kapasitasyon, sperm-oosit füzyonu, akrozom reaksiyonu ve zona pellucida penetrasyonu dahil olmak üzere sperm fonksiyonu çeşitli yöntemlerle incelenmelidir.

Fertilin, disintegrin protein ailesi içinde yer alan, spermatozoon yüzeyinde bulunan, heterodimerik bir proteindir. Fertilinin metalloproteaz bölgesinde oositin plazma membranını eriten bir proteaz ucuna sahip olduğu bilinmektedir ve disintegrin bölgesindeki peptidler ile oositteki integrin reseptörüne bağlanmaktadır. Sadece oositin oolemmaya ulaşması için değil, aynı zamanda fizibilitesini elde etmek için spermin bu tabakaya nüfuz etme süreci önemlidir. Füzyon spermin ekvatoryal segmentinden başlar ve sperm çekirdeği daha sonra oosit sitoplazması içerisine salınır. Fertilin proteini eksprese olmayan sperm oosit plazma membranına bağlanma yeteneğinde ciddi azalma gösterilmiştir [2, 3].

Catsper, heterotetramerik 4 ayrı por formulu  $\alpha$  altünitesinden oluşmuş  $Ca^{+2}$  kanalıdır. Spermatogenezin mayoz aşamasında eksprese edilmektedir ve  $Ca^{+2}$  unkançığı içine girişi ve sperm hareketliliği ile aktifleşir [4]. Catsper ekspresyonu, sperm hareketliliğini, fertilizasyon oranını, embriyo kalitesini ve gebelik oranını etkilemektedir. Catsper ekspresyonu, olgun sperm kuyruk ana parça kılıf üzerinde ve sperm plazma zarında sınırlıdır. Hiperaktif motilite oosit-sperm penetrasyonunu kolaylaştırmak için döllenme bölgesinde meydana gelir. Catsper yokluğu motilitenin

bu aşamasını bozmaktadır. Farelerde sperme özgü dört Catsper kanalından herhangi birinin genetik olarak bozulması, sperm motilitesini bozarak erkek infertilitesine yol açar[5].

Sox proteinleri cinsiyet tayini ve erkek embriyonik testis farklılaşması dahil birçok süreci düzenler. Sox aileleri pre-natal ve post-natal sertoli hücrelerinde tespit edilmiştir. İnsan Sox5 geni iki uzun ve bir kısa izoform kodlar. Kısa izoform testis, beyin ve akciğer gelişiminde rol alır. Uzun izoformu ise kıkırdak, kalp, beyin, böbrek, akciğer ve iskelet kası gibi birçok dokuda ifade edilir [6].

Sox5, embriyonik gelişim ve hücre göç tayini dahil, kondrogenezisi düzenleyen önemli roledir. Hücre çoğalması, farklılaşma, terminal olgunlaşma ve gelişim rollerinde bulunur. Yapılan çalışmalarda Sox5'in yuvarlak spermatidlerden geldiği ve pre-pubertal (21 gün)'den yetişkin (4 ay) döneme kadar protein seviyelerinde artış görülmüştür. Sox5, post-mayotik germ hücreleri ile round spermatidlerde yüksek seviyede bulunan, gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Catsper promoter bölgesi üzerinde Sox genlerinin bağlanma bölgesi bulunmaktadır ve Catsper gen ekspresyonunu kontrol eden bir konumdadır [7].

Bizim de bu tezdeki amacımız; fertil dediğimiz bütün sperm parametreleri ve sperm fonksiyonları normal olan Normozoospermi grup ile zayıf sperm kalitesi ve düşük sperm fonksiyonuna sahip olan Oligoastenoteratozoospermi grubu arasındaki Sox5, Catsper ve Fertilin (ADAM2) protein ekspresyonlarını karşılaştırmaktır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1.İnfertilite Nedir?

İnfertilite (Kısırlık) cinsel yönden aktif ve 12 ay boyunca kontrasepsiyon olmaksızın cinsel birleşme sonrası gebelik elde edememe durumudur (1,2). Bu tanıma göre, infertilite toplumun %15'ini etkileyen bir durumdur. Erkek infertilitesi ise; bir erkeğin sağlıklı bir kadın partner varlığında korunma olmaksızın cinsel ilişki sonrasında 12 ay sonunda çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır (3).

#### 4.1.1.Epidemiyoloji veEtiyolojisi

Çiftlerin yaklaşık %25'i 1 yıl içerisinde gebelik elde edememektedirler ve bunların da %15'i infertilite için tedavi olup, %5'i istemelerine rağmen çocuk sahibi olamamaktadır. İnfertilite hem erkeği hem de kadını etkileyen bir durumdur. İstemelerine rağmen çocuk sahibi olamayan infertil çiftlerin %50'si ise erkek infertilitesinden kaynaklanmaktadır (Tablo 4.1.1.1) [8].

**Tablo 4.1.1.1 Erkek infertilitesinin başlıca etiyolojik nedenleri**

Cinsel Faktörler	1,7
Ürogenital Enfeksiyonlar	6,6
Konjenital Anomaliler	2,1
Kazanılmış Faktörler	2,6
Varikozel	12,3
Endokrin Bozukluklar	0,6
İmmünolojik Faktörler	3,1
İdiyopatik Semen Bozuklukları(OAT)	75,1
Diğer Hastalıklar	3,0

İdiyopatik erkek infertilitesine kronik stres, çevresel kirlenmeye bağlı endokrin bozukluklar, sağlıksız beslenme, radyasyona ve kimyasala maruz kalma, ürogenital anormallikler, metabolik hastalıklar, reaktif oksijen türleri (ROS) ve genetik bozukluklar, testise ait nedenler sperm yapım bozukluğuna bağlı nedenler(non-obstrüktif) ve sperm atım bozukluğuna bağlı nedenler

(obstrüktif),sperm taşıyıcı kanallarda oluşan tıkanıklıklar gibi çeşitli faktörler neden olabilir.

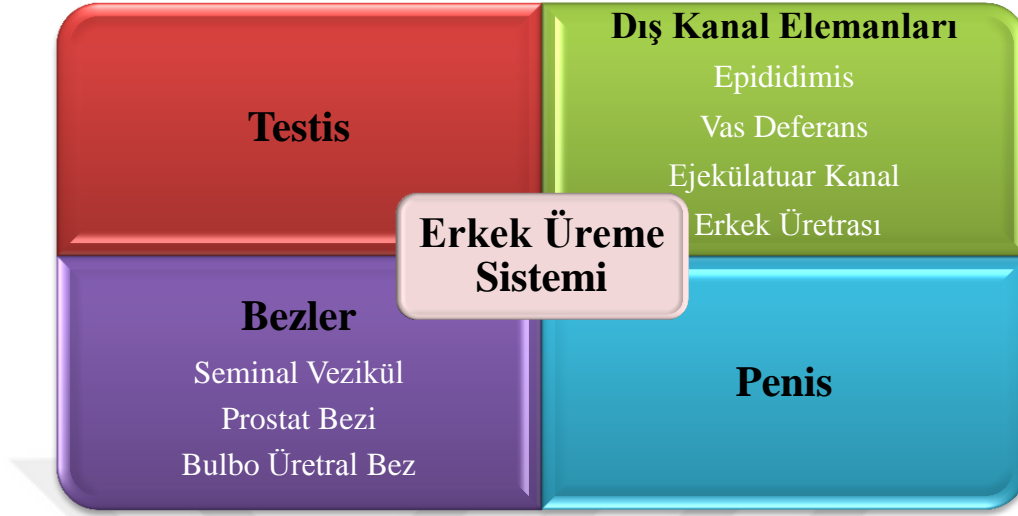
İnfertilite erkeklerin yaklaşık %7'sini etkilemektedir ve çocuk sahibi olamayan çiftlerin %50'sinde, erkek infertilitesi anormal semen parametreleriyle bağlantılıdır. Düşük sperm sayısı (oligozoospermia) ve zayıf sperm kalitesinin %90'dan fazla oranda erkek kısırlığından sorumlu olduğu belirtilmekte ve insanlardaki genetik rahatsızlıklar spermatogenezde bozulma, sperm fonksiyonunda bozulma ya da sperm taşınmasındaki bir bozulmaya sebep olarak infertiliteye yol açmaktadır,

Yapılan birçok çalışmada, erkek infertilitesine sebep olabilecek genetik faktörlere örnek olarak sperm yüzey proteinleri verilmektedir (integrinler, adezyon molekülleri, fibronektin, selektinler vb.). Buna ek olarak, hücre döngüsünün kontrol noktalarında görev yapan proteinler (ATM vb.[9]) ve DNA tamir mekanizmasında görevli proteinler de gösterilmektedir [10].

#### **4.2.Erkek Üreme Sistemi**

Erkek üreme sistemi; testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmuştur.(Tablo 4.2.1) Testis hormon ve spermatozoon üretirken, genital kanallar ve yardımcı bezler düz kas kasılma yardımıyla spermatozoonun dışarı doğru sürükleyen ve besleyen salgı üretirler. Spermatozoon ile birlikte genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısı penis yoluyla dişi üreme sistemine bırakılan semeni oluşturur.[11].

**Tablo 4.2.1 Erkek üreme sistemi şematik gösterimi**



Semenin %10'undan daha azını spermiler oluşturur; %60 seminal vezikül, %30 prostat ve %10 bulboüretral bez salgıları semen ejakülatının diğer %90'luk kısmını oluşturur.

#### 4.2.1.Spermatogenez

Spermatogenez testiste seminifer tübüllerinde pubertede başlar. Spermatogonyumların (öncü hücreler) bölünüp farklılaşarak spermatidleri oluşturmasına **spermatogenez** denir. **Spermatogonyumlar** tübülün bazal kompartmanında bazal lamina ile ilişkili diploid olan spermatogonik hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin arasındaki tıkaçıcı bağlantıların altında yer aldıkları için kan-testis bariyerine katılmazlar. Nükleus özelliklerine göre tanımlı 3 tip spermatogonyum vardır[12].(Şekil 4.2.1.1)

Tip A koyu spermatogonyumlar (I), kromatinleri ince granüllere sahiptir, bazofilik nükleusludur ve bölünerek Tip A açık spermatogonyumları(II) oluşturur.Bunlar ise ince granüllü açık boyanır. Tip A koyu spermatogonyumlar kök hücre olarak kalırken Tip A açık spermatogonyumlar farklılaşır ve spermiumları oluşturur. Tip A açık spermatogonyumlar ise çok sayıda mitoz bölünme sonucu sayıca artarlar ve Tip B spermatogonyumları (III) oluştururlar(4). Tip B spermatogonyumlar yuvarlak nükleuslu kromatini nükleolus boyunca kümeler

yaparlar. Mitotik bölünmelerini tamamlayan Tip B spermatogonyumlar DNA sentezini tamamladıktan sonra **primer spermatositleri** oluşturmak üzere bölünmeye giderler. Tip B spermatogonyumlar son mitoz bölünmesinin ardından birinci mayoz bölünmeye girerler ve bu yaklaşık 10 gün sürmektedir. Birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez evreleri görülür. Burada gerçekleşen 4 önemli olay vardır: Homolog kromozom eşleşmesi için gerekli sinaptonemal kompleks oluşumu, homolog kromozomların eşleşmesi (sinaps), kross over (homolog kromozomlarda kardeş olmayan kromatidleri arasında bilgi değişim evresi), disjunction (homolog kromozomların ayrılma olayı). Profaz evresinden sonra kardeş kromatidler çift olarak metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçerek sekonder spermatositlere ayrılırlar. İkinci mayoz bölünme ardından ise spermatidlere ayrılırlar[13].

DNA sentezinin son turunda, mayoz bölünmenin profaz I aşamasında primer spermatosit DNA miktarını ikiye katlar. Her bir primer spermatosit 2 katı kromozom sayısına ( $4n$ ) ve 2 katı DNA 'ya sahiptir. Sekonder spermatositler primer spermatositlere göre daha küçük boyutludurlar ve diploid sayıda DNA ( $2n$ )'ya sahiptirler. Sekonder spermatositler herhangi bir bölünme geçirmeden 2 adet spermatid meydana getirir. Oluşan spermatidler haploiddir ve normalin yarısı DNA miktarına sahiptir. Haploid spermatidler seminifer tübülün adluminal kompartmanında yer alırlar ve sertoli hücre sitoplazma kriptasında yerleşmişlerdir. Spermatidler spermatogenezin son aşaması olan '**spermiyogenez**' denilen değişim dönemi geçirirler. Spermiyogenez; spermatidden spermiyum oluşum evresidir. Spermiyogenez geçiren spermatidlerde sitoplazma azalır, akrozom ve kuyruk oluşur, sitoplazma içinde bulunan organeller yer değiştirir, kuyruklu ve kısmen hareketli spermiyuma dönüşürler. Spermiyogenez aşaması üç ana olayla gerçekleşir: (Şekil 4.2.1.2)

- I. Flagellum (kamçı) gelişimi: Kamçı, distal sentriyolden gelişmeye başlar ve gelişiminden sentrioller sorumludur. 9+2 mikrotübül yapısından oluşan aksonem dış yoğun lifler ve fibröz kılıfla çevrilidir. Mitokondriyonlar boyun kısmında yer alır ve dış yoğun liflerin etrafını kılıf gibi sarmaktadırlar.

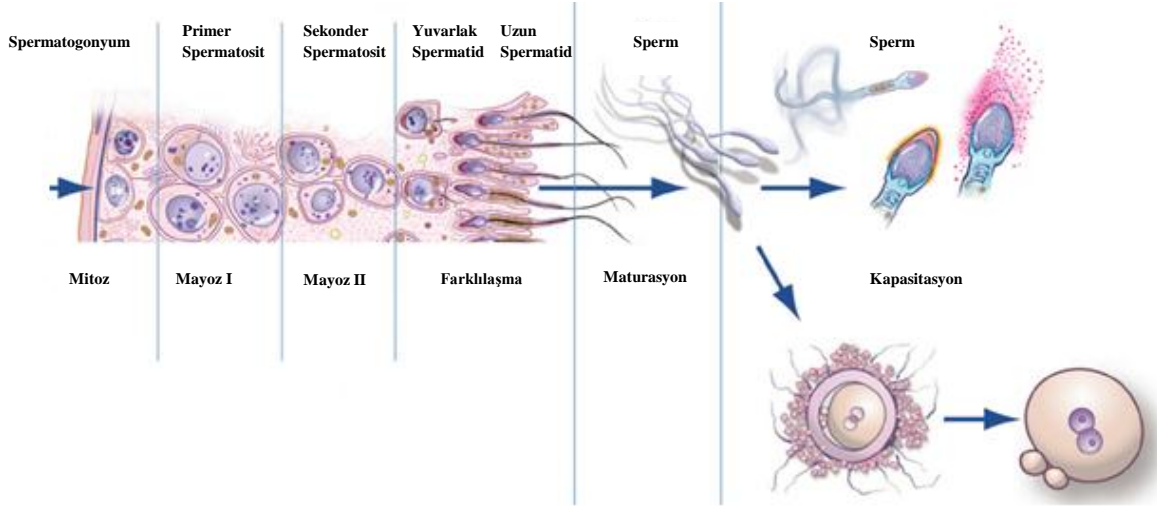
Mitokondriyonların bulunduğu bu proksimal bölüm kuyruğun ‘orta parçası’dır. Orta parçanın distalinde ise fibröz kılıf ana parçanın dış yoğun liflerini çevreler ve bu kısım ‘esas parça’ olarak isimlendirilir. Sadece aksonemin mikrotübüllerini içeren son kısım ise ‘son parça’ olarak isimlendirilir.

II. Akrozom gelişimi: Bu evrede fertilizasyon (döllenme) için gereken hidrolitik enzimler depolanır ve sentezin gerçekleştiği akrozomal keseyi içermektedir, Akrozomun gelişmesi dört evreden oluşmaktadır; Golgi evresi, kep (şapka) evresi, akrozomal evre, maturasyon (olgunlaşma) evresi.

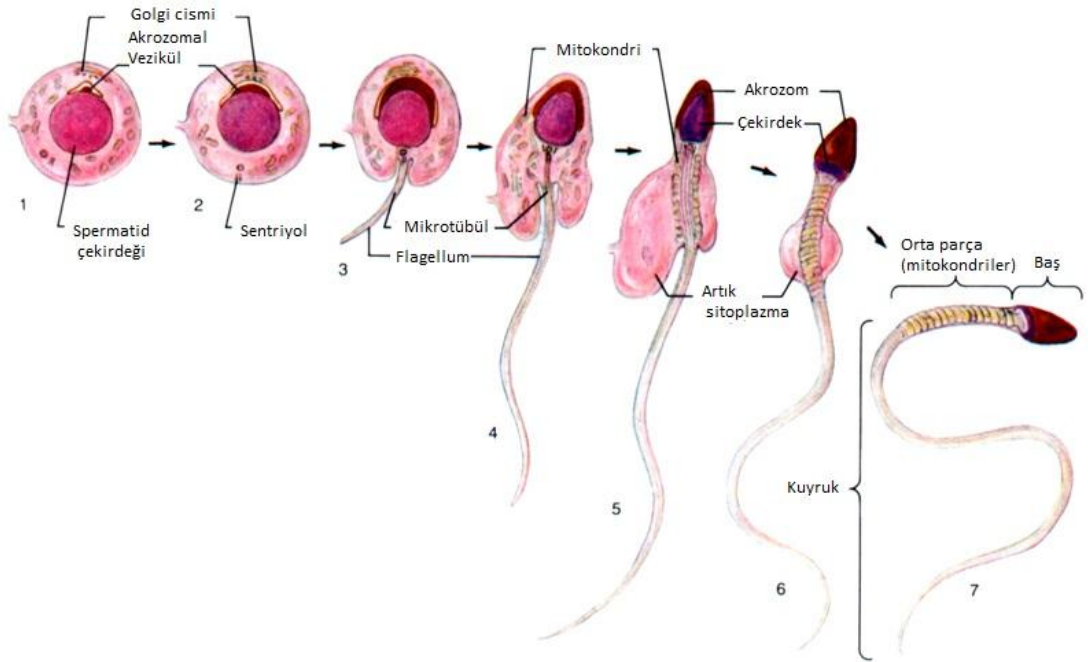
- **Golgi evresi;** hidrolitik enzimler golgi aygıtından akrozomal veziküle aktarılır ve glikoproteinden zengin proakrozomal granüller akrozomal vezikülle birleşir. Akrozomal vezikülün bulunduğu yer spermiyumun ön kutbunu belirler. Sentriyol çifti akrozomal vezikülün arka kutbuna doğru göç eder. Burada kuyruğun aksonemi oluşturacak olan mikrotübülleri sentriyolden başlayarak yapılanmaya girerler.
- **Kep-Şapka Evresi;** akrozomal vezikül yassılaşır, nükleusun ön kısmını kaplayacak şekilde genişleyerek bir kep oluşturur. Nükleus membranının bu kısma bakan bölümündeki porlar kaybolur ve membran kalınlaşarak nükleus yoğunlaşır. Sentriyol çifti akrozomal vezikülün arka kutbuna ulaşmıştır. Spermatid ise bazal kompartman akrozomal bölgeye bakacak şekilde döner.
- **Akrozomal Evre;** akrozom apikal plazma membranına iyice yaklaşır ve çekirdeğin üçte birlik kısmını örter. Sitoplazmik mikrotübüller spermatidin arka kutbuna doğru uzar ve ‘manşet’i oluşturur. Distal sentriyolden 9+2 mikrotübül yapısındaki aksonem oluşurken mitokondriyonlar ise aksonem boyunca göç ederler.
- **Olgunlaşma Evresi;** perinüklear halka (çekirdek çevresinde) ve mikrotübüllerden oluşan manşet kuyruk kısmına doğru ilerler. Keratine sahip

dış yoğun lifler gelişir ve aksonem boyunca dizilirler, mitokondriyonlar ise bir tek orta parçada yer alan dış yoğun lif çevresine dizilirler. Fazla sitoplazmayı içeren artık cisimcikler boğumlanarak kopar ve sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler.

Spermiyogenezin son aşaması olan çekirdek yoğunlaşması ve somatik histonların arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirmesidir. Sperm genomik DNA'sını stabilize etmek ve korumak için bu yer değişimi önem taşımaktadır. Spermiler seminifer lümeninden depolanıp hareket kazanacağı, dölleme yeteneği kazanacağı epididimise taşınırlar. Burada 20 gün kadar tutulurlar ve Vas deferans yoluyla üretraya ulaşırlar. Spermiler üretradan dışarı atılırlar. Spermatogonyumdan olgun sperme dönüşebilmesi için gerekli olan süre 64 gündür. Spermatogenez sırasında oluşan bütün spermiler eşit büyüklüktedir ve eşit miktarda genetik materyal ile sitoplazma içerirler.



Şekil 4.2.1.1 Memeli Spermatojeniz Aşamaları(Sharma R.,2014)



Şekil 4.2.1.2. Memeli Spermiojeniz

Aşamaları(<http://www.austincc.edu/rfofi/NursingRvw/PhysText/Reproductive.html>)

#### 4.2.2.Spermin Yapısı

Olgun bir spermin yapısı incelendiğinde baş ve kuyruk olarak iki kısımdan oluştuğu ve baş kısmının bir bağlantı parçasıyla kuyruk kısmına bağlandığı görülmektedir. Baş ve kuyruk kısmı bir plazma membranı ile sarılmıştır. En büyük bölümünü baş kısmı oluşturmaktadır ve akrozomla sarılmış bir çekirdekten oluşmaktadır. Çekirdeğin ön tarafının yarısını akrozom örtmektedir ve hidrolitik enzimler (hiyaluronidaz, akrozin, proteazlar, asit fosfatazlar, nöraminidazlar) içermektedir.

Sperm başı üç kısımdan oluşmaktadır; (I) kondanse çekirdek, (II) akrozomal kese, (III) plazma membranı.

Kondanse çekirdekte genomik DNA yer alır ve nukleozomları yoktur. Plazma membranında ise sperm reseptörleri ve fertilin yer alır.

Kuyruk üç parçadan oluşmaktadır: Orta parça, esas(ana) parça, son parça (Şekil 4.2.2.1)

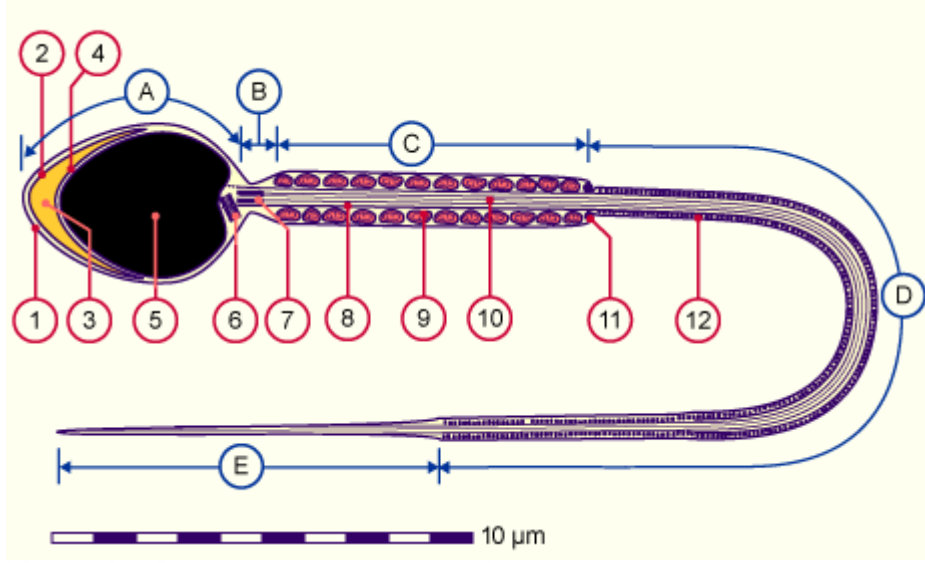
Bağlantı parçasında bir çift sentriyol bulunur ve sperm kuyruğunun merkez parçası olan aksonemi distal sentriyol oluşturmaktadır.

