

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**NORMAL, FAZLA KİLOLU VE OBEZ BİREYLERDE
IZUMO-1 SPERM YÜZEY RESEPTÖRÜNÜN
EKSPRESYON DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Vahide Cansu SEYMENOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Arzu YAY**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NORMAL, FAZLA KİLOLU VE OBEZ BİREYLERDE
IZUMO-1 SPERM YÜZEY RESEPTÖRÜNÜN
EKSPRESYON DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Vahide Cansu SEYMENOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Arzu YAY**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2015-6180 nolu proje kodu ile projelendirilmiştir.**

**Temmuz 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Vahide Cansu Seymenoğlu

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

''Normal, Fazla Kilolu ve Obez Bireylerde Izumo-1 Sperm Yüzey Reseptörünün Ekspresyon Düzeyinin Karşılaştırılması'' adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Vahide Cansu Seymenoğlu

Danışman

Doç. Dr. Arzu Yay

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Birkan YAKAN

Doç. Dr. Arzu YAY danışmanlığında **Vahide Cansu Seymenoğlu** tarafından hazırlanan “**Normal, Fazla Kilolu ve Obez Bireylerde Izumo-1 Sperm Yüzey Reseptörünün Ekspresyon Düzeyinin Karşılaştırılması**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

24/07/ 2017

JÜRİ

Danışman : Doç. Dr. Arzu YAY

Üye : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Üye : Doç. Dr. Cenap EKİNCİ



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2017

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana desteklerini esirgemeyen, her zaman yol gösteren tüm sabırla bana tecrübelerini aktaran öğrencisi olmaktan şeref duyduğum, idolüm çok değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Arzu YAY'a, tecrübelerinden ve engin bilgilerinden faydalandığım canım hocam Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Birkan YAKAN'a, yüksek lisansa girdiğim ilk günden beri bana yardımlarını esirgemeyen her zaman yol gösteren canım hocam Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a, birlikte çalışmaktan gurur duyduğum Yrd. Doç. Dr. Fazile CANTÜRK'e, tez çalışmamda yanımda olan kendisini örnek aldığım canım ablam biyolog Derya KARABULUT'a, tez çalışmamın her adımında bana desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan canım arkadaşlarım Araş. Gör. Gözde Özge ÖNDER'e ve Araş. Gör. Özge GÖKTEPE'ye, tez çalışmamda bana verdiği desteklerinden dolayı canım arkadaşlarım Ayşe CEYHAN'a ve Araş. Gör. Emin KAYMAK'a, hayat çizgisinde onun yolundan yürüdüğüm kızı olmaktan onur duyduğum moral kaynağım, desteğim canım babam Abbas SEYMENOĞLU'na, beni bugünlere getiren sabırla büyüten bana olan inancını hiçbir zaman yitirmeyen kızı olmaktan onur duyduğum her zaman yanımda olan moral kaynağım canım annem Havva Nur SEYMENOĞLU'na, hayattaki duruşu hayata bakış açısıyla örnek aldığım akıl hocam canım kardeşim Kübra SEYMENOĞLU'na, bu yaşıma kadar her zaman arkamda olan moral kaynağım canım amcam Ömer SEYMENOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Vahide Cansu SEYMENOĞLU

Kayseri, Temmuz 2017

NORMAL, FAZLA KİLOLU VE OBEZ BİREYLERDE IZUMO-1 SPERM YÜZEY RESEPTÖRÜNÜN EKSPRESYON DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Vahide Cansu SEYMENOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2017
Danışman: Doç. Dr. Arzu YAY

ÖZET

Aşırı kilo ya da obezite tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya başlamıştır. Son zamanlarda bazı çalışmalarda artmış beden kitle indeksi (BKİ)'nin semen parametreleri ve sperm kalitesi üzerine olumsuz etki edebileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada normal, fazla kilolu ve obez bireylerde sperm kalite düzeyleri arasındaki farklılıkları, sperm-yumurta füzyonunda görev alan Izumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeylerini ve artmış BKİ'nin sperm DNA'sı üzerine olası etkilerini belirlemek amaçlanmıştır.

Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniği'ne başvuran 18-35 yaş aralığında, BKİ normal (n=20), fazla kilolu (n=19) ve obez (n=18) erkek bireylerden alınan semen örnekleri kullanıldı. Sperm örnekleri Diff Quik boyama yöntemi ile boyanarak morfolojik kriterleri açısından değerlendirildi. Izumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeylerini belirlemek için western blot analizi kullanıldı. Gruplar arasında sperm DNA hasarlarını belirlemek amacıyla alkali comet assay yöntemi kullanıldı. Veriler R Studio 3.2.2 programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Gruplara ait olan sperm örneklerinde, ortalama sperm konsantrasyonu, sperm motilite oranı ve normal morfolojiye sahip sperm oranlarının özellikle de $BKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$ olan obez bireylerde düştüğü gözlemlendi. Çalışmada, fazla kilolu ve normal kilolulara doğru morfolojik hasarların azaldığı belirlendi. Western blot yöntemi kullanarak incelediğimiz Izumo-1 sperm yüzey reseptörü ekspresyon düzeylerine bakıldığında, BKİ değerlerinin Izumo-1 ekspresyonunu da etkilediği belirlendi. Buna göre, normal ve fazla kilolu grupları ile karşılaştırıldığında en yüksek Izumo-1 ekspresyonu obez grubunda bulunmaktaydı ($p > 0,05$). Alkali comet assay metodu ile gruplarda DNA hasarı incelendiğinde comet parametreleri, sperm morfolojik değerlendirme sonuçları ile uyumlu olarak diğer gruplara göre obez grubunda DNA hasarının anlamlı derece arttığını gösterdi ($p < 0,001$).

Sonuç olarak çalışmamızda, BKİ'nin erkek infertilitesi ve bununla ilişkili olan sperm sayısı ve morfolojisi ya da sperm DNA hasarı ile Izumo-1 protein ekspresyonu, ilişkili olduğu gösterilmiştir. Başta deneysel araştırmalar olmak üzere gebelik oranlarını da içeren daha geniş klinik çalışmalarla bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Sperm yüzey reseptörü, Izumo-1, western blot, comet assay

THE CONTRAST OF THE EXPRESSION LEVEL IN IZUMO-1 SPERM RECEPTORS FOR NORMAL, OVERWEIGHT AND OBESE PERSON

Vahide Cansu SEYMENOĞLU

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Histology and Embryology
Masters's Thesis, July 2017
Advisor: Asc. Prof. Dr. Arzu YAY

SUMMARY

Overweight or obesity has begun to be a major public health concern worldwide. Recently, in some works, it has been reported that increased body mass index could influence negatively on semen parameters and sperm quality. In this work it was aimed to determine; the differences between the sperm qualities of normal, overweight and obese person, the expression levels of the Izumo-1 sperm receptor which is assigned in sperm-egg fusion and the possible effects of the increased body mass index on the sperm DNA.

Semen samples from normal (n = 20), overweight (n = 19) and obese (n = 18) male subjects between the ages of 18-35 who applied at Erciyes University Faculty of Medicine Urological Polyclinic, were used in the study. Sperm samples were stained with Diff Quick staining method and evaluated in terms of morphological criteria. Western blot analysis was used to determine the expression level of Izumo-1 sperm receptor. The alkaline comet assay method was used with the aim to determine the sperm DNA damages between the groups. The data were statistically evaluated using the R Studio 3.2.2 program.

Mean sperm concentration, sperm motility ratio and sperm rates with normal morphology fell in obese subjects with $BMI \geq 30 \text{ kg / m}^2$ in the sperm samples belonging to the groups. In the study, it was determined that morphological damage decreased from overweight person to person with normal weight. When we examined the expression levels of Izumo-1 sperm surface receptor using Western blot method, it was determined that BMI values also affected Izumo-1 expression. Accordingly, when compared with the normal and overweight groups, the highest level of Izumo-1 expression was found in the obese group ($p > 0.05$). When DNA damage was examined in groups with Alkali comet assay method, comet parameters showed significant increase in DNA damage in obese group compared to other groups in accordance with sperm morphological evaluation results ($p < 0.001$).

In conclusion, our study showed that BMI correlates with male infertility and associated sperm count and morphology or sperm DNA damage with Izumo-1 protein expression. These findings should be supported by wider clinical trials, including experimental studies and pregnancy rates.

Keywords: Sperm surface receptor, Izumo-1, western blot, comet assay

İÇİNDEKİLER

NORMAL, FAZLA KİLOLU VE OBEZ BİREYLERDE IZUMO-1 SPERM YÜZEY RESEPTÖRÜNÜN EKSPRESYON DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. TESTİSLER.....	4
2.1.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi.....	4
2.1.2. Testisin Yapısı.....	6
2.1.2.1. Seminifer Tübüller (Tübüli Seminiferi Kontortiler).....	7
2.1.2.2. Sertoli Hücreleri.....	8
2.1.3. Spermatogenez.....	11
2.1.3.1. Spermatogonyal Faz.....	11
2.1.3.2. Spermatozit Fazı (Mayoz).....	12
2.1.3.3. Spermatid Fazı (Spermiyogenez).....	13
2.1.4. Testis Ara Dokusu.....	15
2.1.5. Testisin Histofizyolojisi.....	15
2.1.6. Spermin Yapısı.....	16