Kuyruğun orta parçasında mitokondriyonlar sarmal şeklinde dizilmişlerdir. 9+2 yapısındaki mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler yer almaktadır. Spermin hareketi için gerekli olan ATP ler bu kısımdan sağlanmaktadır. Mitokondriyal sarmal annulusta son bulur ve burası orta parçanın alt sınırını belirler.

Kuyruğun esas (ana) parçası, yedi dış yoğun lifle sarılı (orta parçada dokuz lif vardır) merkezi bir aksonem ve fibröz kılıftan oluşmaktadır. Hem fibröz kılıf hem de dış yoğun lifler sperm hareketi sırasında kıvrılma ve mikrotübüler kayma için iskelet oluşturan keratin proteini içermektedir.

Kuyruğun son parçasında ise sadece aksonem bulunmaktadır ve çok kısa bir parçadan oluşur.





Şekil 4.2.2.1 İnsan Sperm Yapısı Şematik Gösterimi(Fawcett D.,1970)

A.Baş, B. Boyun, C.Ara parça, C/E. Kuyruk, D. Esas parça, E. Kuyruk son parça.  
 1.Plazma Membranı 2.Dış akrozomal membran 3. Akrozom 4. İç akrozomal membran  
 5. Nükleus(çekirdek) 6.Proksimal sentriol 7.Distal sentriol 8. Dış yoğun lif  
 9.Mitokondri 10.Aksonem 11.Annulus

#### 4.2.3.Fertilizasyon (Döllenme) Nedir?

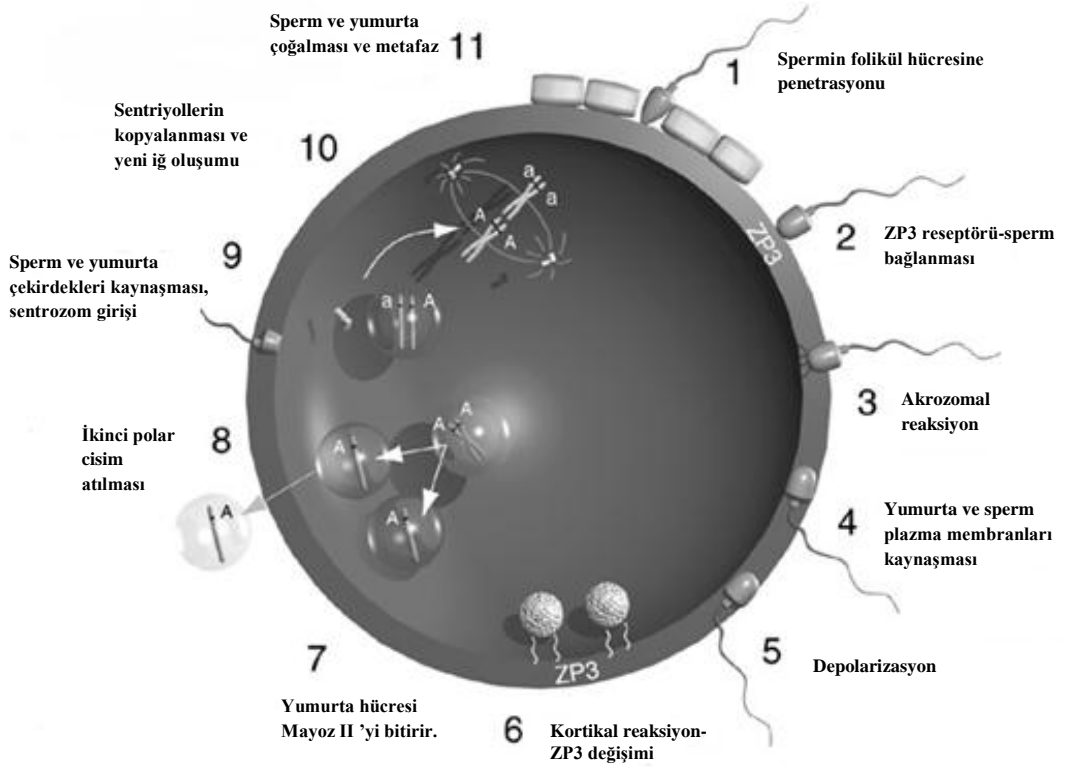
İki germ hücresinin(spermatozoon ve oosit) kaynaşması diğer bir deyişle çekirdeklerinin birleşmesi olayına **fertilizasyon** denir. Dişi genital kanalına  $10^7$  spermatozoon bırakıldığı halde ovidukta ulaşabilenlerin sayısı 100-150 arasındadır ve spermadaki spermatozoonların sadece %0,002'si oosite ulaşabilmektedir. Döllenme süreci gerçekleşmeden önce iki olay meydana gelmektedir; epididimiste **spermin maturasyonu** ve dişi üreme kanallarındaki **sperm kapasitasyonu**.

Testisteki seminifer tübüle bırakılan sperm epididimis kanalına girer ve burada henüz sirküler bir harekete sahiptir. Burada yaklaşık 2 haftalık bir olgunlaşma sürecine girerler ve fertilizasyon için ileri hareket yeteneği kazanırlar. Ejakülasyondan sonra sperm dişi üreme kanalında (uterus) kapasitasyon geçirir ve ovidukt kanalında (tuba uterina) oosit döllenmesini geçirerek sürece devam eder.

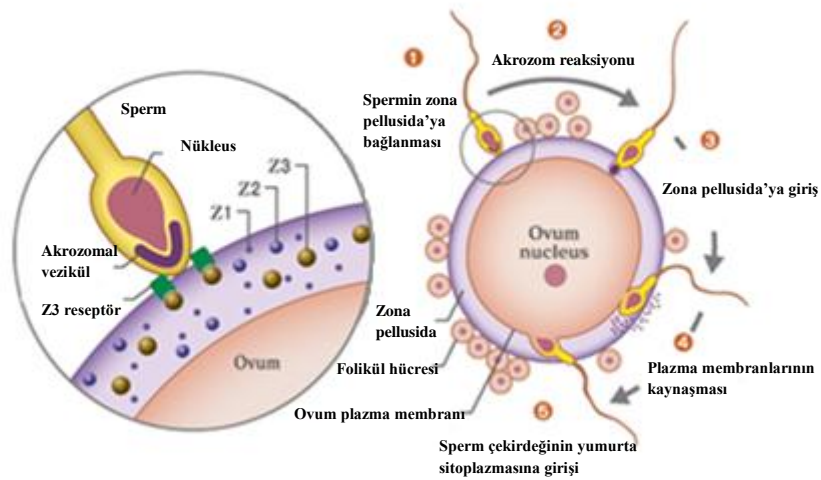
**Kapasitasyon**, spermatozoa ile dişi genital sistem mukozası arasında olan bir etkileşim sonucunda spermiyumun uğradığı fonksiyonel ve morfolojik değişikliktir. Kapasitasyon yaklaşık 7 saat sürer ve bu sayede spermiyum zona pellucida tabakasına tutunabilir. Spermiyum hiperaktivite yeteneğini burada kazanır ve tuba uterina epitelinden ayrılarak oositi bulma yolunda devam eder. Bu esnada spermin plazma membranında da bazı değişimler yaşanmaktadır. cAMP miktarı artar, adenil siklaz aktivitesinde artış olur, membrandaki  $Ca^{+}$  kanal aktivasyonu ve tirozin fosforilasyon aktivasyonuna bağlı olarak intasellüler  $Ca^{+}$  miktarı yükselir ki, bu spermin daha hareketli olmasını sağlar.

Sadece maturasyon ve kapasitasyon süreçlerini tamamlayan sperm bir oositi dölleyebilir ve sperm bu süreçleri sperm-oosit birleşmesinden önce tamamlamalıdır.(Şekil 4.2.3.1)

- Spermatozoon korona radyataya yakınlarında akrozom içeriğini (hiyaluronidaz) salar ve akrozom reaksiyonu geçirir.
- Sperm zona pellucidaya ulaşır ve ZP3'e bağlanır (Sadece akrozom reaksiyonu geçirmiş sperm ZP3 proteine bağlanabilir).Bu bağlanma iç akrozomal membrandan akrozin salınımını sağlar, spermin-zona pellucida girişi kolaylaştırır.
- Sperm oositin plazma membranı ile birleşir ve plazma membranları arasında füzyon gerçekleşir.(Şekil 4.2.3.2)



Şekil 4.2.3.1 Fertilizasyon Aşamaları (<http://docplayer.biz.tr/8227360-Fertilizasyon-yariklanma-ve-implantasyon-bilaminar-disk-olusumu-prof-dr-murat-akkus.html>)



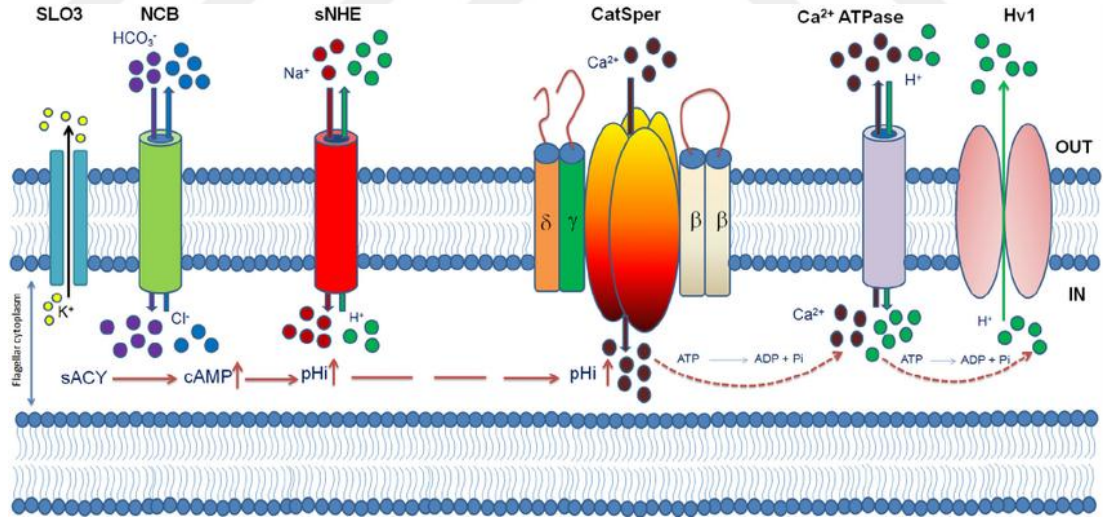
Şekil 4.2.3.2. Sperm plazma membranı-Oosit plazma membranı füzyon şematik gösterimi ([http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/18\\_07.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/18_07.html))

### 4.3 Catsper Proteini Yapısı ve Özellikleri

Sperm katyon kanalı (Catsper), (+) yüklü  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının sperm hücresi içine girişini kontrol eden sperme özgü, düşük-voltaja bağlı, pH duyarlı bir iyon kanalıdır[4, 14].

Catsper kanalı, sperm hareketliliği için gerekli olan  $\text{Ca}^{2+}$  girişini sağlayarak spermatozoonun döllenme için dişi üreme kanalında yumurta hücresini bulmasını sağlar[15].

Dört ayrı por şekilli  $\alpha$  alt biriminden oluşan heterotetramerik  $\text{Ca}^{2+}$  kanalıdır. Bunlar Catsper 1-4 ve üç yardımcı alt birimi Catsper  $\beta$  (Beta), Catsper  $\gamma$  (Gama), Catsper  $\delta$  (Delta) oluşturmaktadır. (Şekil 4.3.2.1) Birkaç alt birimin kompleks oluşturması gereklidir ki; fonksiyonel koordinasyonu, flagella(kuyruk) lokalizasyonu, hücre içi pH duyarlılığı, progesteron ve hücre içi sinyal moleküllerine ihtiyaç duyulmaktadır[16, 17].(Şekil 4.3.1)



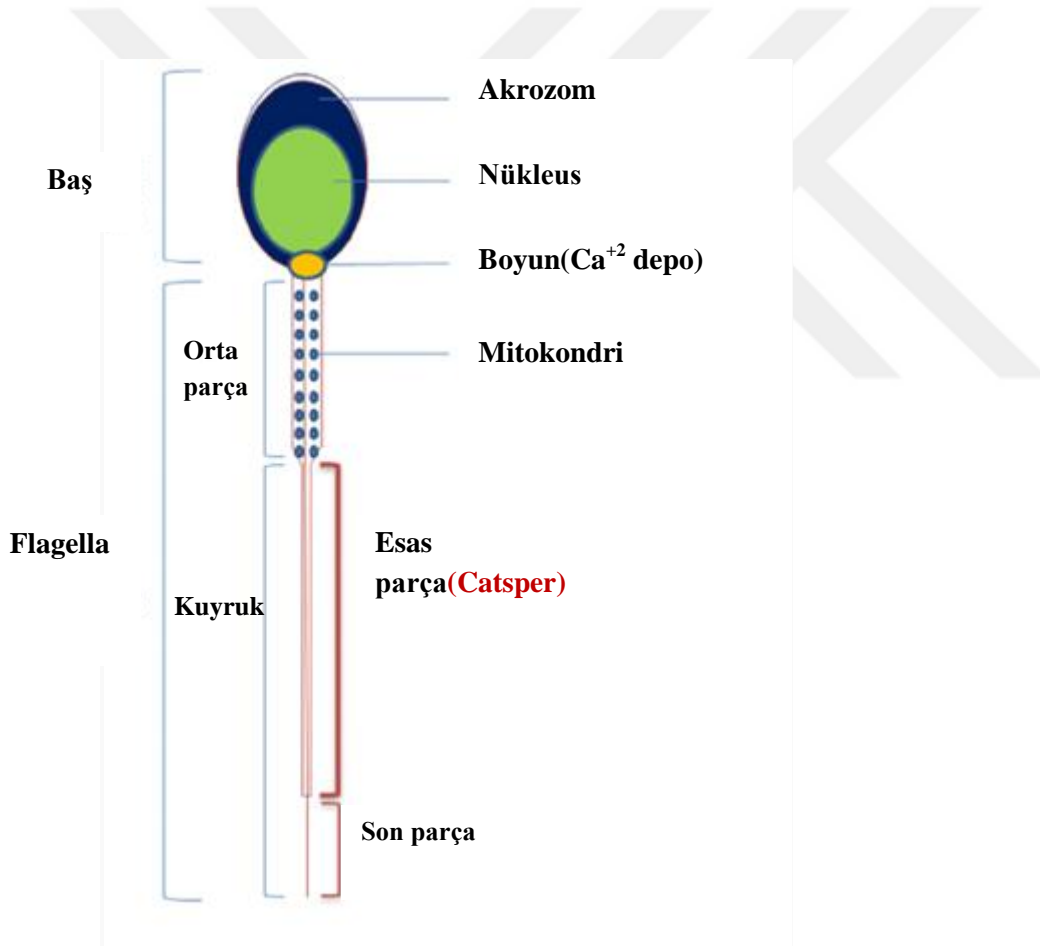
Şekil 4.3.1 Catsper kanalının fonksiyon ve regülasyonu (Singh AP.,2015)

İyon kanalı proteinlerinden bazıları belli dokularda eşit şekilde eksprese edilir. Testis, spermatosit, spermatozoada voltaj kapılı  $\text{Ca}^{2+}$  iyon kanalları vardır.

Normal fizyolojik koşullar altında sperm membran potansiyeli ve hücre içi pH, Catsper kanal agonistleri veya fizyolojik uyarılar varlığında aktive olacak minimum aktif olacağı değerdedir[18].

#### 4.3.1.Catsper Ekspresyon ve Lokalizasyon

Catsper doğum sonrası 18.günden itibaren başlar ve erişkin testiste maksimum seviyeye ulaşarak eksprese edilir. İnsan ejakülat sperm haricinde fare ve domuz spermünde de bulunmuştur. Sadece testiste eksprese edilir ve sperm kuyruğun ana parçasında lokalizedir. (Şekil 4.3.1.1)(19).



Şekil 4.3.1.1 Spermde Catsper protein lokalizasyonu (Singh AP.,2015)

Catsper 1,3,4 transkriptleri geç evre germ hattında (spermatid) sınırlıdır. Catsper 2 spermatogenezin erken safhalarında (pakitene spermatosit) ifade edilir [19]. Catsper1

sadece spermatozoada bulunur ve farklı olarak hücre içi pH değişikliği ile kanal aktivasyonu sağlamaya yardımcı olan histidinden zengin bölge içerir ve düzenlemesi doğrudan spermatogenez ve seksüel maturasyon ile ilişkilidir. Catsper  $\gamma, \beta, \delta$  testislerde spermatosit ve spermatidlerde ifade edilir, lokalizasyonu spermatozoon kuyruk ana parçasıdır [15] (Şekil 4.3.2.3). Catsper kanalları aynı zamanda  $Ca^{+}$  bağlı akrozomal reaksiyona katkıda bulunur [20].

#### 4.3.2 Catsper Düzenlenmesi

Sperm kuyruğunda  $Ca^{+}$  konsantrasyonunu dengeleyen 2 flagellar  $Ca^{+}$  transport proteini vardır:

1. Spermatozoon dışına  $Ca$  pompalayan 4  $Ca$  ATPaz,
2. Spermatozoon içine ekstrasellüler  $Ca$  girişi sağlayan Catsper kanalı,

Catsper kanalı hücre içi pH'taki değişikliklerle düzenlenir, hücre içi pH artışı ile artar[21] bu da spermdeki hücre içi  $Ca$  konsantrasyonu artışına neden olur ve hızlı sperm hareketini kolaylaştırır. Memeli döllenmesi için gerekli fizyolojik olay olan sperm hiperaktivasyonu sırasında  $Ca$  konsantrasyonu artar. Hiperaktivasyonlu motilite ise yumurta epitelindeki rezervuardan çıkmak ve oosit "zona pellusida" sına nüfuz etmesi için gereklidir[22, 23].

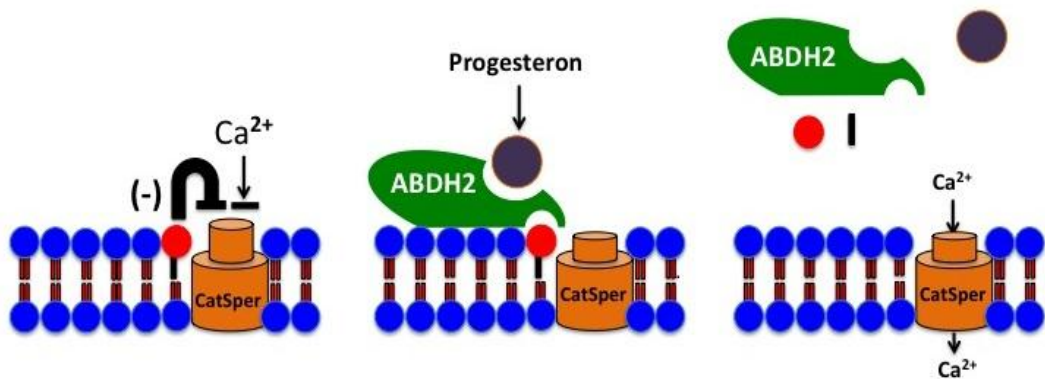
İnsanda progesteron ve prostaglandinler Catsper'ı doğrudan harekete geçirilmesi yoluyla  $Ca$  akımını uyarır[24]). Sperm prostat sıvısı ile paketlenerek penisten paket halinde atılır. PSA enzimi (Prostat spesifik antijen) paketin içinde yer alarak sperm vajinaya ulaştığında bu paketi eritir ve o esnada ovaryum tarafından(cumulus oophorus) progesteron serbest bırakılır. Yumurta çevresindeki cumulus hücreleri insan spermine karşı yüksek  $Ca^{+}$  akışı başlatır. Bu da sperm hiperaktivasyonunu başlatır, akrozom reaksiyonu oluşur[22]. Spermeler hiperaktif hale gelmeden önce  $Ca^{+}$ 'un dış membrandan içeri girip kamçıyı hareket ettirecek mitokondriden zengin bölgeye ulaşması gerekir[25]. Catsper burada olaya katılarak  $Ca^{+}$ 'un kamçı bölgesine ulaşmasını sağlayan kanal proteini işlevindedir.

ABHD2; insan spermünde bulunan progesteron reseptörü işlevi görmektedir, progestinleri bağlayan bölgeye sahiptir [26]. Progesteron, ABHD2 (progesteron-dependent lipid hydrolase) bağlandığında enzim aktif hale geçer. Lipid parçalama özelliği olduğu için hücre zarı üzerindeki 2AG'yi (2-araşidanoik gliserol) parçalar. 2AG parçalanmalıdır; çünkü hücre zarı üzerinde olduğunda Catsper kanalı çalışmaz [27].

Progesteron etkisi ile ABHD2 aktive olur ve 2AG'yi parçalar. Catsper kanalı serbest kalır ve hücre içine Ca pompalayabilir[28]. Buradaki Ca sperm hareketliliğini artırır. Yumurta hücresi dış zarını delebilecek şekilde sperm hiperaktif hale geçmesini sağlar[14].

Progesteron duyarlılığı sperm gelişimi ve olgunlaşma sürecinde artar. Bu duyarlılıktaki değişim dişi üreme kanalında bir filtreleme görevi görerek olgun ve kaliteli sperm yumurtayı döllemesini sağlar.

Sonuç olarak baktığımızda progesteron doğrudan ABHD2'yi aktive eder ve Ca kanalının çalışmasını durdurabilir, sperm aşırı hareketli olmasını engelleyen 2AG'yi ortadan kaldırır. 2AG aktivasyonu ortadan kalktığında Catsper kanalı serbest kalır ve sperm içine daha fazla Ca+girebilir. Ca'un sperm içinde artması ise kamçının uyarılmasını sağlar, bu sperm hiperaktif hale gelmesini sağlar.(Şekil 4.3.2.1) [30]

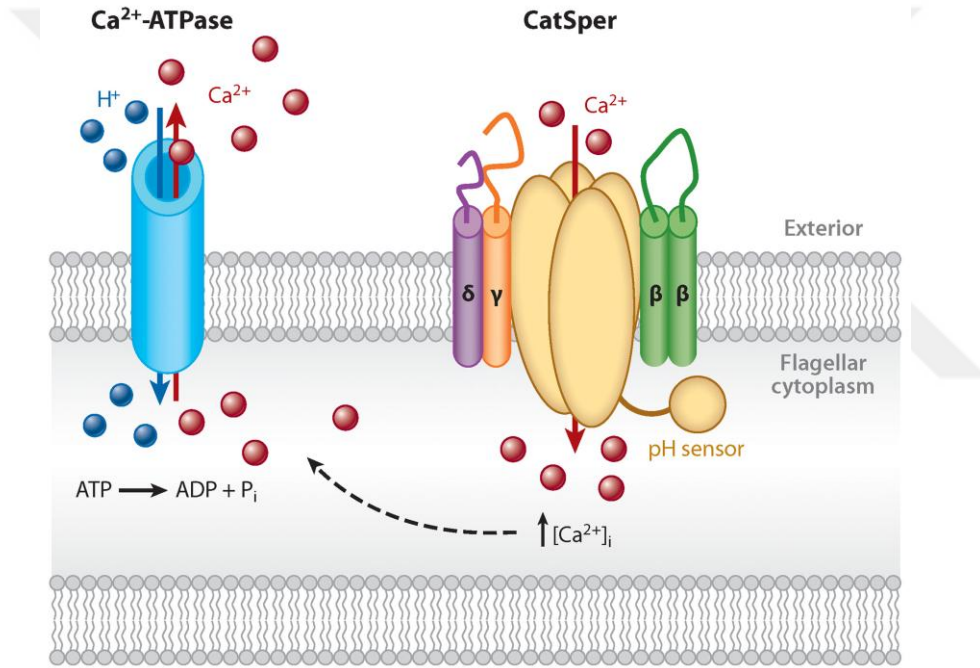


Şekil 4.3.2.1 Catsper kanal düzenlenmesi.(Miller R.,2016)



Spermin hücre içi pH düzenlenmesine yardımcı birkaç kanal vardır, Hv1; voltaj kapılı H<sup>+</sup> kanalı, spermde ana parçada lokalizedir (principal piece). Plazma membranında H<sup>+</sup> iletkenliğini korumada görevlidir [29]. Bulunduğu lokalizasyon nedeniyle pH duyarlı olan Catsper kanalı düzenlenmesinde önemli işlevi olduğu düşünülmektedir[30].

Ksper/ SLO3; kapasitasyon sırasında spermatozoayı hiperpolarize eden, pH duyarlı bir kanaldır. Bu hiperpolarizasyon süreci ise Catsper yoluyla Ca girişini kolaylaştırmayı sağlamaktadır[31-34].

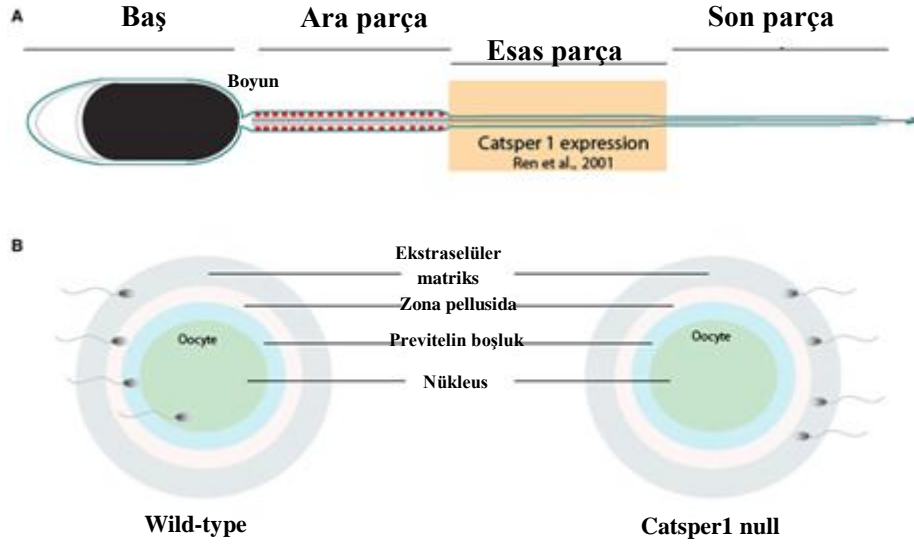


Şekil 4.3.2.2. Catsper kanal heterodimerik yapısı(Singh AP.,2015)

Catsper gen promotörü, testiküler gelişim ve erkek infertilitesi için önemli olan Sox gen aileleri için çoklu bağlanma bölgesi içermektedir[35].

Catsper sadece progesteron ile uyarıldığında belli değerlere ulaşmaktadır ve bazal koşullarda düşük kanal aktivasyonu göstermektedir[36].





Şekil 4.3.2.3. Catsper kanal lokalizasyon ve fonksiyonel önemi (Avenarius MR., 2009)

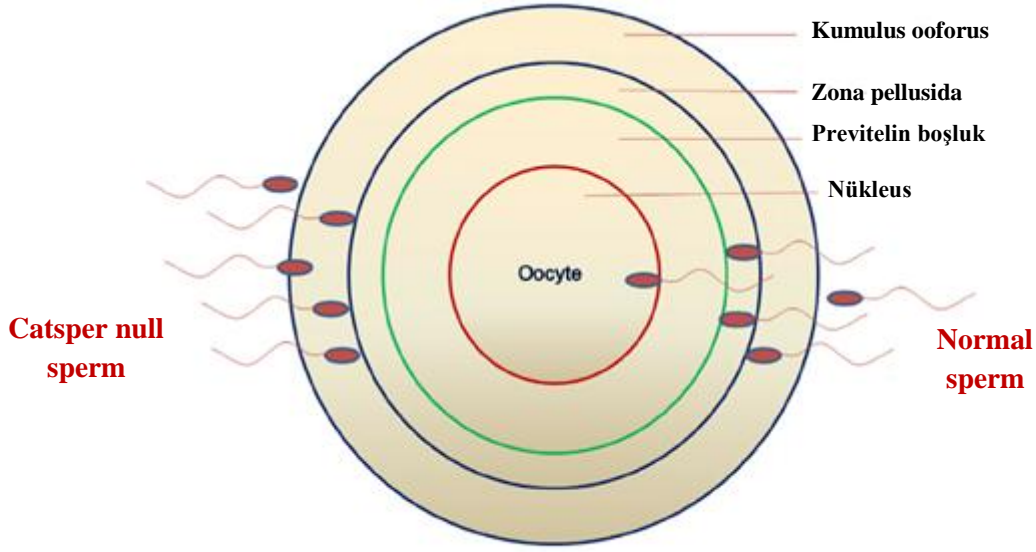
### 4.3.3. Catsper ve Fertilizasyon İçin Önemi

Catsper genleri sadece sperm fonksiyonu ve erkek üremesi için gelişmiştir. Spermde kapasitasyon ve sağlıklı bir fertilizasyon için gereklidir. Sperm kuyruğunda asimetrik ve titreşimli dalgalanma hareketi ancak hiperaktif olmuş spermde görülebilmektedir. Catsper motilite parametrelerini etkilemektedir; İleri hareket parametreleriyle ilişkilendirilmiştir [37-39].

Asimetrik yüksek genlik ve düşük frekanslı, dalgalı hareket ile karakterize edilmiş hiperaktif motilite, spermın yumurta çevresindeki membranı geçmesi için, yumurta penetrasyonu için ve spermın zona pellucidaya ulaşması için gereklidir [20, 40].

Mutant bir sperm dişi üreme kanalındaki rezervuardan öteye geçemez, çünkü yapışkan yumurta epitelini geçmek için gerekli mekanik kuvveti yoktur. Hiperaktivasyon dişi üreme kanalındaki rezervuardan kaçabilmek için gereklidir [41].

Catsper  $\alpha$  altbirimlerinden (1-4) birinin bozulması heterodimerik yapının bozulmasına bu da infertiliteye yol açmaktadır. (Şekil 4.3.3.1) [40]



Şekil 4.3.3.1 Catsper kanal proteinin fonksiyonel önemi (Singh AP.,2015)

#### 4.4 Sox5 proteini

Sox5; erkek cinsiyet tayini başlatan (Testis-belirleyici gen) SRY'nin yüksek hareketlilik grubu (HMG) kutusunun bölgesine homoloji gösteren gen ailesi grubu üyesidir. İlk olarak fare testisinden klonlanmıştır. Özellikle erkek gonadlarda eksprese edilen transkripsiyon faktörlerinin çoğu Sox ailesine aittir.[42] Son yıllarda Sox5 transkripsiyon faktörleri testislerde spermatogenez düzenlenmesinde, sperm olgunlaşma ve kamçı oluşumunda, Spag6 (Memeli sperm ilişkili antijen 6 genleri) gen regülasyonunda önemli role sahiptir[43]. İki büyük transkript kodlar; uzun izoform L-Sox5 ve kısa izoform S-Sox5.[35, 44]

S-Sox5, beyin, akciğer ve özellikle testiste hareketli silyalı dokularda eksprese edilir. Testiste mayoz sonrası yuvarlak spermatidlerin çekirdeklerinde lokalize edilir. Spermde flagella oluşumunda ve işlevinde gerekli olan gen paketinin ekspresyonunu düzenler. Ayrıca hareketli silya oluşumu ve fonksiyonunu kontrol etmek için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. [45, 46]

L-Sox5, kıkırdak, kalp, beyin, böbrek, akciğer ve iskelet kası gibi dokularda eksprese edilir. Testiste bulunmaz. Embriyonik gelişim ve hücre kaderi belirleme süreçlerini düzenlemede önemli rol oynamaktadır.

Motil silya; trakea, beyin, omurilik kanalı ve spermde bulunur. Sperm flagellası özel hareketli bir silyadır ve 9+2 aksonem yapısı içerir[47].Sperm/flagella yapı ve fonksiyonu için gerekli genlerin promotör bölgelerindeki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri analiz edildiğinde silya/flagella genlerinin kontrolü olarak Sox5 tayin edilmiştir.

#### **4.4.1. Sox5 ve Sperm Fonksiyonu İle İlişkisi**

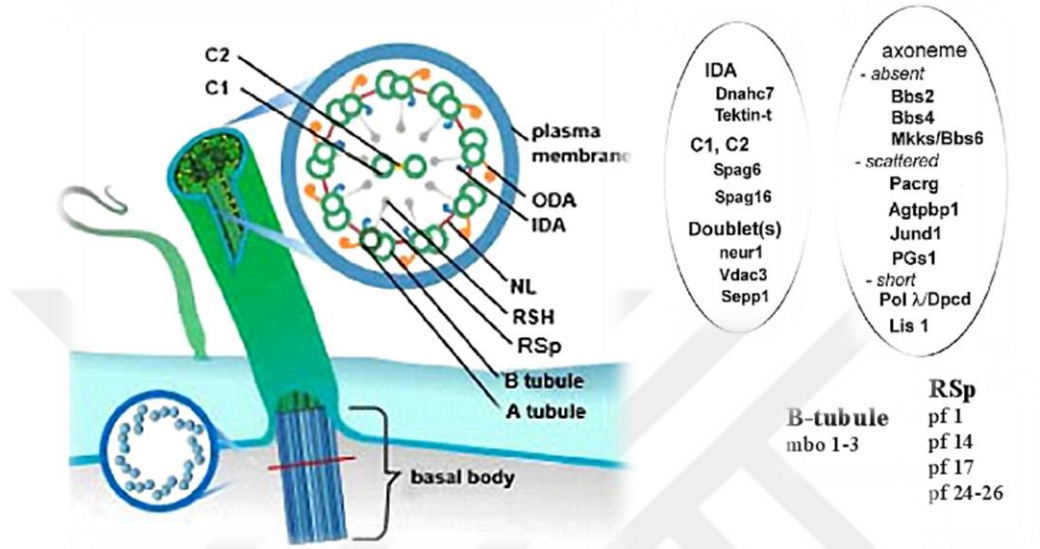
Hareketli silya, beyin ventrikülü, trakea, tuba uterina ve sperm flagella epitel hücrelerinde bulunur. Farklı dokulardaki silya ortak yapısı (9+2 mikrotübül yapısı) silya/flagella ekspresyonlarını yöneten ortak düzenleyici mekanizmalar yoluyla düzenlenmektedir. Hareketli silya işlevi için benzer mekanizmalar gerekli gen ifadesi düzenler ve proteinlerin koordineli ve zamanında hareketli silya düzenlenmesi sağlanır[48].

Sperm ilişkili antijen 6 geninin (Spag6) ekspresyonunu aktive edebildiği gösterilmiştir. Spag6 flagellar hareket için gerekli olan aksonemal proteini kodlayan bir genidir. Sperm flagellar motilite ve spermin yapısal bütünlüğünün korunması için önemlidir[49].

Sox5 transkripsiyon faktörü, mayozdan sonra Catsper1 geni ile koordineli bir ekspresyona sahiptir. Sox5 spermatid hücrelerinin çekirdeklerinde ekspresyon göstermesi Catsper1 geninin transkripsiyonel düzenlemede rolü olduğunu desteklemektedir[50]. Testisteki Catsper1 ve Spag6 genlerinin ekspresyonlarını düzenlediği gösterilmiştir. Sox5, Catsper1 promotörünün transaktivasyonunda artışa neden olur ve promotörüyle etkileşime girerek kanal ekspresyonunu düzenler. S-Sox5 lokusunun testisteki ekspresyon seviyesi artmaktadır bu da sperm fonksiyonu ve erkek üremesi için gerekli genlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır[44].

S-Sox5, silya/flagella oluşumunda düzenleyici rol oynamaktadır. Spag16L (sperm-ilişkili antijen16) spermde aksonemin merkez parçasında bulunmaktadır ve

spermde hareketlilik için önemli bir rol almaktadır. Spag16L promotorunda Sox5 bağlanma yeri ile etkileşime girerek Spag16L'nin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 4.4.1.1)[45].



Şekil 4.4.1.1 Sox5 proteini fonksiyonel lokalizasyonu.

([https://www.researchgate.net/publication/265739093\\_Molecular\\_genetics\\_of\\_the\\_iMMotile\\_short\\_tail\\_sperM\\_d efect](https://www.researchgate.net/publication/265739093_Molecular_genetics_of_the_iMMotile_short_tail_sperM_d efect))

#### 4.5 Fertilin (ADAM2) Proteini

Fertilin, disintegrin ve metalloproteaz bölge yapısı bulunmasından dolayı ADAM ailesi üyesidir. ADAM(Disintegrin ve Metalloprotease Domain) protein ailesinin birkaç üyesi sperm-yumurta füzyonu ile ilişkilendirilmiştir;Fertilin  $\alpha$ , Fertilin  $\beta$  ve Cyritestin.İlk olarak bir kobay spermatozoonlarda baş bölgesinin posterior bölümünde keşfedilmiş ve “pH30” olarak isimlendirilmiştir. Monoklonal bir antikorun pH30 antijeninin döllenmedeki rolünü yansıtabilecek şekilde “Fertilin” adı verilmiştir [51].

Fertilin  $\alpha$  (ADAM1) ve Fertilin  $\beta$  (ADAM2) olmak üzere iki alt birimi olan ve proteaz ucuna sahip heterodimerik bir proteindir. Bu proteinler testiste eksprese edilir ve spermatozoon başında plazma membranında lokalizedir. Cyritestin ise tek bir polipeptid den oluşmaktadır[52].

Fertilin üç farklı bağlanma bölgesi içerir; metalloproteaz, füzyon peptid bölgesi ve disintegrin. Füzyon peptid bölgesi, sperm ve oosit membranlarının birleşmesini uyarır ve miyoblastların birbiri ile kaynaşmasını sağlamaktadır. Metalloproteaz bölgesi hücre göçü sırasında hücre dışı ortam bileşenlerini parçalamaktadır. Disintegrin alanındaki RGD üçlü peptidler sayesinde oosit membranında yer alan integrinlere bağlandığı ve diğer hücre dışı matriks proteinlerin integrinlere bağlanmasını engellediği belirtilmiştir.

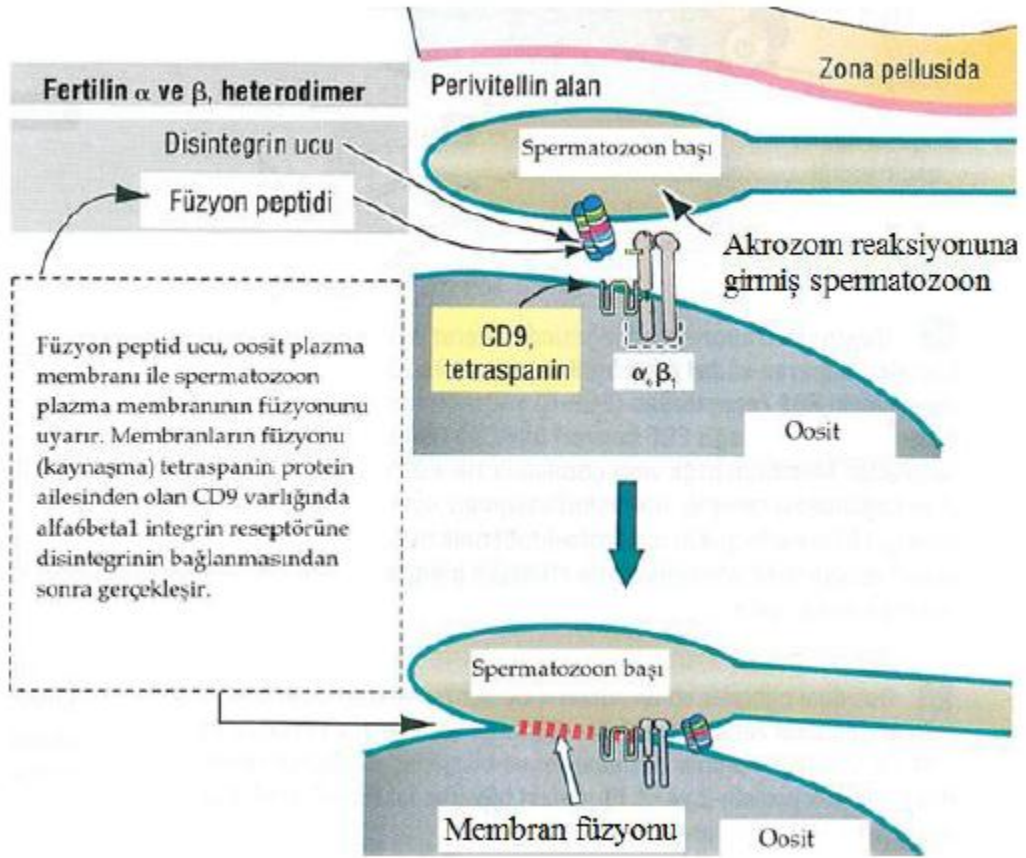
Fertilin  $\beta$  ve cyritestin, disintegrin alanı yumurta plazma membranında bulunan integrin ile etkileşime girerek sperm yumurta birleşmesine aracılık ederler. Fertilin $\alpha$  ise oositte integrinlere bağlanabilen bir disintegrin bölgesine ek olarak “füzyon peptit” adı verilen bir aminoasit dizisine sahiptir[53].

Spermin plazma membranında; oositteki zona pellucida'ya bağlanacak olan sperm reseptörleri ve fertilin proteini yer almaktadır. Fertilin ekvatoryal bölgede bulunan sperm plazma membranının içine yerleşmiştir[54]. Fertilin  $\beta$  ve Fertilin  $\alpha$ , tetraspain üyesinden CD9 proteini varlığında yumurtadaki plazma membranındaki  $\alpha 3\beta 1$  integrin reseptörüne bağlanır ve fertilin  $\beta$ 'nin füzyon bağlanma bölgesi sperm ve yumurta plazma membran kaynaşmasını sağlamaktadır (Şekil 4.5.1)[57].

Hücre zarı penetrasyonunda rol oynayan füzyon peptit kriterleri şöyledir;

- Bir tarafında yüklü aminoasit, diğer tarafında hidrofobik tortu ile  $\alpha$ -heliks modelleme yeteneği,
- Membrana bağlı altbirimde lokalizasyon,
- Kısmen güçlü bir hidrofobisite (su geçirmezlik),

Bu kriterleri karşılamasından dolayı sperm ADAM'larının sperm-oosit bağlanma ve füzyonunda rol oynaması desteklenmektedir. [54]



Şekil 4.5.1 Sperm-oosit füzyonunda Fertilin-İntegrin etkileşimi(Kierszenbaum L.,2006)

#### 4.5.1. Fertilin Proteinin Fertilizasyon için Önemi

Fertilin, fertilizasyonda sperm-oosit füzyonu için önemlidir ve Fertilin proteini nakavt edilmiş çalışmalarda aşağıdaki kriterlerin sağlanamadığı tespit edilmiştir[55].

- Sperm-Zona pellusida bağlanması,
- Sperm-oosit plazma membranına bağlanması,
- Tuba uterina'dan geçen sperm seviyesindeki artış.

Fertilin  $\beta$ 'nın proteolitik işlenmesinden tripsin benzeri serin-proteazlar sorumludur. Proteazların epididimal sıvıya ya da akrozoma salındığı ve belli seviyede durması gerektiği bilinmektedir. Proteolitik olarak işlenmesi korpus epididimis ve kauda epididimiste başlar, proksimal kauda kısmında son bulur ve

proteolitik işlenmesi tamamlanmış bir spermde fertilin baş kısmının posterior bölümünde göçünü tamamlamaktadır.

Fertilin  $\beta$  eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalarda %87 oolemma-bağlanma yeteneğinde azalma ve %50 yumurta-sperm füzyonunda azalma gösterilmiştir. Cyritestin eksikliğinde ise sperm-oosit füzyonu normal olarak gösterilirken, oosite bağlanma yeteneğinde bir düşüş tespit edilmiştir. Spermatozoon morfolojisi, sayısı, ejakülat motilitesi, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun fertilin yokluğundan etkilenmediği bildirilmiştir [56].



## 5. MATERYAL ve METOT

### 5.1. Hasta Grupları

İstanbul Medipol Üniversitesi MEGA Hastanesi Tüp Bebek Polikliniği'ne başvuran, fizik muayenelerinde varikozel ve ürogenital sistem enfeksiyonu bulguları olan hastalarla, testis tümörü, kemoterapi, radyoterapi, doğumsal ve endokrin hastalık hikayesi olan hastalar, sigara, alkol kullanan hastalar çalışma gruplarına dahil edilmemiştir. Ayrıca hastalarda doğumsal penis anomalisi, seksüel bozukluk, retrograd ejakülasyon bulunmamasına dikkat edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) laboratuvar kılavuzuna göre uygun olan hastalardan alınan örnekler kullanılmıştır.

20-50 yaş arası 60 kişiden sperm sayısı  $>20 \times 10^6$  /ml sperm konsantrasyonunda, normal morfoloji  $>4\%$  ve hareketliliği  $>50\%$  sahip bireyler normozoospermik, sperm konsantrasyonu  $<20 \times 10^6$  /ml, normal morfolojisi  $<4\%$  ve hareketliliği  $<50\%$  sahip olanlar oligoastenoteratozoospermik (OAT) olarak gruplandırılmıştır. Çalışmayı kabul eden ve 3-5 günlük cinsel perhiz süresi uygun olan erkeklerden semen analizi yapılmış ve DSÖ kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. İki grup standart semen parametre değerleri tablo 5.1.1'de gösterilmiştir.

Çalışma için İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (10840098-604,01,01-E,9279) alınmış ve çalışma kriterlerini karşılayan her hastadan 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' doldurmaları istenmiştir. Normozoospermi grubun yaş ortalaması  $\pm 38$  ve Oligoastenoteratozoospermi grubun yaş ortalaması  $\pm 35$  olarak saptandı.



**Tablo 5.1.1 Normozoospermi ve OAT grupta semen parametreleri**

Parametreler	Normozoospermi(n=30)	OAT(n=30)
	3,50	3,9
<b>Sperm Sayısı(<math>10^6</math>/ml)</b>	47,5	17,4
<b>Hızlı Progresyon(%)</b>	10,8	5,8
<b>Yavaş Progresyon(%)</b>	30,8	22,1
<b>İmmotil (%)</b>	14,1	14,2
<b>Normal Morfoloji(%)</b>	1,3	0,5
<b>Baş Anomalisi(%)</b>	55,7	58,7
<b>Ara Parça Anomalisi(%)</b>	22,7	20,5
<b>Kuyruk Anomalisi(%)</b>	20	20,3
<b>Sitoplazmik Droplet (%)</b>	6,6	8,1
<b>Teratozoosperm- indeksi(TZI)</b>	1,06	1,08

## 5.2. Semen Analizi

Semen analizi aşağıdaki aşamaları içerir;

*İlk 5 dakika içinde:*

- Hasta örneğini likefaksiyon süresi boyunca ( $37^{\circ}\text{C}$ ) bekletmek,
- 30 ilâ 60 dakika arasında:*

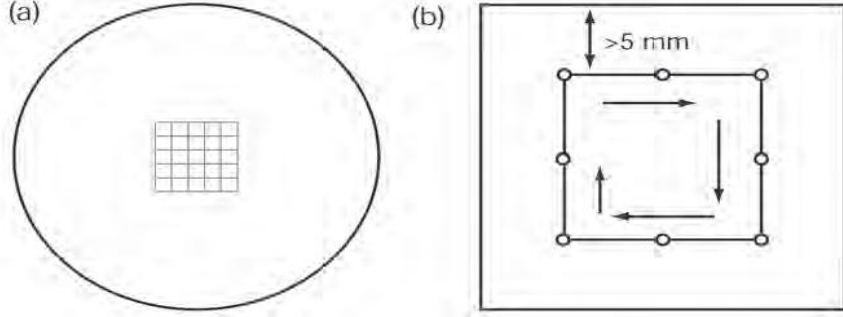
- Likefaksiyon olmuş örneğin (semen) değerlendirilmesi,
- Semen hacim ölçümü,
- Ejakülattaki spermin motilite ve sayı olarak belirlenmesi,
- Semen yayma preparatı hazırlanması,

*Dört saat sonra:*

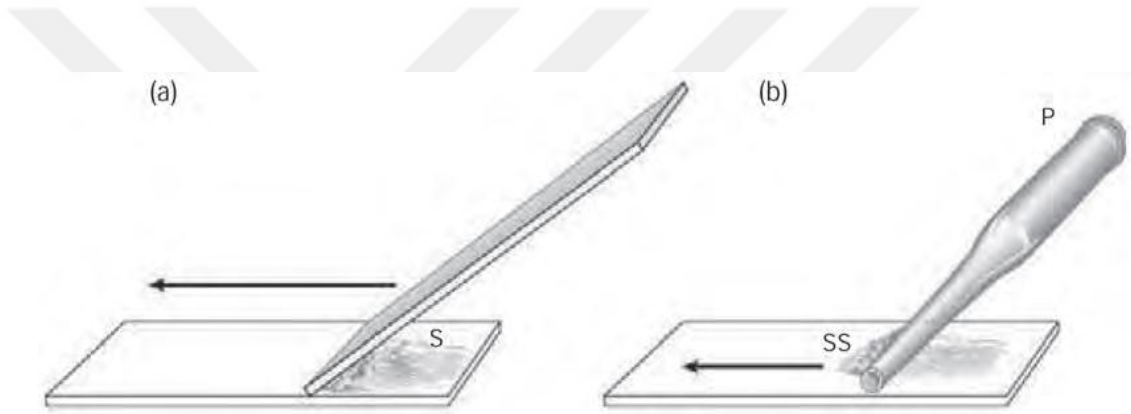
- Sperm morfolojisinin değerlendirmesi için yayma preparatının fiksasyonu ve ardından boyanması.

En az 3 en fazla 5 günlük cinsel perhiz süresine uygun olan Normozoospermi ve Oligoastenoteratozoospermik gruplardan alınan taze semen örnekleri  $37^{\circ}$ 'lik etüvde 15 dakika inkübe edilmiştir. Likefikasyon işleminden sonra her bir semen örneği üzerine 4 ml yıkama medyumu (HTF/HEPES,ART-1023) eklenerek santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmış ve pellet üzerine 0.4 ml yıkama medyumu

eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım pastör pipeti ile alınarak pozitif şarjlı lama damlatılmış ve yayma (*smear*) preparatı olarak hazırlanmıştır.(Şekil 5.2.2)



Şekil 5.2.1 Makler kamera görüntü alanı



Şekil 5.2.2 Yayma preparat hazırlanması

### 5.3. Motilite Değerlendirilmesi

Semendeki sperm motilitesi, örneğin likefaksiyonundan sonra yaklaşık 30 dakikada değerlendirilmiştir. Isı değişikliği, pH ve dehidratasyonun motilite üzerinde olumsuz etkileri ortadan bu şekilde kaldırılmıştır. Sperm motilitesi Makler sayım kamerası (Sefi Medical Instr) ile 10X10 'luk alandaki sperm baz alınarak çift kör şeklinde uzman embriyologlar tarafından yapılmış, değerlerin ortalaması alınmıştır. (Şekil 5.2.1)Işık mikroskobu düzeyinde değerlendirilmiştir. Sperm analizi sonucunda ejakülat içerisindeki spermler sayı, motilite ve morfolojilerine göre sınıflandırılmıştır.

**Tablo 5.3.1 DSÖ Sperm Parametreleri (Who,2010)**

PARAMETRELER	2010 DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ
<b>Baş</b>	
Genişlik	2.8 µm
Uzunluk	4.1 µm
Boy/En	1.5
Akrozomal bölge	Başın %40-70'ini kaplamalıdır.
<b>Boyun ve orta parça</b>	
Genişlik	0.6 µm
Uzunluk	4.0 µm
Sitoplazmik atıklar	< Normal baş alanı 1/3'ü.
<b>Kuyruk</b>	
Uzunluk	45 µm
Genişlik	< orta parça

**Tablo 5.3.2 DSÖ Semen Parametreleri (Who,2010)**

PARAMETRELER	2010 DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ
Semen hacmi (ml)	1.5
Total sperm (10 <sup>6</sup> /ejekülat)	39 (33-46)
Sperm sayısı/ml (10 <sup>6</sup> /ml)	15 (12-16)
Total motilite (%)	40 (38-42)
Progresif hareketli (%)	32 (31-34)
Canlılık (vitalite) testi (%)	58 (55-63)
Normal morfolojide sperm (%)	4 (3.0-4.0)
pH	≥ 7.2
Peroxidaz pozitif lökosit (10 <sup>6</sup> /ml)	< 1

Spermatozoanın hareketlilik bakımından derecelendirilmesi aşağıdaki gibidir:

- İleri hareketli (Progresif Motilite; PR; a): Doğrusal bir daire içinde hızdan bağımsız olarak aktif hareket eden spermatozoa.
- Yerinde hareketli (Nonprogresif Motilite; NP; b): İleriye doğru hareketin olmadığı ya da ileriye herhangi başka bir yöne doğru hareketin olmadığı kalıplar. Örneğin; küçük daireler halinde yüzme, başı yerinden güçlkle oynatan kamçısal hareket veya yalnızca kuyruğun kamçısal hareketi gözlenebilir.
- Hareketsizlik (İmmotilite; IM; c): Hareketin olmadığı spermatozoa. Motilite, ileri hareket (Progresif Motilite;PR), yerinde hareket (Nonprogresif Motilite;NP), hareketsizlik (İmmotilite;IM) şeklinde DSÖ kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda 30 Normozoospermi ( $a+b \geq 32$ ) ve 30 Oligoastenoteratozoospermi ( $a+b \leq 32$ ) hasta örnekleri çalışılmıştır.

Oligoastenoteratozoospermi: Toplam sperm sayısı alt referans limitlerinden düşük, hem morfolojik hem de ileri hareket yüzdesi normal sperm yüzdesinden azdır.  
Normozoospermi: Toplam sperm sayısı alt referans limitlerine eşit veya yüksek, ileri hareketli (PR) ve morfolojik olarak normal spermatozoa yüzdesi.

**Tablo 5.3.3 Morfolojik değerlendirme tablosu (Who,2010)**

**Morfolojik Değerlendirme\***

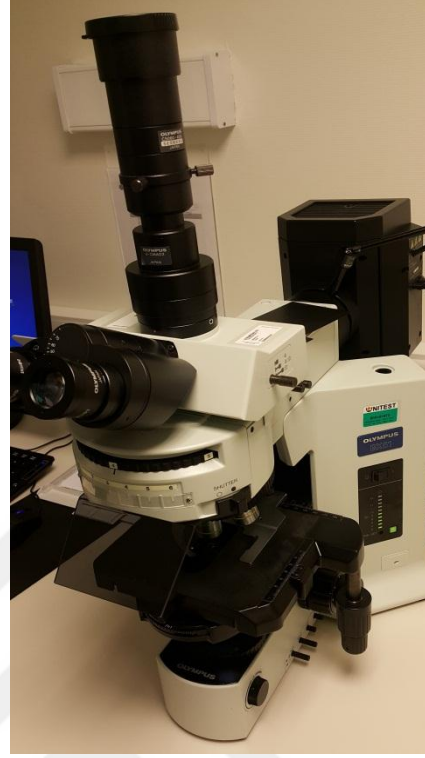
normal morfoloji	:	%	0
baş anomalisi	:	%	0
ara parça anomalisi	:	%	0
kuyruk anomalisi	:	%	0
sitoplazmik droplet	:	%	0
Teratozoospermi indeksi-TZI:			0,00
*Kruger kriterlerine göre morfolojik inceleme yapılmıştır			

**Tablo 5.3.4 Basit sperm analiz tablosu (Who,2010)**

<b>Basit Sperm Analizi</b>		<i>referans deęer</i>
Görünüm	: normal	opak, kirli beyaz-sarı
Koku	: normal	kendine has
Likefaksiyon süresi	: 15	≤ 30 dk,
Viskozite(akışkanlık)	: normal	normal
Reaksiyon (pH)	: 7,2	7,2-7,8
Hacim (ml)	: 0,0	≥ 1,5 ml,
Sperm sayısı (konsantr.)	: 0	≥ 15 milyon /ml
Total sperm sayısı	: 0	≥ 39 milyon
Motilite oranı (a+b)	: % 0	≥ % 32
a) hızlı progresyon	: % 0	
b) yavaş progresyon	: % 0	
c) progresif değil	: % 0	
d) hareketsiz	: % 100	
Total fonks, sperm (TPMSS)	: 0	
Normal morfoloji (Kruger)	: % 0	> %4 normal
Vitalite (vital boyama)	: bakılmadı	≥ % 58 canlı
Aglutinasyon	: yok	yok
Round cell	: <1	< 1 milyon/ml,
Lokosit (peroksidaz pozitif)	: <1	< 1 milyon/ml,



Santrifuj



Faz-Kontrast Mikroskop



Makler Sayım Kamerası

#### 5.4. Spermac Stain Kit ile Morfolojik Değerlendirme

Mikroskopik inceleme için faz-kontrast mikroskop (Olympus BX51) kullanılmıştır. Spermac stain kit boyası (FertiPro N. V Belgium) kullanılarak spermelerde baş-boyun-kuyruk morfolojisi değerlendirilmiştir.

1. Likefiye olmuş ve konsantrasyon değerlendirilmesi yapılmış sperm örneği pozitif şarjlı lam üzerine yaklaşık 10µl olacak şekilde damlatılmış ve yayma preparat haline getirilmiştir.
2. Kuruması beklendikten sonra sırayla fiksatif, katyonik boya, anyonik boya içerisinde 1'er dakika kalacak şekilde bekletilmiş ve kuruması sağlanmıştır.
3. Boyama tamamlandıktan sonra faz-kontrast mikroskopta 100X büyütme kullanılarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre sperm morfolojisi değerlendirilmiştir.
4. Her preparattan 100 sperm seçilmiş, kuyruk, boyun, sitoplazma, baş morfolojisine bakılarak ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse Ni) fotoğrafları çekilmiştir.

#### **5.5. Apoptoz Tayin Protokolü**

Çalışma hipotezi doğrultusunda hasta grupları arasında apoptoza (programlanmış hücre ölümü) uğrayan sperm sayısını belirlemek amacıyla TUNEL yöntemi(In Situ Cell Death Detection Kit, Roche) kullanılarak bakılmıştır.

- Likefiye olmuş semen örneği üzerine sperm yıkama mediumu (yaklaşık 4 ml) eklenerek 5 dakika boyunca 200 rpm' de santrifüj edilmiştir.
- 5 dakika sonunda pellet ve süpernatant kısımları 2 faz olarak ayrılmıştır. Süpernatant kısmı atılmış ve pellet kısmı alınarak tekrar yıkama mediumu(0,4 ml) ile konsantre edilerek pozitif şarjlı lam üzerine yayma preparat hazırlanmıştır.
- Hazırlanmış lamlara fikse olmaları için PFA (Paraformaldehit) damlatılarak 60 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Fiksatif uzaklaştırılması için 3 defa 5'er dakika olmak üzere PBS (Phosphate Buffered Saline-Sigma Aldrich's) solüsyonu ile yıkaması yapılmıştır.

- Permeabilizasyon işleminden geçirdikten sonra TUNEL kitindeki enzim-etiketleme solüsyonlarından 1/9 oranında karışım hazırlanmıştır. (5 µl + 45 µl) 37°C'lik etüvde 1 saat, üzeri ışık almayacak şekilde kapatılmış ve o şekilde inkübasyonu yapılmıştır.
- Tekrar PBS solüsyonu ile 3 defa 5'er dakika yıkaması sağlanarak DAPI çekirdek boyasında yaklaşık 5 dakika bekletilmiş ve preparat lamel ile kapatılmıştır, 40X büyütmede konfokal mikroskopta incelemesi yapılmış 100 sperm sayılmış apoptoz (TUNEL +) hücrelerin fotoğrafı çekilmiştir.

### **5.6. Sox5 Proteini için İmmü Floresan Boyama Prosedürü**

- Hastalardan alınan semen örneği yıkanıp, konsantre edildikten sonra temiz bir polyizimli lama yayma preparat olarak hazırlanmıştır.
- Preperatlar -20°C' de soğutulmuş methanol içerisine alınarak 20 dakika bekletilerek fikse edilmiştir.
- Örnekler 3 kez 5'er dakika DPBS-T(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline-Gibco) solüsyonuyla yıkandıktan sonra %0,1 TritonX-100/DPBS içerisinde 10 dakika inkübe edilmek üzere shaker'a (80 rpm) alınmıştır.
- Süre sonunda yine 3 kez 5'er dakika DPBS-T solüsyonu ile yıkandıktan sonra bloking için BSA(Bovine Serum Albumin-Thermo Scientific) ile 60 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Yıkama yapılmadan primer (Dilüsyon oranı 1:50) hazırlanarak örnek üzerine 75 µl damlatılarak 37°C'lik etüvde 2 saat inkübasyonu yapılmıştır.
- Daha sonra 3 defa 5'er dakika DPBST ile yıkanarak sekonder antibody(1:100) damlatılmıştır.



- 37°C’de yaklaşık 2 saat üzerine alüminyum folyo ile sarılı şekilde bekletildikten sonra tekrar yıkanmış ve DAPI’li kapatma mediumu damlatılarak preparat lamel ile kapatılmıştır.
- Konfokal mikroskopta (Zeiss LSM 780 NLO) 40X büyütmede görüntülemesi yapılmış ve 100 sperm sayılarak iki grup arasında değerlendirilmesi yapılmıştır.

### **5.7. Catsper 1 Proteini için İmmünfloresan Boyama Prosedürü**

- Hastalardan alınan semen örneği yıkayıp, konsantre edildikten sonra temiz bir polyüzinli lama yayma preparat olarak hazırlanmıştır.
- Önceden -20°C’de soğutulmuş aseton şaleye alınarak preparatlarla birlikte yaklaşık 12 dakika bekletilerek hücreler fikse edilmiştir.
- Distile suda bir kez 5 dakika fiksatif hücrelerden uzaklaştırıldıktan sonra %0,05 TritonX-PBS ile 3 defa 5’er dakika yıkanmıştır.
- Daha sonra %3’lük BSA bloking için hazırlanarak 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Süre sonunda primer hazırlanarak (1:50) örneklerin üzerini kaplayacak kadar damlatılıp +4°C’de bir gece bekletilmiştir.
- Ertesi gün primerden alınan preparatlar tekrar %0,05 TritonX-PBS karışımı ile 3 defa 5’er dakika olmak üzere yıkaması yapılmıştır.
- Sekonder antikor hazırlanarak (1:100) preparat üzerinde damlacık oluşturacak şekilde damlatılmış ve oda sıcaklığında üzeri alüminyum folyo ile sarılarak 1 saat inkübe edilmiştir.

- Sekonderden alınan preparatlar tekrar yıkanmış ve DAPI'li kapatma mediumu (Prolong Gold antifade reagent with DAPI-İnvitrogen) damlatılarak lamel ile kapatılmıştır.

### **5.8. Fertilin (ADAM2) Proteini için İmmünfloresan Prosedürü**

- Hastalardan alınan semen örneği yıkanıp, konsantre edildikten sonra temiz bir polyüzinli lama yayma preparat olarak hazırlanmıştır.
- Hazırlanmış lam üzerine fiksatif olarak taze hazırlanmış %4'lük PFA damlatılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Yıkama mediumu olarak PBS kullanılmış ve 2 defa 5'er dakika yıkaması yapılmıştır.
- Bloking için %3'lük BSA hazırlanmış ve 30 dakika oda sıcaklığında shaker'da (80 rpm) bekletilmiştir.
- Süre sonunda yıkama yapılmadan üzerindeki bloking peçeteye akıtılarak primer antikor(1:100) damlatılmıştır ve +4°C'de bir gece inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün primerini uzaklaştırmak amacıyla 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır.
- Sekonder antibody hazırlanarak (1:400) örnekler üzerine damlatılmış ve alüminyum folyo ile kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- PBS ile son yıkaması yapıldıktan sonra DAPI'li kapatma mediumu damlatılarak preparatlar lamel ile kapatılmıştır.

### **5.9. İmmunohistokimya Boyama Prosedürü**

- Hastalardan alınan örnekler likefiye olduktan sonra yıkanmıştır ve pellet kısmı ayrılıp pozitif şarjlı lama yayma preparat olarak hazırlanmıştır.

- Preparatlar fikse olmaları amacıyla %4 'lük Nötral Buffered Formalin (NBF) solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
- Daha sonra distile suda 5 dakika ve PBS solüsyonunda 5 dakika olmak üzere şalede yıkanmıştır.
- Hücrelerdeki endojen peroksidaz aktivasyonunu doyurmak amacıyla preparatlar %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerisinde 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Solüsyondan alınan preparatlar 3 defa 5'er dakika olmak üzere PBS te yıkanmıştır.
- Hazırlanan 25 ml, Sitrat Buffer + 225 ml distile su karışımı 800 Watt'da 3 dakika mikrodalgada kaynatılmıştır. Kaynayan sitrat buffer içerisine preparatlar koyulup 200 Watt'lık güçte 10 dakika kaynatılmıştır ve daha sonra 20 dakika oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuştur.
- Preparatlar soğutulduktan sonra PBS ile yıkanmıştır ve bloking solüsyonu lama yayılacak kadar damlatılarak 5 dakika bekletilmiştir.
- Primer antikor 1:100 oranında dilüe edilerek preparat üzerine damlatılmış ve 1 gece +4°C'de nemli ortamda inkübasyonu sağlanmıştır.
- Ertesi gün inkübasyondan alınan preparatlar 3defa 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır.
- Kesitlerin üzerini kapatacak kadar damlatılarak 20 dakika oda sıcaklığında shaker üzerinde, nemli bir ortamda bekletilmiştir.

- Yıkandıktan sonra üzerine HRP (Acu-Stain Mouse+Rabbit-Genemed Biotechnologies) solüsyonu damlatılarak 20 dakika boyunca aynı şartlarda bekletilmiştir.
- 1/20 oranında DAP kromojen/substrat (ScyTek) karışımı hazırlanmıştır ve hücreler gözlemlenerek 7 dakika bekletilmiştir.
- Süre sonunda Mayer's hematoksilen boyası damlatılarak 4 dakika bekletilmiş ve çeşme suyunda mordanlaması yapıldıktan sonra preparatlar lamel ile kapatılmıştır.

### 5.10.PCR Protokolü

PRIMER	FOWARD	REVERS
ADAM-2	TGG AGT CTT CAG TTG GCT TTG	GCT GTG GCT CTA CGC TTT GT
GAPDH	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA

#### 1. Semen örneklerinin hazırlanması

- 1 ml semen örneklerinin üzerine 4 ml DPBS eklenmiştir ve al ver yapılmıştır. Homojen hale gelen semen karışımı 30 saniye vortekslendikten sonra 1500 rpm de +4 dereceye soğutulmuş santrifüjde 15 dakika çevrilmiştir.
- Çevirme işlemi bittikten sonra supernatant aspire edilmiştir ve pellet RNA izolasyonu için ayrılmıştır.

#### 2. RNA örneklerinin hazırlanması

- 1 ml %100 ethanol ile 1 ml RNA lysis buffer karıştırılıp örnek üzerine eklenmiştir.(Quick-RNA™ MicroPrepCatalogNos.R1050&R1051)
- Bu karışım homojen hale gelene kadar al ver yapılmıştır ve RNA-spin kolonuna alınmıştır. 30 saniye 11000g de çevrilmiş ve filtrenin altında kalan kısmı atılmıştır.
- Kolonun üzerine 400 ul RNA yıkama buffer eklenmiştir ve 30 saniye 11000g de çevrilip alt kısmında kalanlar atılmıştır.

- Ayrı bir tüpte 5 µl DNase 1 ve 35µl DNA digestion bufferi karıştırılıp hazırlanmıştır. (1 örnek için miktarı)
- Bu karışım kolonun üstüne eklenmiş ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildikten sonra 30 saniye 11000g de çevrilmiştir ve altta kalanlar atılmıştır.
- Kolonun üzerine 400ul RNA prep buffer eklenmiştir ve 30 saniye 11000g de santrifüj edilmiştir. Altta kalanlar atılmıştır.
- Kolonun üzerine 700 µl RNA yıkama buffer eklenmiş 30 saniye 11000g de çevrilip altta kalanlar atılmıştır.
- Kolonun üzerine 400 µl RNA yıkama buffer eklenmiştir. 2 dakika 11000g de çevrildikten sonra altta kalan atılmıştır ve RNase-olmayan tüp içine alınmıştır.
- 15 µl DNase/RNase olmayan su eklendikten sonra 30 saniye santrifüj edilip örnekler Nanodrop (LightCycler® 480 SYBR Green I Master) ile RNA konsantrasyon miktarı ölçülüp -80°C' e koyulmuştur.

### 3. cDNA sentezi

- RNA miktarı ölçülmüş semen örneklerinde kıyaslama yapmak için benzer konsantrasyonlara ayarlama yapmak gerekir !
- Dntp—2.5 µl  
Random hexamer—1µl  
RNA örneği—12 µl  
Su—
- PCR tüpünde hazırlanan bu karışım 16.5 µl olacak şekilde su eklenmesi yapılmıştır.
- Bu tüp PCR makinesinde RNA MELT opsiyonunda bekletilmiştir. Sıcaklık 65° 'de 5 dakika, 4 °C'de sonsuz olacak şekilde ayarlanmıştır.
- 5 dakika sonrasında tüp hızlıca buz üzerine alınmıştır.
- Farklı bir PCR tüpünde RT mix hazırlanmıştır.

5x ilk strand buffer –5µl

DTT – 2µl

Rnasin – 0.5 µl

- Toplamda 7.5 µl olan bu karışım örnek üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda 1 µl MMLV RT enzimi eklenip karıştırılmıştır ve vortekslenmiştir.
- PCR makinesi RNA RT programına ayarlanmıştır. Örnekler önce 37°C’de 1 saat sonra 70°C’de 15 dakika bekletilip aktive edilmiştir ve 4°C’de sonsuz bekleme alınmıştır.

#### 4.Real Time PCR

- Beyaz 96 kuyucuklu PCR plateleri kullanılmıştır. Plate tasarımı önceden oluşturulmuştur.
- 1 örneklilik master mix için;
  - Master mix
  - 10 µl SYBR green
  - 7 ul su
  - 1 µl primer mix
- Primer mix
  - Forward primer 100 UM—5 µl
  - Revers primer 100 UM—5µl
  - Nuclease olmayan su – 90µl
- Her kuyucuk maksimum 20 µl hacimli olduğundan 18 µl master mix ve 2 µl cDNA örneği yüklenmiştir.
- Plate yüklendikten ve pipetlendikten sonra üzeri stiker ile kaplanıp Lightcycler480 cihazına yüklenmiştir.
- 95 °C’de 5 dakika  
 95 °C’de 10saniye  
 60 °C’de 10 saniye  
 72 °C’de 30 saniye  
 4 °C’de sonsuz
 

45 siklus
-----------
- Süre sonunda excel datasından analizi yapılmıştır.

### **5.10. Kullanılan Kimyasallar**

- Yıkama Mediumu (HTF/HEPES, ART-1023)
- Spermac Stain Kit (FertiPro N. V Belgium)
- TUNEL Kiti (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche)
- PBS (Sigma Aldrich's)
- BSA (Thermo Scientific)
- Acu-Stain Mouse+ Rabbit (Genemed Biotechnologies)
- Large Volume Ultrab Dilüent (Thermo Scientific)
- Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen)
- DAP Chromogen/substrat Kit (ScyTek)
- Paraformaldehyde (Sigma Aldrich's)
- TritonX-100 (Sigma Aldrich's)
- Tween20 (Sigma Aldrich's)
- Hydrogen Peroxide Solution (Sigma Aldrich's)
- Methanol (Sigma Aldrich's)
- Aseton (Sigma Aldrich's)
- VectaMount Kapatma Mediumu (Vector)
- DPBS (Gibco)
- Catsper1 Antibody (Antibodies Online)
- Sox5 Antibody (Santa Cruz)
- Fertilin (ADAM2) Antibody (Bioss Inc.)
- Goat Anti Rabbit LgG 488 Antibody (Thermo Scientific)
- Quick-RNA™ MicroPrepCatalogNos. R1050 & R1051
- LightCycler® 480 SYBR Green I Master

### **5.11. Kullanılan Cihazlar**

- Konfokal Mikroskop (Zeiss LSM 780 NLO)
- Makler Sayım Kamerası (Sefi Medical Instr)
- Faz-Kontrast Mikroskop (Olympus BX51)
- Işık Mikroskobu (Axiozoom V16)
- Işık Mikroskobu (Nikon Eclipse Ni)

## 5.12. Kullanılan Solüsyonlar

- **%0,01 DPBST Hazırlanışı**

500 ml DPBS içine 50 µl Tween20 eklendi.

- **%3'BSA Hazırlanması**

10X BSA solüsyonu içinden 180 µl alınarak 420 µl PBS içinde çözüldü.

- **PFA Hazırlanması**

100 ml PBS içine 4 gr, Paraformaldehit tartılarak eklenmiştir ve içine bir tane NaOH atılarak çözüldü ve pH'ı 7,4 olarak ayarlandı.

- **TritonX-PBS Hazırlanması**

**%0,05 için**, %1'lik TritonX-PBS içinden 1 ml alınarak 19 ml PBS ile dilüe edildi.

**%0,1 için**, 50 ml PBS içine 50 µl TritonX eklenerek hazırlandı.

- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Hazırlanması**

10 ml hidrojen peroksit alınarak 90 ml methanol içine tamamlandı.

- **Primer Antibody Hazırlanması**

1:50 için; her bir preparat için 73,5 µl Dilüent buffer içine 1,5 µl eklenerek hazırlandı.

- **DAP Hazırlanması**

1 ml DAP substrat buffer içine 50 µl DAP kromojeni eklenerek hazırlandı.



### 5.13.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Statistical Package for the Social Sciences (15.0 Veri Analizi SPSS) programı kullanılarak yapılmıştır. Semen analizi, motilite, morfoloji,apoptoz, fertilin,catsper ve sox5 protein ekspresyonları Student T-Test (Matlab mathworks 2015b) kullanılarak yapılmıştır ve  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.



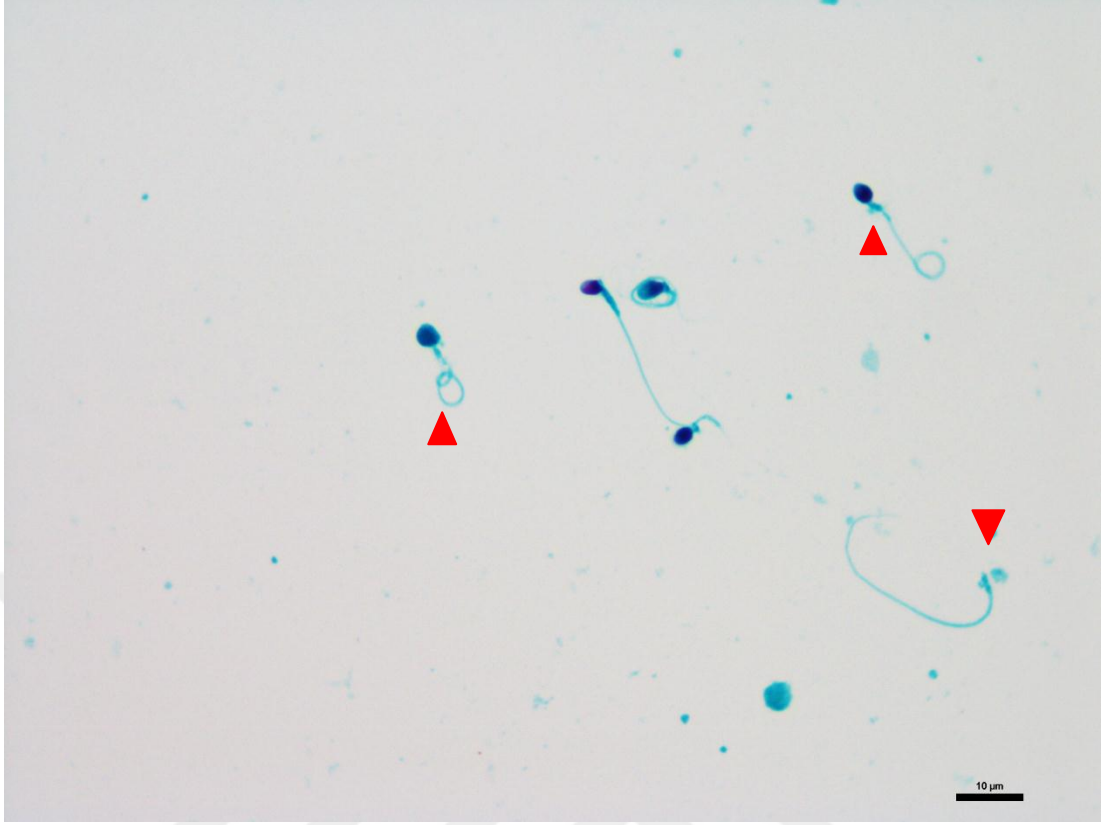
## 6. BULGULAR

### 6.1.Morfolojik Değerlendirme

Çalışılan örneklerin morfolojik değerlendirilmesi Spermac stain kit boyası ile yapılmıştır, Normozoospermi grupta, spermelerde normal morfolojide olan sperm çok sayıda gözlenirken (şekil 6.1.1); OAT grupta, sperm boyanmasında normal morfolojide sperm sayısında önemli derecede azalma görölmüştür. Daha çok boyun kırığı, kıvrık kuyruk, sitoplazmik droplet ve akrozomal bozukluklar gibi defektler gözlemlenmiştir.(şekil 6.1.2)



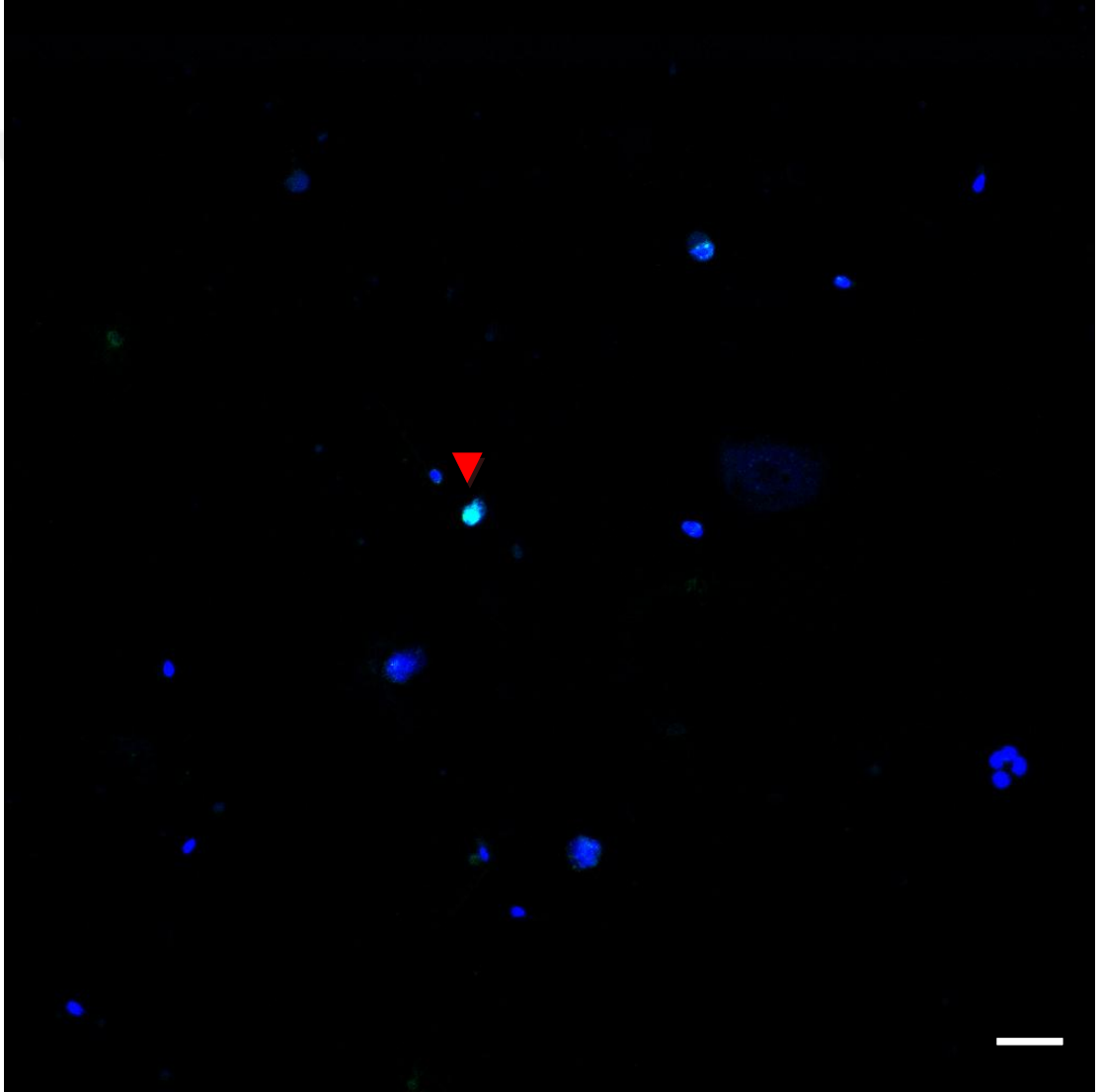
**şekil 6.1.1 Normozoospermi grupta morfolojik değerlendirme.** *Barlar=10 µm.(Spermac stain boyası X100)*



**Şekil 6.1.2. OAT grupta morfolojik değerlendirme.** Barlar=10 µm.(Spermac stain boyası X100) OAT örneklerde sperm sayısında belirgin bir azalma ve baş, boyun ve kuyruk deformiteleri izlendi, İğne baş spermler de mevcuttu (kırmızı okbaşı),

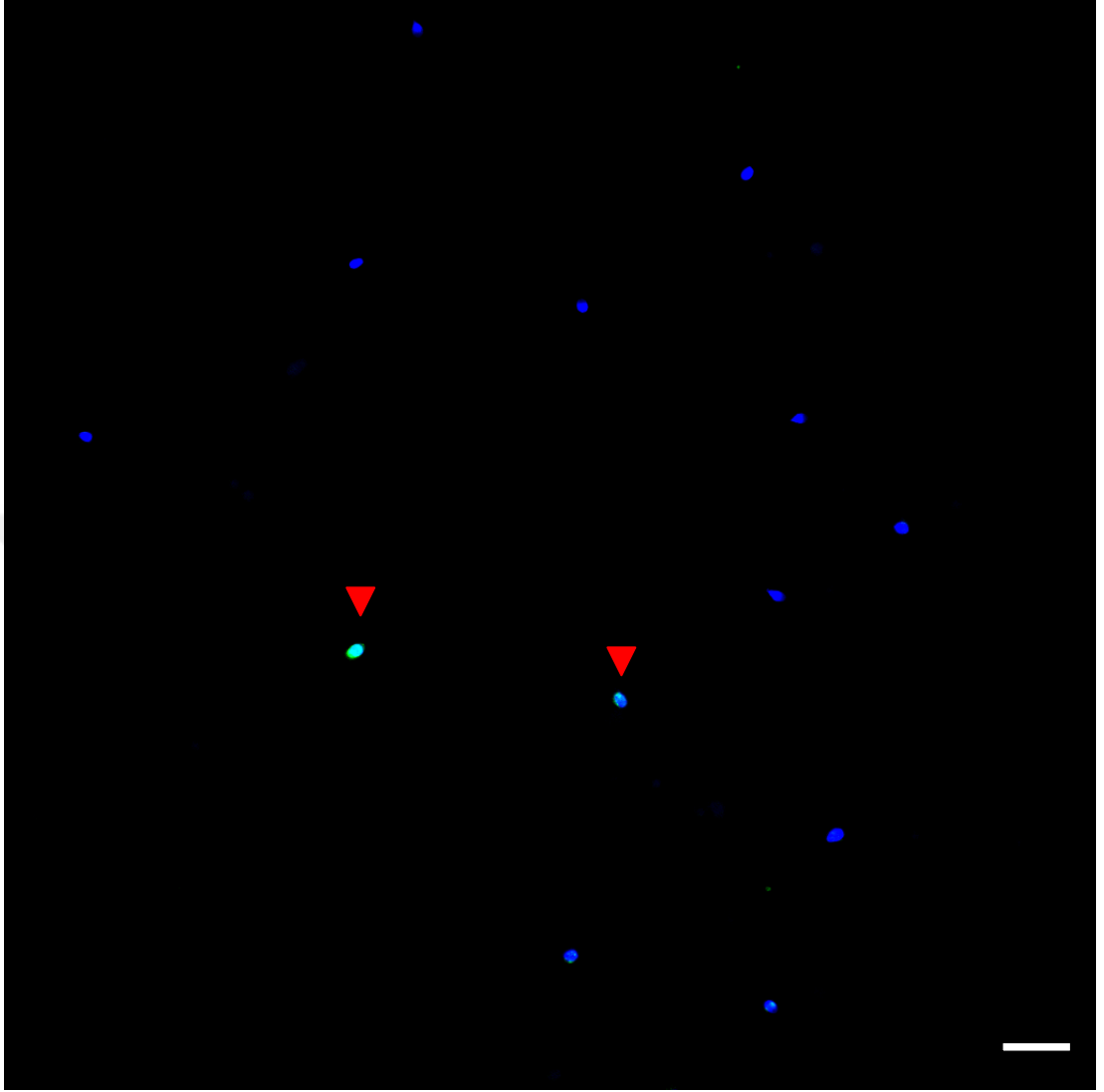
## 6.2.Apoptoz Bulguları

Çalışma hipotezi üzerine yapılan apoptoz oranlarına TUNEL yöntemi kullanılarak bakılmıştır. Normozoospermi grubunda yapılan (Şekil 6.2.1) TUNEL değerlendirilmesinde (+) olarak kabul edilen hücreler OAT grubu TUNEL(+) hücre sayısından daha az bulunmuştur(Şekil 6.2.2).



**Şekil 6.2.1 Normozoospermi grupta apoptoz değerlendirilmesi**

*Normozoospermi örneklerde bazı spermatozoada boyanma (okbaşları) izlenirken çoğu sperm TUNEL boyanmadı. Barlar=50 µm.(X40)*



**Şekil 6.2.2. OAT grupta apoptoz değerlendirilmesi**

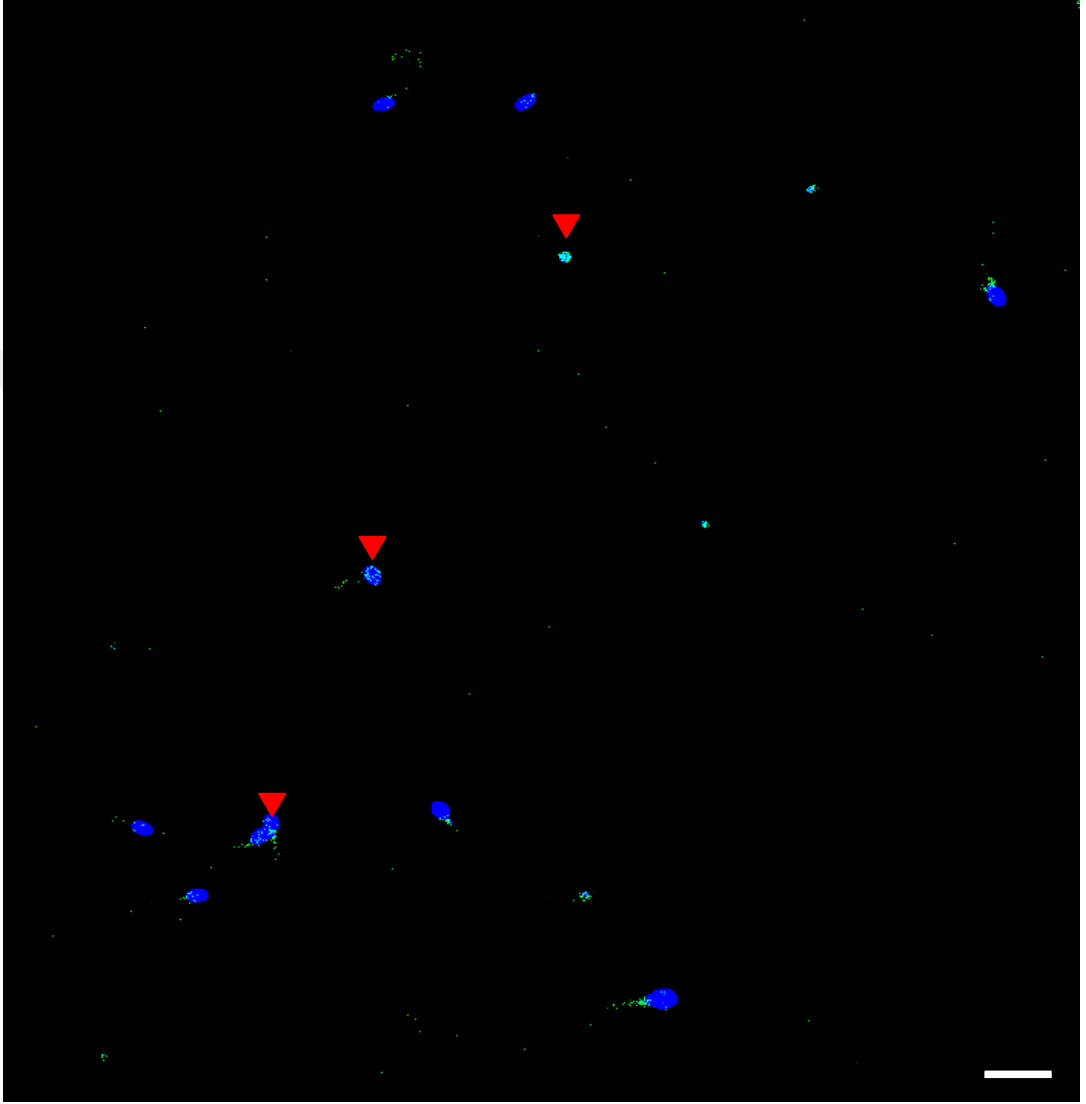
*OAT grubunda TUNEL (+) hücre sayısında artış saptanmıştır. Barlar=50 µm.(X40)*

### **6.3.İmmunfloresan Bulguları**

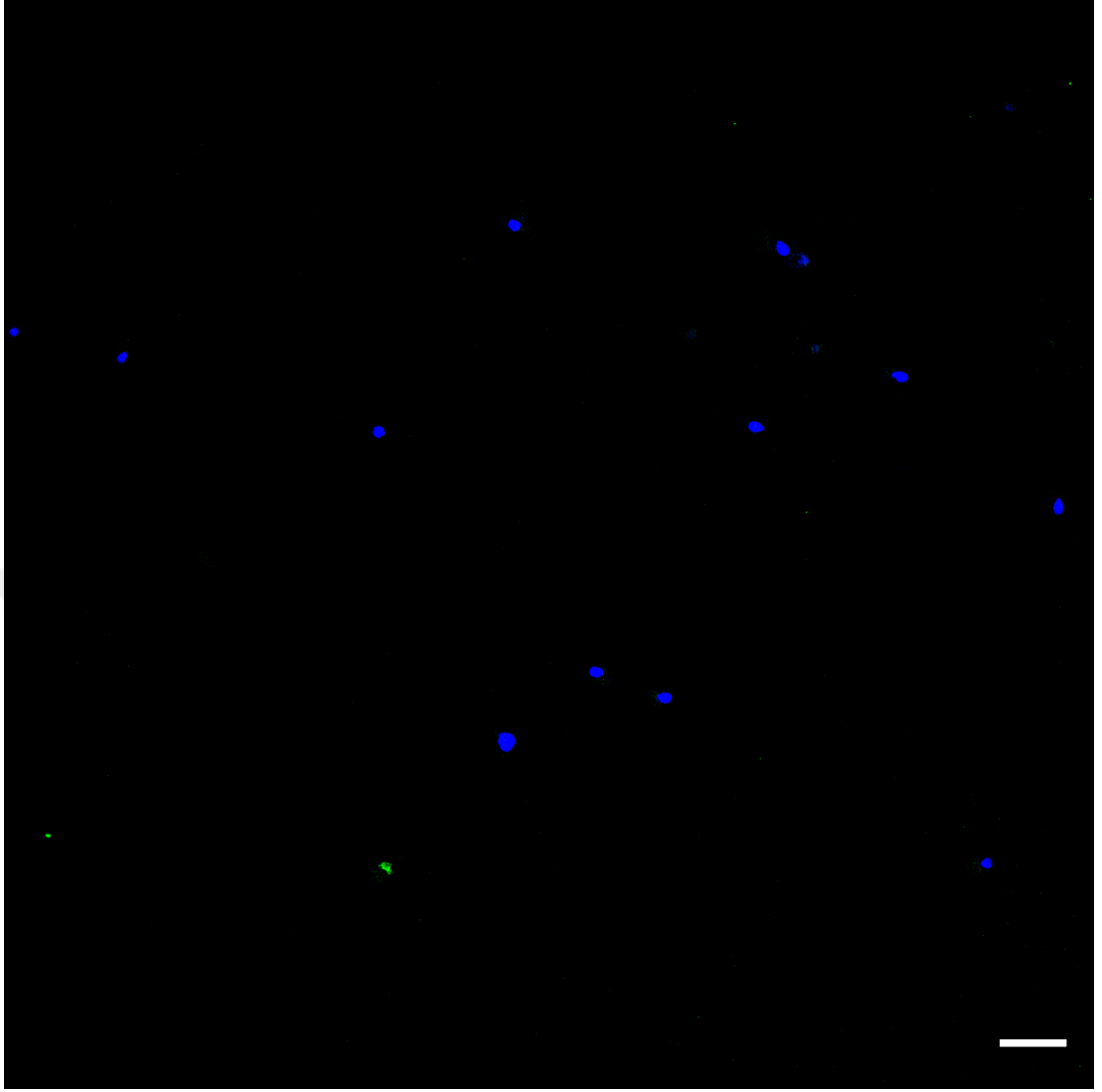
Normozoospermi ve OAT gruplarda, spermiler Sox5 proteini lokalizasyonu ve ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda OAT grubunda spermde bakılan (Şekil 6.3.2) Sox5 ekspresyonu Normozoospermi grupla karşılaştırıldığında anlamlı ( $p<0.001$ )

olarak bir azalma göstermektedir. Böylelikle, yapılan incelemelerde Sox5'in spermin nukleusunda lokalize olduğu tespit edilmiştir(Şekil 6.3.1).

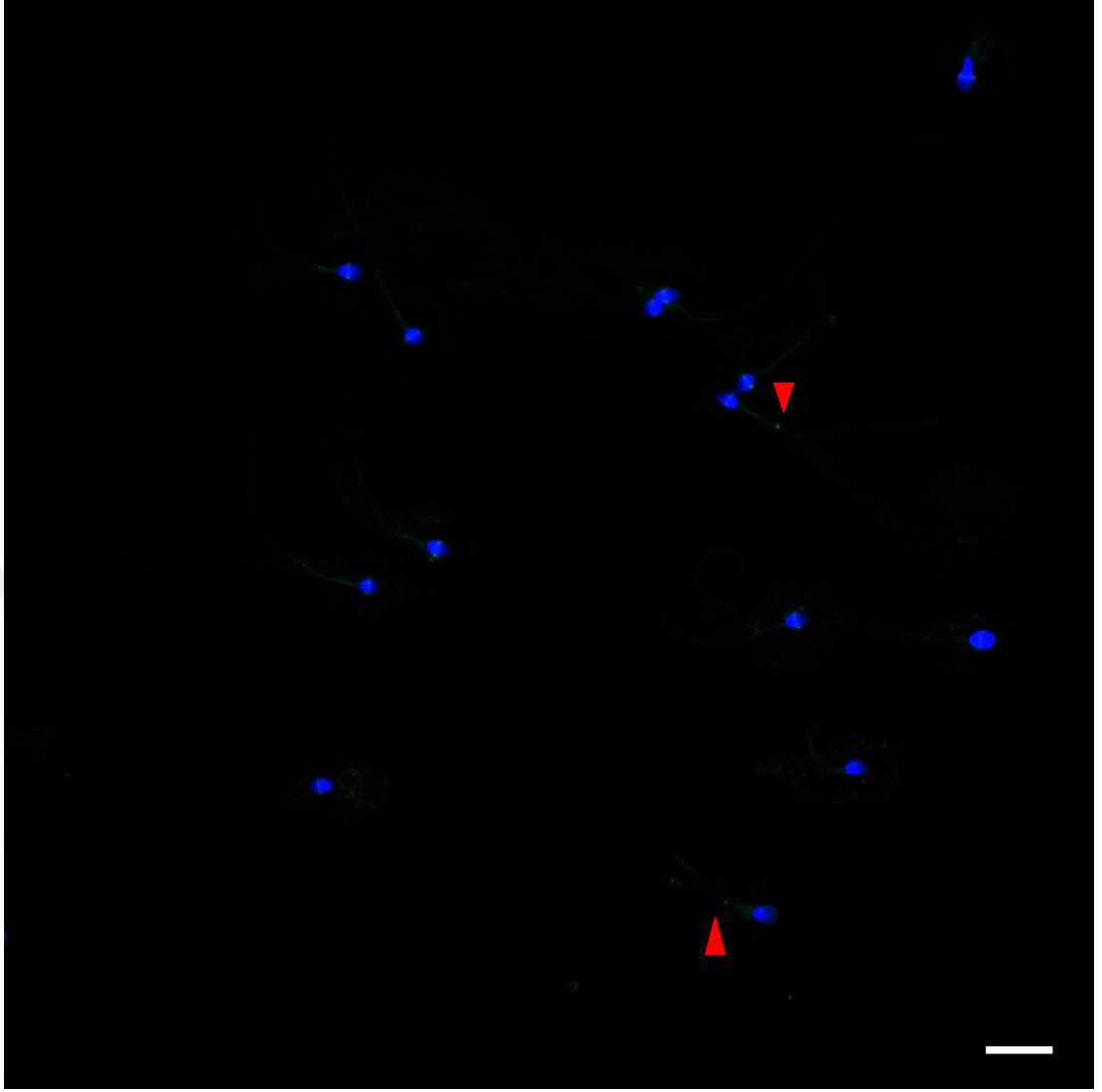


Şekil 6.3.1 Normozoospermi grupta Sox5 protein ekspresyonu *Barlar= 50 µm.(X40)*



**Şekil 6.3.2.** OAT grupta Sox5 protein ekspresyonu. Barlar= 50  $\mu$ m. (X40)

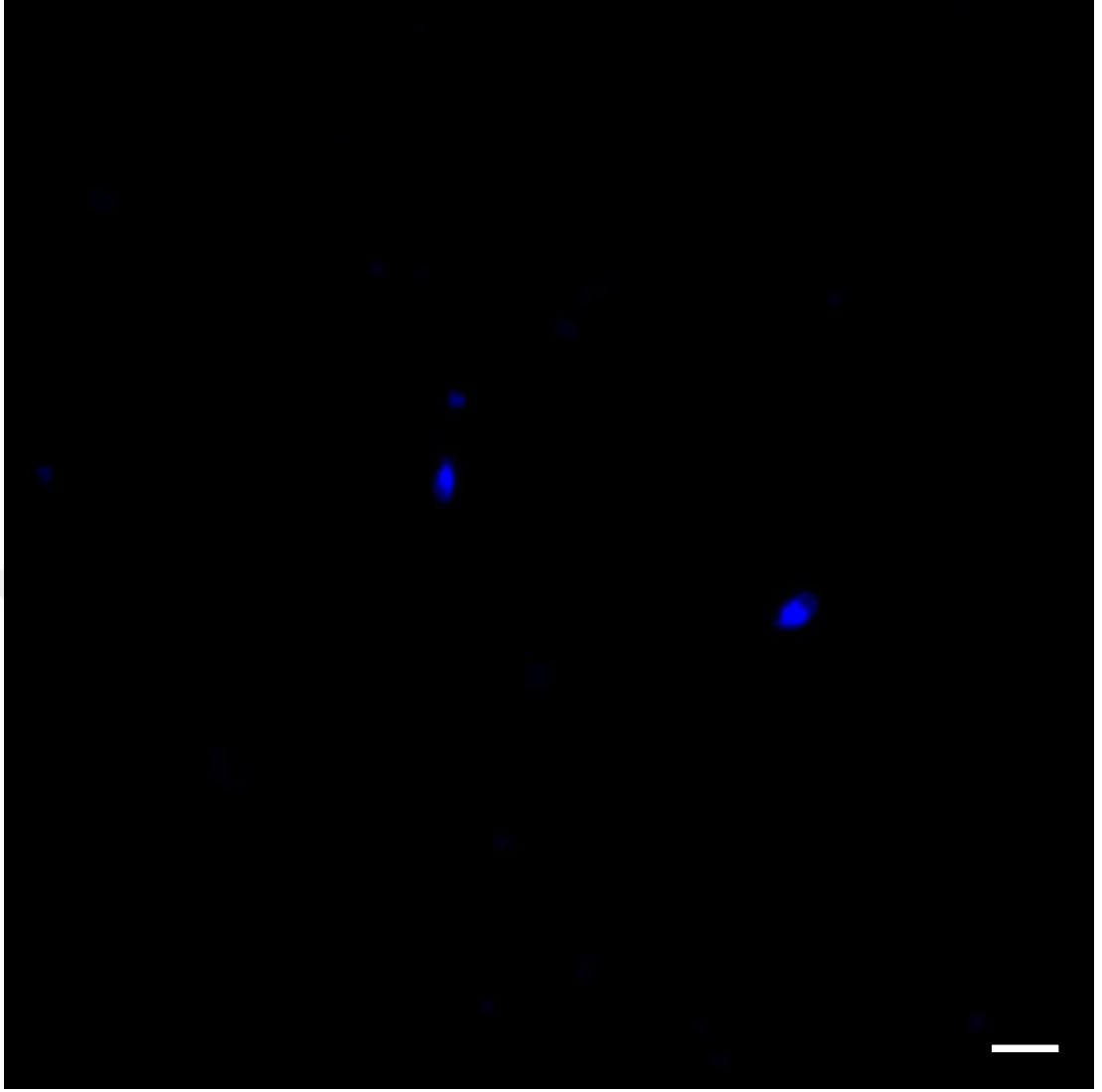
Normozoospermi ve OAT grupların Catsper-1 ekspresyon karşılaştırılması immunfloresan boyama ile karşılaştırıldığında, Catsper-1 Normozoospermi grubunda nokta şeklinde belirgin olarak kuyruk ana parçada görülürken (Şekil 6.3.3) OAT grubunda görülmedi. (Şekil 6.3.4.)



**Şekil 6.3.3. Normozoospermi grupta Catsper-1'in protein ekspresyonu.**

*Normozoospermi grubundan elde edilen örneklerde iyon kanalı protein olan Catsper-1 noktasal boyanma şeklinde spermelerin kuyruğunda genel olarak esas parçada izlendi (okbaşları). Barlar=25  $\mu$ m. (X40)*

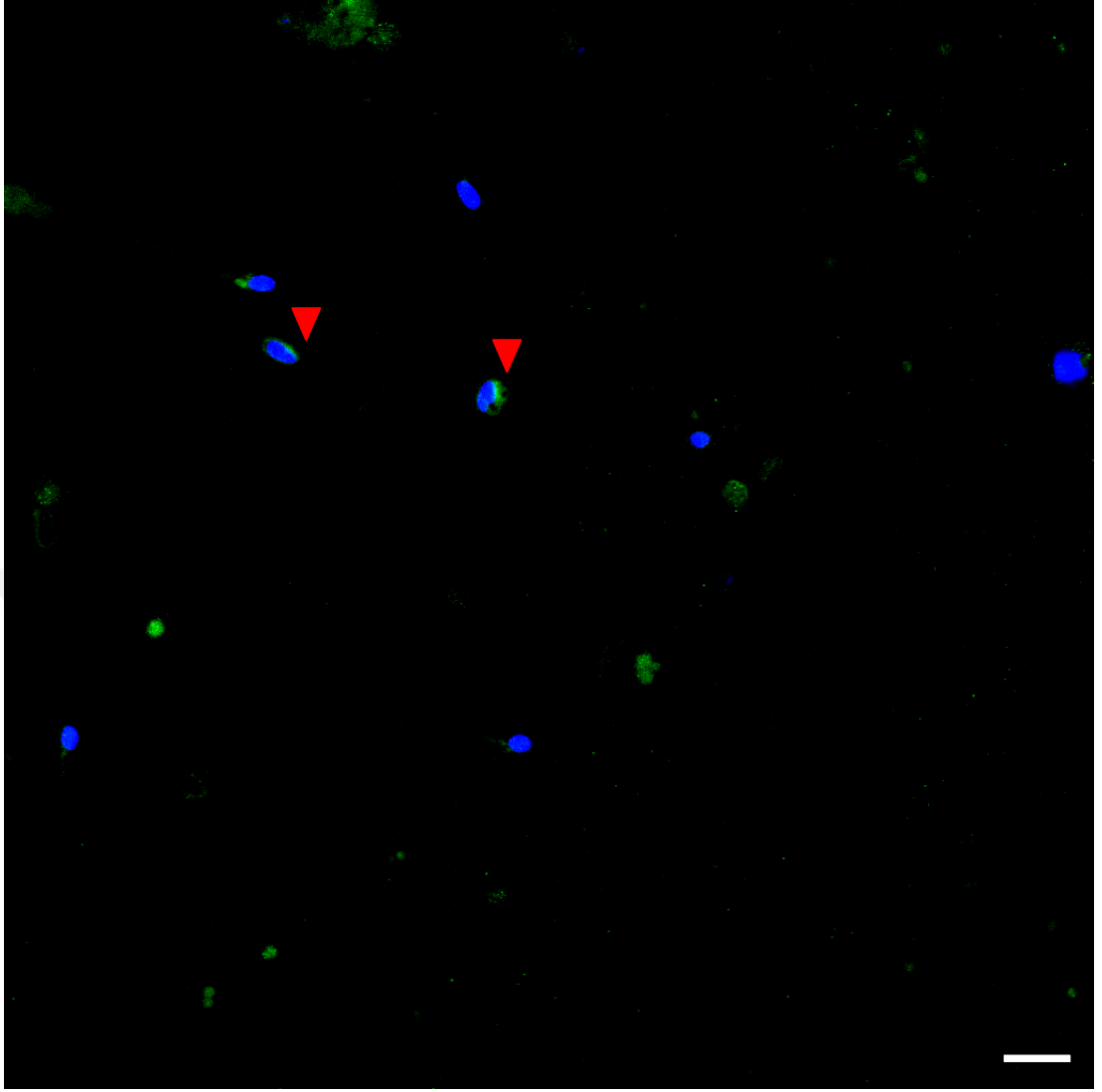




**Şekil 6.3.4. OAT grupta Catsper-1'in protein ekspresyonu.**

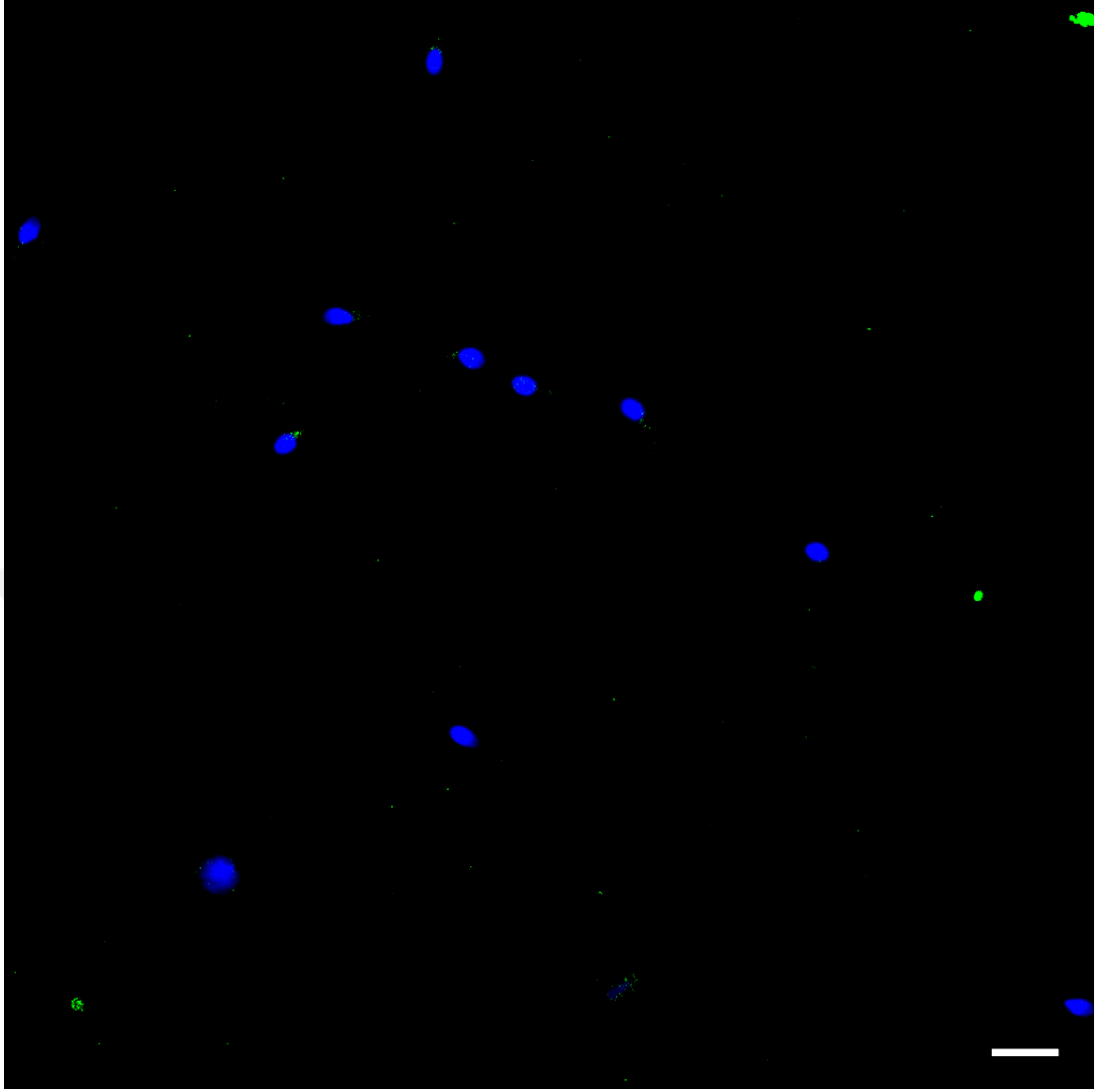
*OAT örneklerde bu kanal belirgin izlenmedi, Barlar=25 µm.(X40)*

Gruplarda Fertilin (ADAM2) protein ekspresyonu karşılaştırıldığında, Normozoospermi örneklerde sperm başının akrozomun anterior kısmında bir boyanma görülürken (Şekil 6.3.5) genel boyanmaya bakıldığında bu boyanma görülmedi. (Şekil 6.3.6).



**Şekil 6.3.5. Normozoospermi grupta Fertilin protein ekspresyonu**

*Normozoospermi örneklerde bazı spermatozoada boyanma izlendi (okbaşları). Farklı yöntemlerle ve immünoflüoresanla aynı sonuçların elde edilmesi nedeniyle fertilin ifadesinin RT-PCR ile değerlendirilmesi gerekli oldu. Barlar=25 µm.(X40)*

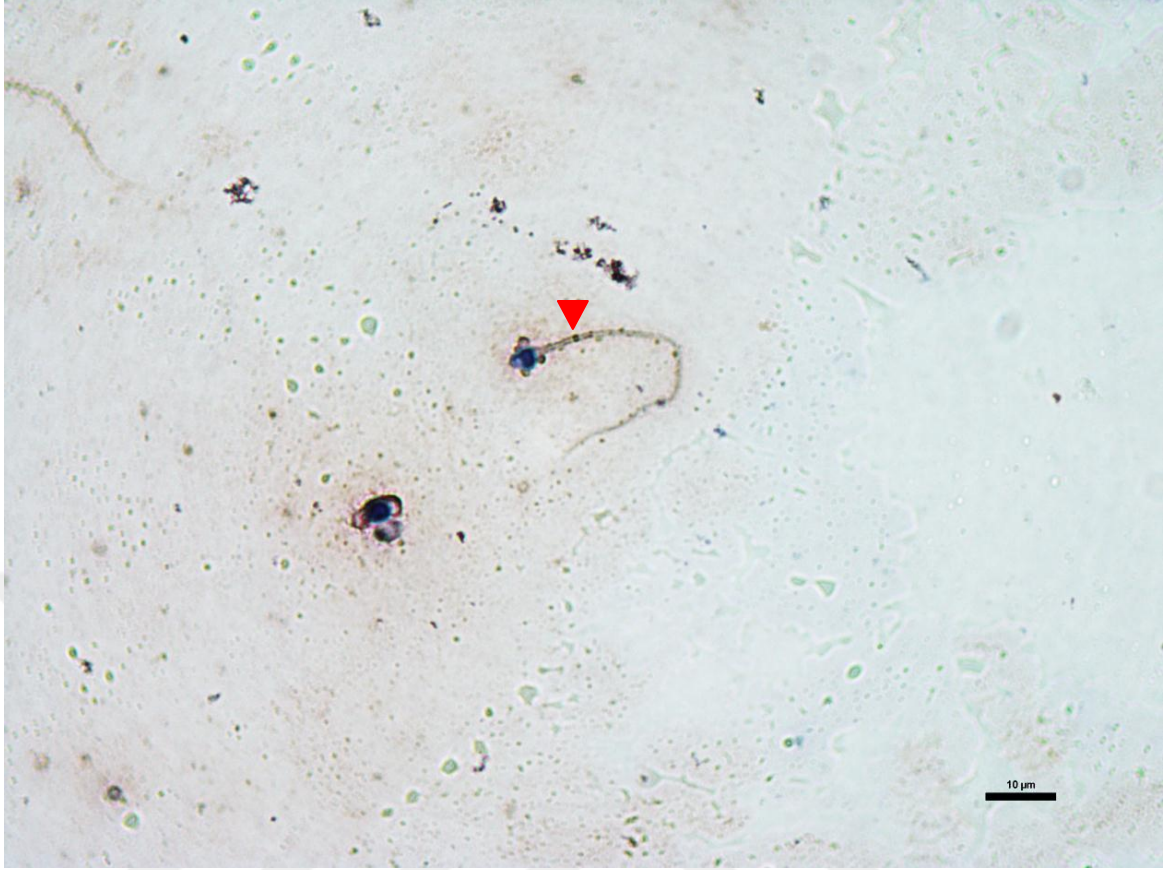


Şekil 6.3.6. OAT grupta Fertilinin protein ekspresyonu. *Barlar=25 µm.(X40)*

#### 6.4.İmmunohistokimya Bulguları

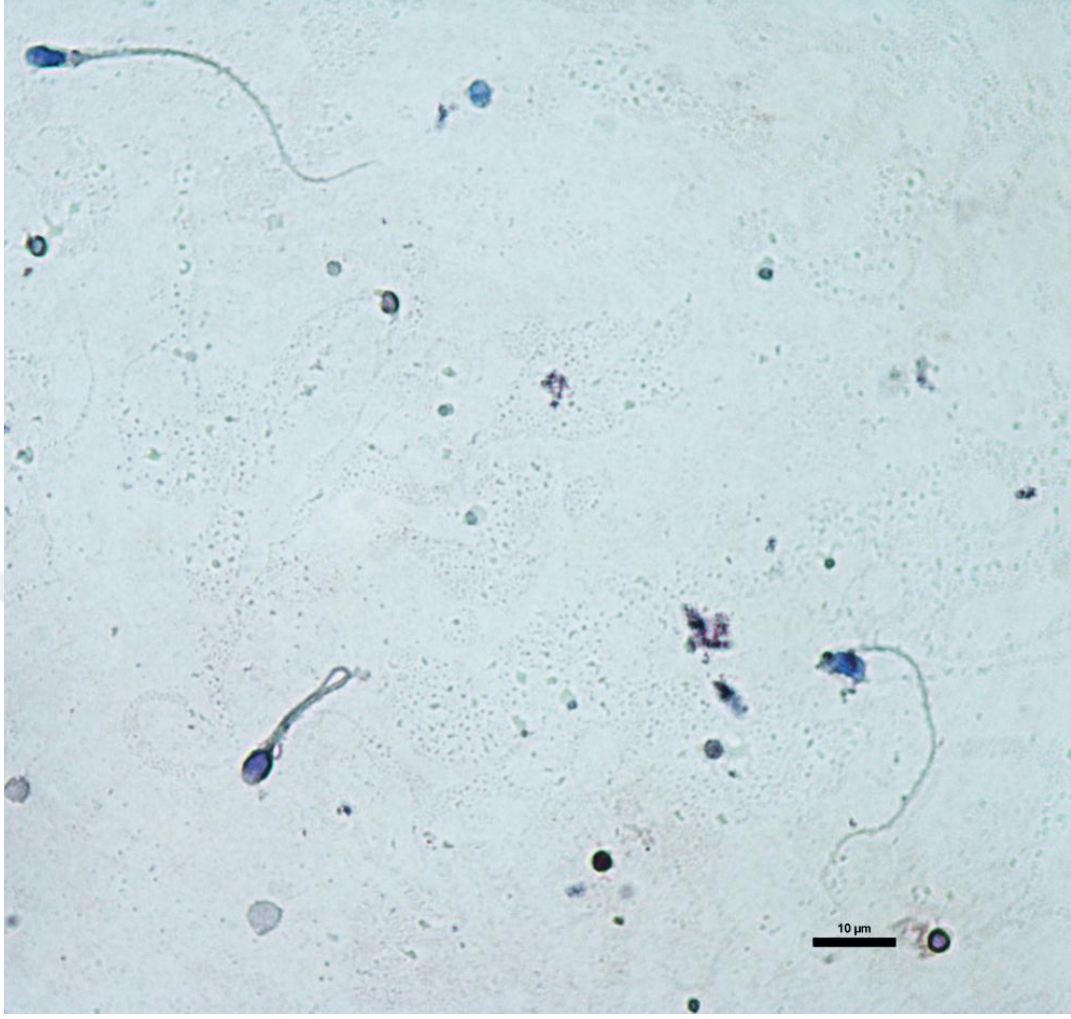
Yapılan deneyler sonucunda Normozoospermi ve OAT grupları arasındaki Catsper1 ve Fertilin (ADAM2) proteinleri ekspresyon ve tayini değerlendirilmiştir.

Catsper1 Normozoospermi grubunda, spermde kuyruğun ana parçasında noktasal bir lokalizasyon gösterirken (Şekil 6.4.1) morfolojik olarak herhangi değişikliğe rastlanmamıştır. OAT grubunda bu boyanma belirgin olarak görülmemiştir (Şekil 6.4.2).



**Şekil 6.4.1 Normozoospermi grupta Catsper-1 protein ekspresyonu**

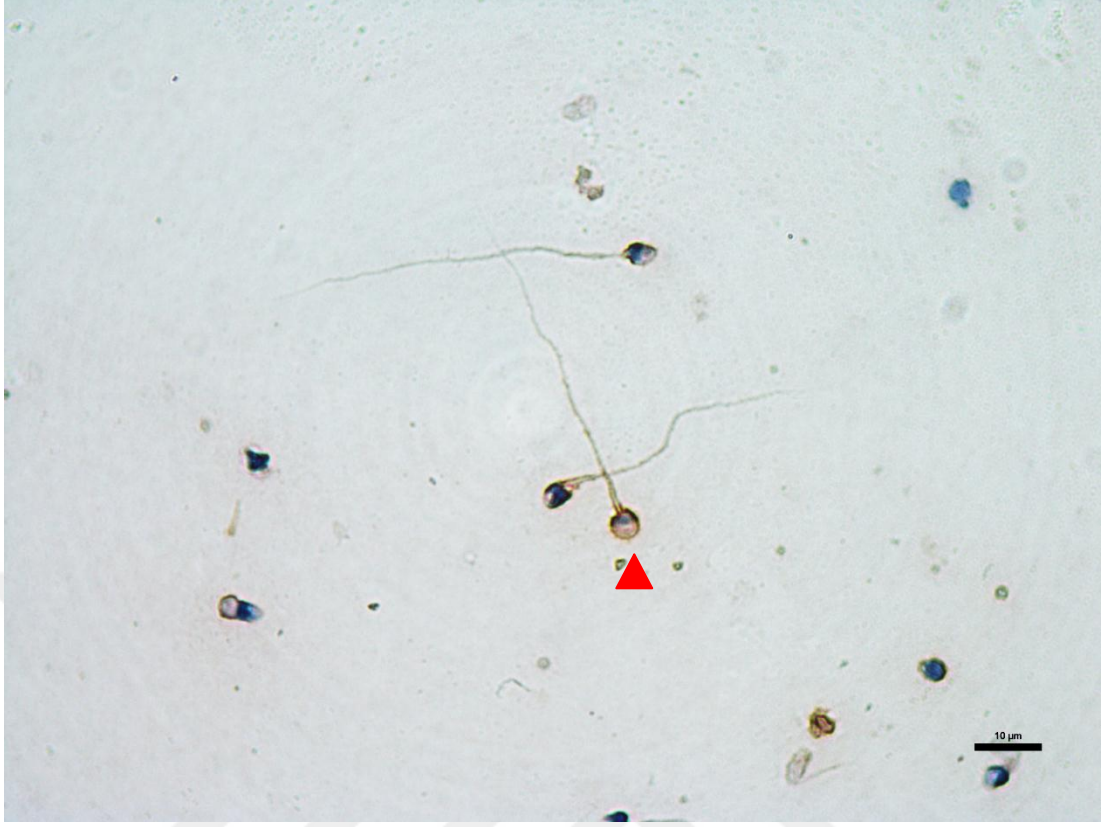
*Normozoospermi grubundan elde edilen örneklerde immünohistokimya yöntemi ile yapılan boyamalarda iyon kanalı protein olan Catsper-1 noktasal boyanma şeklinde spermelerin kuyruğunda özellikle esas parçada izlendi (okbaşı).Barlar=10 µm.(X100)*



**Şekil 6.4.2.OAT grupta Catsper-1 protein ekspresyonu**

*OAT grubunda bu kanal gözlenmedi. Barlar=10 µm.(X100)*

Fertilin proteinin sperm başında akrozomun anterior kısmında, nukleusun ön tarafında lokalizasyon göstermesi beklenirken özgün bir immünohistokimya boyaması göstermemiştir (Şekil 6.4.3.). İmmünofloresanla yapılan boyamada da aynı sonuçlara rastlandığından dolayı Fertilin için sonuçların RT-PCR ile değerlendirilmesi uygun bulundu.

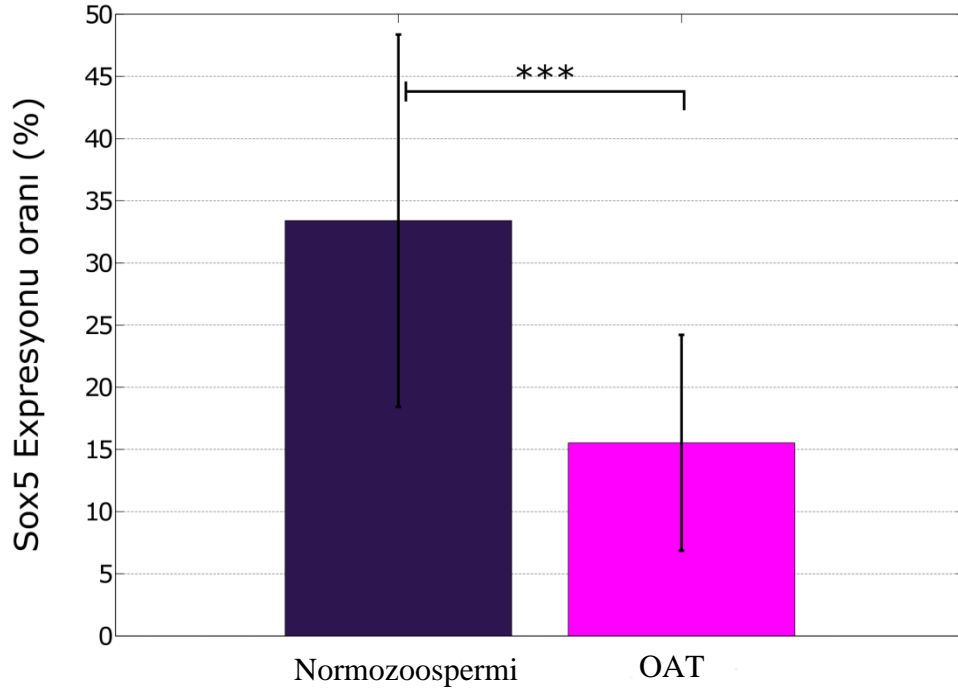


**Şekil 6.4.3.Fertilinin immünohistokimya boyamaları.**

*Spermatozoonun başında, akrozomal bölgenin ön tarafında boyanması beklenen fertilinin immünohistokimya boyamaları bu belirteçe özgün olarak bulunmadı. Farklı yöntemlerle ve immünoflüoresanla aynı sonuçların elde edilmesi nedeniyle fertilin ifadesinin RT-PCR ile değerlendirilmesi gerekli oldu. Barlar=10 µm.(X100)*

### 6.5.Sox5 Ekspresyonu İstatiksel Değerlendirilmesi

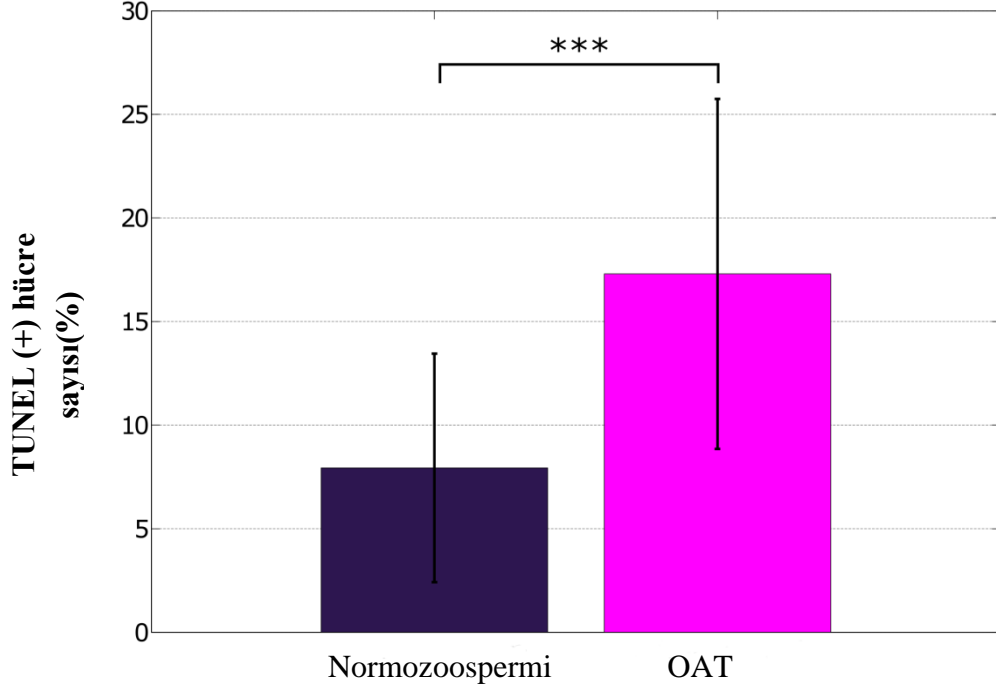
Normozoospermi ve OAT grupların Sox5 ekspresyonu karşılaştırıldığında Normozoospermi gruptaki pozitif hücre sayısı OAT grubuna kıyasla belirgin ( $p<0.001$ ) bir artış göstermektedir (Şekil6.5.1).



Şekil 6.5.1 Normozoospermi ve OAT hasta grupları arasında Sox5 Ekspresyon oranları

## 6.6.DNA Fragmantasyon İndeksi

Normozoospermi ve OAT grupların apoptoz bulguları karşılaştırıldığında OAT grubundaki TUNEL (+) sperm hücre sayısında anlamlı ( $p < 0.001$ ) bir artış gözlenmiştir.(Şekil 6.6.1)

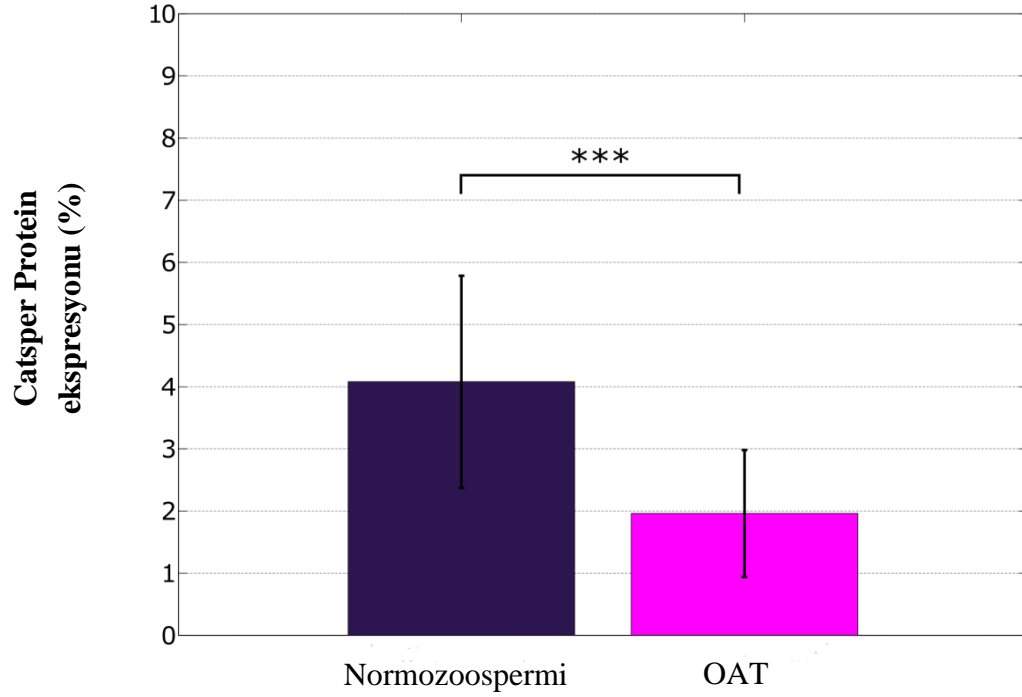


Şekil 6.6.1 Normozoospermi ve OAT hasta grupları arasında TUNEL Ekspresyon oranları



### 6.7. Catsper Protein Ekspresyon İstatiksel Değerlendirmesi

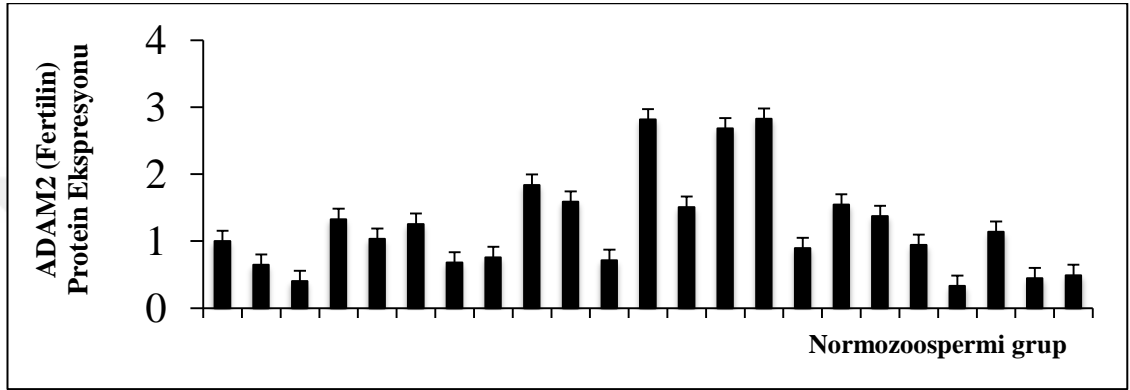
Normozoospermi ve OAT grupları arasında Catsper protein oranları karşılaştırıldığında normozoospermi grubuna oranla OAT grubunda anlamlı ( $p<0.001$ ) bir azalma görülmüştür.(Şekil 6.7.1)



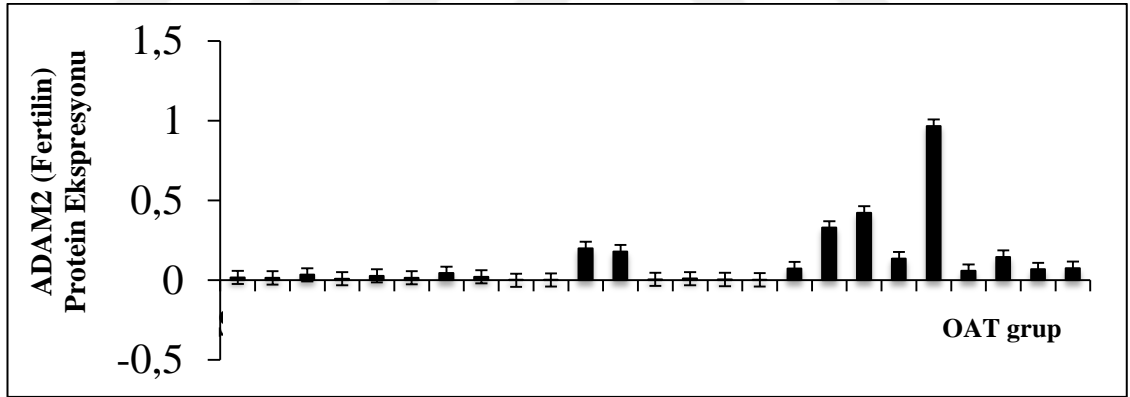
Şekil 6.7.1 Normozoospermi ve OAT hasta grupları arasında Catsper Ekspresyon oranları

## 6.8. PCR Bulguları

Normozoospermi ve OAT grupları karşılaştırıldığında Normozoospermi grupta hastadan hastaya bir değişme görülsede de (Şekil 6.8.1) OAT grubundaki Adam2 protein ekspresyonunda anlamlı ( $p < 0.001$ ) bir düşüş belirlenmiştir.(Şekil 6.8.2)



Şekil 6.8.1 Normozoospermi grupta Adam2(Fertilin) Protein Ekspresyon Oranları



## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biz yaptığımız bu çalışma ile erkek fertilitesinde önemli olduğunu düşündüğümüz ADAM 2, CatSper ve Sox 5 ekspresyonlarının normozoospermi ve oligoastenoteratozoospermik grubu örneklerinde ekspresyonlarını araştırdık.

Memeli fertilizasyonunda, sperm ilk olarak oositin zona pellusidasına yapışır, daha sonra oositin plazma membranına tutunarak, sperm yumurta füzyonunu gerçekleştirir. Birçok sperm proteini sperm-yumurta adezyonu ve füzyonunda önemli rol oynar[57, 58]. Bunların bir bölümü ADAM ailesine (Disintegrin ve Metalloproteaz) aittir. ADAM'ın tipik baskın yapısı, metalloproteaz, disintegrin, cysteine, epidermal büyüme faktörü benzeri(EGF) transmembran ve sitoplazmik kuyruk bölümlerini içerir. ADAM disintegrin domaini integrin aracılı hücre adezyonunu destekleyebilir. ADAM' da metalloproteaz domaini hakkında daha çok şey bilinmesine rağmen, disintegrin domaini hakkında daha az şey bilinmektedir[59-61]). Biz de laboratuvarımızda insan ADAM 2'nin disintegrin domaini üzerinde yoğunlaştık. Fertilin (fertilin a,ADAM1 ve fertilin b, ADAM2) ve cyritestin (ADAM3) fertilizasyon sürecinde araştırma altında olan moleküllerdir[62-65]. ADAM, spermatozoa yüzey proteindir, özellikle baş bölgesinde yerleşim gösterir[2, 66]. Yapılan çalışmalarda yapısı bozulmuş fertilin  $\beta$  geni için yumurta aktivasyonu normal olarak gerçekleşmesine rağmen yumurta plazma membranına bağlanma yeteneği önemli ölçüde azalmıştır.[67] Fertilizasyon öncesi fertilin  $\beta$  'nın inkübe edilmesi IVF sırasında sperm-yumurta bağlanmasını inhibe eder.[68] Yine fertilizasyon öncesi fertilin  $\beta$  domainin disintegrine karşı inkübasyonu sperm-yumurta bağlanma ve füzyonunu inhibe eder.[3] Fertilin  $\beta$  eksikliği olan farelerde %87 oolemma-bağlanma yeteneğinde azalma olurken %50 sperm-yumurta füzyonunda azalma görülmüştür. [69]Cyritestin-null spermde, oolemma-bağlanma yeteneğinde büyük azalma görülürken, normal bir sperm-yumurta füzyon oranı vardır. Fertilin  $\beta$  eksikliği olan spermde Fertilin  $\alpha$  yoktu, fertilin  $\alpha$  eksikliği saptanan deneylerde sperm-oosit füzyonu gerçekleşmiştir.[66]Cyritestin eksikliği olan spermde Fertilin  $\alpha$  yoktu ve wild-type fare spermiyle karşılaştırıldığında %50 oranında Fertilin  $\beta$  ekspresyonunda azalma olduğu gösterildi.[62] Oosit plazma membranında integrine füzyonda yardımcı olan CD9-null (CD9-/-) dişi farede,

sperm-oosit füzyon aşamasındaki füzyon yüzdesinin azalmasından dolayı fertiline büyük ölçüde azaldığı belirlenmiştir.[70, 71]

Fertilin gen proteini çıkarılması ile sperm morfolojisi, sayısı ve hem epididimal hem de ejakülattaki motilitenin etkilenmediği, kapasitasyonun normal gerçekleşmesi gereken zamanda ve ardından akrozom reaksiyonu meydana geldiği bildirilmiştir. [72, 73]Fertilin geni çıkartılmış bir farede (Fertilin-/-) erkek farelerin fertilitésinin önemli ölçüde azaldığı fakat yaşamsal fonksiyonları bakımından sağlıklı olduğu gösterilmiştir.[74, 75]

Bizde çalışmamızda ADAM 2 ekspresyonlarını birçok yöntemle kıyasladık ve özellikle OAT grubunda bir düşüş olduğunu gözlemledik.

Hiperaktif sperm hareketini sağlayan bir voltaj kapılı kalsiyum kanalı olarak işlev gören Catsper 1, sperme özgü CatSper gen ailesinin 4 üyesinden biridir ve normal sperm hareketi için gerekli olan cAMP aracılı kalsiyum iyon akımını kontrol eder. Bu molekül spermin hareketi, oosite adezyonu gibi önemli fonksiyonlardan sorumlu olduğu için, erkek fertilitésinde önemli bir rol oynamaktadır[76-78]. Yine deneysel olarak CatSper gen ailesinin baskılanması ile oluşturulan transgenik farelerin infertil olduklarının anlaşılması ile hız kazanan araştırmalar, bu genlerin ve kodladıkları proteinlerin sperm aktivitesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir [77]. Protein işlevselliğini bozan CatSper 1 gen mutasyonları sonucu ortaya çıkan anormal protein, spermin hareket yeteneğini yok ederek yumurtanın döllenesine engel olmaktadır [79].

İnsanlarda Catsper kanal mutasyonları infertilite ile ilişkilendirilmiştir. [38]Catsperδ olmayan farelerin infertil olduğu spermdeki Catsper1 miktarının Catsperδ için gerekli olduğu gösterilmiştir.[80] Catsper 1-4 alt birimlerindeki gen bozulması Catsper kaybına bu da Catsper akım kaybına ve infertiliteye sebep olmaktadır. [81] Catsper hücre içi Ca<sup>+2</sup>konsantrasyon artışı hiperaktif motiliteye yol açmaktadır. Altbirimlerinden birinin nakavt edildiği çalışmalarda Ca<sup>+</sup> eksikliğinden dolayı hiperaktivasyon motilite kaybı olduğu gösterilmiştir.[82]

Catsper1 yoksun farelerde spermde düşük eğrilik, küçük genlik vardır. Asimetrik ve titreşimli dalgalanma sperm kapasitasyonu ve fertilizasyon için gerekli olduğundan hiperaktive eksikliği kaynaklı infertilizasyona yol açmıştır.[15, 83]Süperovulasyona tabi tutulan dişi farede IVF yapılmış ve Catsper-/- tipte % 0 fertilizasyon

görülmüştür.[4] Bu spermde yumurtaya yapışır fakat hiperaktive motilite eksikliği nedeniyle oosite penetre olmazlar. Fertilizasyon sırasında sperm-oosit plazma membranı ile kaynaşmak için kumulus ooforus ve zona pellusida ya nüfuz eder. Yapılan deneyde zona pellusidası enzimatik olarak çıkarılan yumurta hücrelerinde 24 saat sonrası penetrasyon ve dölleme meydana gelmiştir.[18] Sperm-yumurta kaynaşması ve aktivasyonu için değil Catsper penetrasyonu için gerekli bulunmuştur.[84]

İnfertil hastalarda Catsper1-Catsper2 mutasyonları astenoteratozoospermi ile korelasyonlu bulunmuştur. Catsper-/- farede spermatogenez kusuru bulunmamış sperm anormalliği de göstermemiştir.[30] Seçilen Catsper blokerleri (HC-056456 gibi), aşırı aktivasyonlu motiliteyi Catsper-null sperme benzer sonuçlar verir, kanal aktivitesini seçici olarak hedefler ve kontraseptif sınıf geliştirir. Anti Catsper1 immunoglobulinG hareketli hücre yüzdesini ve dölleme oranını düşürmektedir. Catsper-/- sperm yumurtayı dölleyemez.[21]

Çalışmalar Catsper1'in histidine zengin alanın pH probu işlevi gösterdiğini ve hücre içi alkalizasyonun Catsper'ı aktive ettiğini göstermiştir. Nakavt çalışmaları iki sperm spesifik iyon kanalı Catsper ve Ksper'nin infertiliteye neden olduğunu ancak normal sperm üretiminin etkilenmediğini ortaya koymuştur.[85]Catsper1 gen bozulması homozigot cinsiyette erkek yavrulara neden olur bu da anormal sperm hareketliliği sonucu gebelik oluşturmaz.[17, 86]

Biz de çalışmamızda normozoospermi grup ile OAT grubun boyanma oranlarını karşılaştırdık ve OAT grubun sperm boyamalarında CatSper ekspresyon oranının daha düşük olduğunu gözlemledik.

Son yıllarda, erkek infertilitesinde sperm DNA bütünlüğünün rolünü araştıran çalışmalar artış göstermiştir. Bu çalışmalarda erkek infertilitesinin teşhisinde sperm DNA bütünlüğünün rutin semen analizine göre daha iyi bir belirteç olabileceği görüşü öne sürülmüştür. Sperm DNA hasarının infertil erkeklerde fertil erkeklerle oranla daha fazla görüldüğü ve sperm DNA hasarının bu hastalarda fertilitite potansiyelini negatif olarak etkilediği savunulmuştur[87-89].Sperm DNA bütünlüğünü değerlendiren testler arasında TUNEL (*The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine (TdT) Triphosphatre (dUTP) Nick End Labelling Assay*) direkt olarak DNA kırıklarını ölçmektedir[90]. Sperm DNA

bütünlüğü sadece genetik materyalin gelecek nesillere başarılı olarak aktarılmasında değil, fertilizasyonun düzgün bir şekilde gerçekleşmesi, kaliteli embriyo gelişimi ve gebeliğin sağlanması açısından da önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda anormal rekombinasyon, kusurlu kromatin, apoptoz, oksidatif stres DNA kırılma etyolojisi arasında geçmektedir.[91] DNA fragmantasyon oranları başarılı döllenme ve IVF şansını azaltan bir etmendir bu da infertilite tanısı konmuş kişilerde bakılması ihtimalini güçlendirmektedir.[92-94]

Biz de çalışmamızda normozoospermi grubunun TUNEL(+) boyama sonuçlarını, infertil dediğimiz OAT grup sperm boyama sonuçları ile karşılaştırdık ve OAT grubunda TUNEL pozitif hücre sayısında bir artış gözlemledik.

Özellikle erkek gonadlardan Sox ailesine ait birçok transkripsiyonel faktörün eksprese olduğu bilinmektedir[95]. Seks belirleyici Y kromozomu ile ilişkili cDNA izole edilmiş murine testisinde Sox ailesinden transkripsiyonel faktörler izole edilmiştir[96]). Post-mayotik yuvarlak (*Round*) sperm hücrelerinde Sox ekspresyonları görülmektedir[42]. Erişkin fare testislerinde, Sox5'in yüksek ekspresyonu ile ilişkili memeli sperm ilişkili antijen 6 gen (*mammalian sperm-associated antigen 6 gene(Spag6)*) artışı görülmüştür[97].Catsper 1'in bu transkripsiyonel faktörler ile düzenlenmesi de ilginç bir sonuçtur.

Yapılan çalışmalarda S-Sox5 lokusunun erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu ve testisteki yüksek ekspresyon seviyesinin S-Sox5 'in sperm fonksiyonu ve erkek üremesi için gerekli genlerin düzenlenmesinde rol oynadığını ortaya koymaktadır.[45] S-Sox5 Spag16L promotorunda Sox5 bağlanma yeri ile etkileşerek Spag16L'nin transkripsiyonunu aktive eder. Veriler silia/flagella oluşumunda düzenleyici rol oynadığını göstermiştir. Sperm/flagella yapı ve fonksiyonu için gerekli genlerin promotör bölgelerindeki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri analiz edildiğinde silia/flagella genlerin kontrolü olarak Sox5 tespit edilmiştir.[98] Sox5 ve Sox9, Catsper1 promotörünün transaktivasyonunda artışa neden olduğu ve Catsper1 promotoruyla etkileşime girdiği bildirilmiştir.[44, 47]

Biz de çalışmamızda normozoospermik hastaların Sox boyanma oranlarını, OAT grubuna oranla daha yüksek olarak gözlemledik. Bu da bizim fertil hastalarda Sox oranlarının daha yüksek olduğunu düşündürdü.

Erkek infertilitesinde rol oynadığı düşünölen bu moleköller ile yapılacak daha detaylı çalışmalar, tanı koymada ve Catsper, fertilin (Adam 2), Sox 5 proteinlerine karşı antikörler oluşturularak bu proteinlere bağlanmaları ve dolayısı ile proteinlerin aktivitesini inhibe etmeleri sonucunda erkek doğum kontrolünde rol oynayabilecek moleköler bir mekanizma alt yapısı olabilir.



## 8. KAYNAKLAR

1. Liu, J., et al., Low levels of PRSS37 protein in sperm are associated with many cases of unexplained male infertility. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2016. **48**(11): p. 1058-1065.
2. Cho, C., et al., Analysis of mouse fertilin in wild-type and fertilin  $\beta^{-/-}$  sperm: Evidence for C-terminal modification,  $\alpha/\beta$  dimerization, and lack of essential role of fertilin  $\alpha$  in sperm-egg fusion. *Developmental biology*, 2000. **222**(2): p. 289-295.
3. Blobel, C.P., Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Reviews of Reproduction*, 2000. **5**(2): p. 75-83.
4. Singh, A.P. and S. Rajender, CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online*, 2015. **30**(1): p. 28-38.
5. Bhilawadikar, R., et al., Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate. *J Assist Reprod Genet*, 2013. **30**(4): p. 513-23.
6. Daigle, M., P. Roumaud, and L.J. Martin, Expressions of Sox9, Sox5, and Sox13 transcription factors in mice testis during postnatal development. *Molecular and cellular biochemistry*, 2015. **407**(1-2): p. 209-221.
7. Mata-Rocha, M., et al., The transcription factors Sox5 and Sox9 regulate Catsper1 gene expression. *FEBS letters*, 2014. **588**(18): p. 3352-3360.
8. Jungwirth, A., et al., European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*, 2012. **62**(2): p. 324-332.
9. Aitken, R.J., M.A. Baker, and D. Sawyer, Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive biomedicine online*, 2003. **7**(1): p. 65-70.
10. Pierik, F.H., et al., The advantages of standardized evaluation of male infertility. *International journal of andrology*, 2000. **23**(6): p. 340-346.
11. Eşrefoğlu, M., Özel Histoloji. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. Malatya, 2009.
12. Kierszenbaum, A., Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Çev. Ed: Prof. Dr. Ramazan Demir. Mosby Inc., 618s, 2006.
13. Reece, J.B., et al., Campbell biology. 2014: Pearson Boston.
14. Ren, D. and J. Xia, Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology*, 2010. **25**(3): p. 165-175.
15. Carlson, A.E., et al., CatSper1 required for evoked  $Ca^{2+}$  entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 14864-8.



16. Darszon, A., et al., Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*, 2011. **91**(4): p. 1305-55.
17. Lishko, P.V. and Y. Kirichok, The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol*, 2010. **588**(Pt 23): p. 4667-72.
18. Mata-Rocha, M., et al., Molecular cloning and analysis of the Catsper1 gene promoter. *Mol Hum Reprod*, 2013. **19**(5): p. 336-47.
19. Jin, J., et al., Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biology of reproduction*, 2007. **77**(1): p. 37-44.
20. Chung, J.-J., et al., A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nature Communications*, 2011. **2**(1): p. 153.
21. Brenker, C., et al., The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J*, 2012. **31**(7): p. 1654-65.
22. Correia, J., F. Michelangeli, and S. Publicover, Regulation and roles of Ca<sup>2+</sup> stores in human sperm. *Reproduction*, 2015. **150**(2): p. R65-76.
23. Smith, J.F., et al., Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca<sup>2+</sup> channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(17): p. 6823-6828.
24. Baldi, E., et al., A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Molecular and cellular endocrinology*, 2000. **161**(1): p. 31-35.
25. He, Y., et al., Ketamine inhibits human sperm function by Ca<sup>(2+)</sup>-related mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **478**(1): p. 501-6.
26. Li, H.G., et al., The expression and significance of CATSPER1 in human testis and ejaculated spermatozoa. *Asian journal of andrology*, 2006. **8**(3): p. 301-306.
27. Miller, M.R., et al., Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science*, 2016. **352**(6285): p. 555-559.
28. Strünker, T., et al., The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>sup</sup> 2+<sup>^</sup> influx in human sperm. *Nature*, 2011. **471**(7338): p. 382.
29. Florman, H.M., M.K. Jungnickel, and K.A. Sutton, Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*, 2004. **52**(5-6): p. 503-510.
30. Sumigama, S., et al., Progesterone Accelerates the Completion of Sperm Capacitation and Activates CatSper Channel in Spermatozoa from the Rhesus Macaque. *Biol Reprod*, 2015. **93**(6): p. 130.

31. Kirichok, Y. and P.V. Lishko, Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2011. **17**(8): p. 478-499.
32. Navarro, B., Y. Kirichok, and D.E. Clapham, KSper, a pH-sensitive K<sup>+</sup> current that controls sperm membrane potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(18): p. 7688-7692.
33. Santi, C.M., et al., The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS letters*, 2010. **584**(5): p. 1041-1046.
34. Schreiber, M., et al., Slo3, a novel pH-sensitive K<sup>+</sup> channel from mammalian spermatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(6): p. 3509-3516.
35. Daigle, M., P. Roumaud, and L.J. Martin, Expressions of Sox9, Sox5, and Sox13 transcription factors in mice testis during postnatal development. *Mol Cell Biochem*, 2015. **407**(1-2): p. 209-21.
36. Lishko, P.V., I.L. Botchkina, and Y. Kirichok, Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, 2011. **471**(7338): p. 387-91.
37. Tamburrino, L., et al., Quantification of CatSper1 expression in human spermatozoa and relation to functional parameters. *Hum Reprod*, 2015. **30**(7): p. 1532-44.
38. Avenarius, M.R., et al., Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet*, 2009. **84**(4): p. 505-10.
39. Avidan, N., et al., CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *European journal of human genetics: EJHG*, 2003. **11**(7): p. 497.
40. Zheng, L.P., et al., Sperm-specific ion channels: targets holding the most potential for male contraceptives in development. *Contraception*, 2013. **88**(4): p. 485-91.
41. Hildebrand, M.S., et al., Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *European Journal of Human Genetics*, 2010. **18**(11): p. 1178.
42. Denny, P., et al., An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *The EMBO journal*, 1992. **11**(10): p. 3705.
43. Hu, X., et al., The function of sperm-associated antigen 6 in neuronal proliferation and differentiation. *Journal of molecular histology*, 2016. **47**(6): p. 531-540.
44. Mata-Rocha, M., et al., The transcription factors Sox5 and Sox9 regulate Catsper1 gene expression. *FEBS Lett*, 2014. **588**(18): p. 3352-60.
45. Kiselak, E.A., et al., Transcriptional regulation of an axonemal central apparatus gene, sperm-associated antigen 6, by a SRY-related high mobility group transcription factor, S-SOX5. *J Biol Chem*, 2010. **285**(40): p. 30496-505.


46. Mertin, S., S.G. McDowall, and V.R. Harley, The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic acids research*, 1999. **27**(5): p. 1359-1364.
47. Zou, S., et al., Expression of transcription factor SOX5 in human semen. *Zhonghua yi xue za zhi*, 2016. **96**(36): p. 2876-2879.
48. Lefebvre, V., et al., Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007. **39**(12): p. 2195-2214.
49. Serrano, C.J., et al., Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS letters*, 1999. **462**(1-2): p. 171-176.
50. Mata-Rocha, M., et al., Molecular cloning and analysis of the Catsper1 gene promoter. *Molecular human reproduction*, 2013. **19**(5): p. 336-347.
51. Primakoff, P., H. Hyatt, and J. Tredick-Kline, Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *The Journal of cell biology*, 1987. **104**(1): p. 141-149.
52. Kim, E., et al., Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(9): p. 5634-5639.
53. Vidaeus, C.M., et al., Human fertilin  $\beta$ : Identification, characterization, and chromosomal mapping of an ADAM gene family member. *Molecular reproduction and development*, 1997. **46**(3): p. 363-369.
54. Kaji, K. and A. Kudo, The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction*, 2004. **127**(4): p. 423-9.
55. Evans, J.P., Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci*, 1999. **4**(1): p. 114-131.
56. Cuasnicú, P.S., et al., Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Archives of medical research*, 2001. **32**(6): p. 614-618.
57. Bleil, J.D. and P.M. Wassarman, Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 1980. **20**(3): p. 873-882.
58. Wassarman, P.M., Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*, 1999. **96**(2): p. 175-183.
59. Black, R.A. and J.M. White, ADAMs: focus on the protease domain. *Current opinion in cell biology*, 1998. **10**(5): p. 654-659.


60. Primakoff, P. and D.G. Myles, The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends in Genetics*, 2000. **16**(2): p. 83-87.
61. Moss, M.L., et al., TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug discovery today*, 2001. **6**(8): p. 417-426.
62. Myles, D.G., et al., Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. **91**(10): p. 4195-4198.
63. Almeida, E.A., et al., Mouse egg integrin  $\alpha 6\beta 1$  functions as a sperm receptor. *Cell*, 1995. **81**(7): p. 1095-1104.
64. Linder, B. and U.A. Heinlein, Decreased in vitro fertilization efficiencies in the presence of specific cyritestin peptides. *Development, growth & differentiation*, 1997. **39**(2): p. 243-247.
65. Shetty, J., et al., Human sperm proteome: immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biology of reproduction*, 1999. **61**(1): p. 61-69.
66. Nishimura, H., et al., Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin  $\beta$ . *Developmental biology*, 2001. **233**(1): p. 204-213.
67. Neilson, L., et al., Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics*, 2000. **63**(1): p. 13-24.
68. Andria, M.L., G.S. Barsh, and S. Levy, Expression of TAPA-1 in preimplantation mouse embryos. *Biochemical and biophysical research communications*, 1992. **186**(3): p. 1201-1206.
69. Cho, C., et al., Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin  $\beta$ . *Science*, 1998. **281**(5384): p. 1857-1859.
70. Evans, J.P., Fertilin  $\beta$  and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays*, 2001. **23**(7): p. 628-639.
71. Kaji, K., et al., The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature genetics*, 2000. **24**(3): p. 279.
72. Wassarman, P.M., L. Jovine, and E.S. Litscher, A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology*, 2001. **3**(2): p. E59.
73. Wassarman, P.M., H. Qi, and E.S. Litscher, Mutant female mice carrying a single mZP3 allele produce eggs with a thin zona pellucida, but reproduce normally. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 1997. **264**(1380): p. 323-328.

74. Le Naour, F., et al., Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, 2000. **287**(5451): p. 319-321.
75. Miyado, K., et al., Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, 2000. **287**(5451): p. 321-324.
76. Darszon, A., et al., Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, 2006. **131**(6): p. 977-988.
77. Ren, D., B. Navarro, and G. Perez, A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 2001. **413**(6856): p. 603.
78. Qi, H., et al., All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(4): p. 1219-1223.
79. Avenarius, M.R., et al., Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *The American Journal of Human Genetics*, 2009. **84**(4): p. 505-510.
80. Hildebrand, M.S., et al., Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet*, 2010. **18**(11): p. 1178-84.
81. Qi, H., et al., All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(4): p. 1219-23.
82. Li, H.G., et al., Expression of CatSper family transcripts in the mouse testis during post-natal development and human ejaculated spermatozoa: relationship to sperm motility. *Mol Hum Reprod*, 2007. **13**(5): p. 299-306.
83. Yamazaki, D., et al., Complementary role of CNNM2 in sperm motility and Ca<sup>2+</sup> influx during capacitation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **474**(3): p. 441-6.
84. Pinto, F.M., et al., Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channels in human sperm. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 71.
85. Servin-Vences, M.R., et al., A caged progesterone analog alters intracellular Ca<sup>2+</sup> and flagellar bending in human sperm. *Reproduction*, 2012. **144**(1): p. 101-9.
86. Lishko, P.V., et al., The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol*, 2012. **74**: p. 453-75.
87. Evenson, D., et al., Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 1999. **14**(4): p. 1039-1049.
88. Guzick, D.S., et al., Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine*, 2001. **345**(19): p. 1388-1393.

89. Kodama, H., et al., Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and sterility*, 1997. **68**(3): p. 519-524.
90. Gorczyca, W., J. Gong, and Z. Darzynkiewicz, Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer research*, 1993. **53**(8): p. 1945-1951.
91. Sun, J.-G., A. Jurisicova, and R.F. Casper, Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of reproduction*, 1997. **56**(3): p. 602-607.
92. Shen, H.-M. and C.-N. Ong, Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000. **28**(4): p. 529-536.
93. Domínguez-Fandos, D., et al., Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry Part A*, 2007. **71**(12): p. 1011-1018.
94. MURATORI, M., et al., Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *Journal of andrology*, 2000. **21**(6): p. 903-912.
95. Wertz, K. and B.G. Herrmann, Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mechanisms of development*, 2000. **98**(1): p. 51-70.
96. Denny, P., et al., A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Research*, 1992. **20**(11): p. 2887.
97. Kiselak, E.A., et al., Transcriptional regulation of an axonemal central apparatus gene, sperm-associated antigen 6, by a SRY-related high mobility group transcription factor, S-SOX5. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(40): p. 30496-30505.
98. Zou, S., et al., Association study between polymorphisms of PRMT6, PEX10, SOX5, and nonobstructive azoospermia in the Han Chinese population. *Biology of reproduction*, 2014. **90**(5): p. 96, 1-4.

## 9. ETİK KURUL ONAYI

 **MEDİPOL**  
UNV İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.9279  
Konu : Etik Kurulu Kararı

23/06/2016

**Sayın Yrd. Doç. Dr. Şule Ayla**

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Erkek İnfertilitesinde Semende Adam2 (Fertilin) , Catsper Ve Sox5 Expresyonları Ve Sperm Fonksiyonları İle İlişkisi" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar  
Etik Kurulu Başkanı

EK:  
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 23.06.2016 tarihinde e-İmzalanmıştır. Evrağımızı <http://cbys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 43E19E50X0 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**  
Kavacık Mah. Ekinçiler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU KARAR FORMU

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Erkek İnfertilitesinde Semende Adam2 (Fertilin) , Catsper Ve Sox5 Expresyonları Ve Sperm Fonksiyonları İle İlişkisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Şule Ayla			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>



İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	21.06.2016		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	21.06.2016		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	<b>Karar No: 360</b>		<b>Tarih: 22/06/2016</b>			
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMIRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğr. Gör. Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

\* :Toplantıda Bulunma

## 10.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Özge	<b>Soyadı</b>	Biçeroğlu
<b>Doğum Yeri</b>		<b>Doğum Tarihi</b>	
<b>Uyruğu</b>		<b>TC Kimlik No</b>	
<b>E-mail</b>		<b>Tel</b>	

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	Trakya Üniversitesi / Fen Fakültesi / Biyoloji	2015
<b>Lise</b>	Yenilevent Lisesi	2011

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl – Yıl )</b>

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	63,12577	64,46872	63,17698

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

### Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2016
ISO	Diksiyon Eğitim Sertifikası	2012

### Poster Bildirileri

15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry	THE EFFECTS OF AN HERBAL MIXTURE PREPARED FROM <i>Urtica Diogia, Thymus Vulgaris, Glycyrrhiza Glabra, Vitis Vinifera, Alpinia Officinarum</i> PLANTS' OIL-BASED EXTRACTS ON WOUND HEALING	2017
---	---	------