2.1.7. Semen Analizi (Spermiyogram)	17
2.1.7.1. Volüm	18
2.1.7.2. Renk	18
2.1.7.3. Koku.....	18
2.1.7.4. pH	18
2.1.7.5. Likefaksiyon (Semenin Çözünürlülüğü).....	18
2.1.8. Sperm Viabilitesi (Canlılığı).....	18
2.2. NORMAL SPERM.....	19
2.3. ANORMAL SPERM MORFOLOJİLERİ.....	19
2.3.1. Spermogram Yapılırken Çeşitli Sperm Parametrelerini İfade Eden Terimler.....	21
2.4. OBEZİTE.....	22
2.4.1. Obezite Tanımı.....	22
2.4.2. Obezitenin Neden Olduğu Sağlık Sorunları	23
2.4.2.1. Obezite ve İnfertilite	23
2.5. SPERM YÜZEY RESEPTÖRLERİ.....	24
2.5.1. Izumo-1 Reseptörü.....	25
2.6. SPERM HÜCRELERİNDE DNA HASARI	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. ÖRNEKLERİN ELDESİ VE GRUPLARIN OLUŞTURULMASI.....	29
3.2. SPERM ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	30
3.2.1. Diff Quik Boyama Yöntemi	30
3.3. WESTERN BLOT YÖNTEMİ	31
3.4. COMET YÖNTEMİYLE SPERMDE DNA HASARININ BELİRLENMESİ..	32
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. SPERM MORFOLOJİ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	34
4.1.1. Diff Quik Boyama.....	34

4.2. WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE IZUMO-1 SPERM YÜZEY RESEPTÖRÜNÜN EKSPRESYON DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ .	39
4.3. COMET YÖNTEMİ İLE DNA HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	62



KISALTMALAR VE SİMGELER

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
ATP	: Adenozin trifosfat
AUCSE	: Amerika Ulusal Çevresel Sağlık Bilimleri Enstitüsü
BKİ	: Beden Kitle İndeksi
CASP	: Comet assay yazılım projesi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
H&E	: Hemotoksilen Eozin
ICSI	: Mikroenjeksiyon
IVF	: In vitro fertilizasyon
L Comet	: Comet uzunluğu
L Head	: Baş uzunluğu
L Tail	: Kuyruk uzunluğu
LH	: Luteinizan hormon
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
PBS	: Fosfat tamponu
SCSA	: Sperm kromatin yapısı tayini
SS	: Standart sapma
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütüne göre obezite sınıflandırılması	23
Tablo 4.1. BKİ normal ve yüksek olan ejakulatların spermiyogram ve morfoloji sonuçlarının ortalama değerleri.	35
Tablo 4.2. Gruplara ait istatistiksel sonuçlar.	40
Tablo 4.3. Comet assay parametrelerinin gruplararası istatistiksel analizi	41



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizimi.....	6
Şekil 2.2.	Seminifer tübülde yer alan spermatojenik seri hücreleri ve bunların Sertoli hücreleri.....	10
Şekil 2.3.	Spermatogonial hücreler.....	12
Şekil 2.4.	Spermatogonial hücreler.....	14
Şekil 2.5.	İnsan sperminin şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.6.	Boyun bölgesi anomalileri.....	20
Şekil 2.7.	Çeşitli baş anomalileri.....	20
Şekil 2.8.	Akrozom defektleri.....	20
Şekil 2.9.	Kuyruk anomalileri.....	20
Şekil 2.10.	Izumo-1 sperm yüzey reseptörü.....	26
Şekil 2.11.	Juno – izumo bağlanması.....	27
Şekil 3.1.	Makler kamerasının görünümü.....	31
Şekil 3.2.	Makler kamerasında alanlar ve spermlerin mikroskopta görünümü.....	31
Şekil 4.1.	BKİ normal bireylere ait sperm morfoloji resimleri.....	36
Şekil 4.2.	BKİ Fazla kilolu bireylere ait sperm morfoloji resimleri.....	37
Şekil 4.3.	BKİ obez bireylere ait sperm morfoloji resimleri.....	38
Şekil 4.4.	A. BKİ normal, fazla kilolu ve obez gruplarına ait Izumo-1 protein bantları. B. Grafik; Izumo-1 protein ekspresyonunun gruplara göre dağılımı.....	39
Şekil 4.5.	Kontrol grubu Tail DNA % 2.53, şekil DNA hasarsız sperm hücrelerini göstermektedir.....	40
Şekil 4.6.	Fazla kilolu grubu Tail DNA % 6.5, şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir.....	40
Şekil 4.7.	Obez grubu Tail DNA % 10.47, şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir.....	41

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fiziksel aktivitedeki yetersizlik ve sağlıksız beslenme birçok hastalığı da beraberinde getirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından en riskli 10 hastalıktan biri olarak kabul edilen obezite son yıllarda en önemli sağlık problemleri arasında yer almaktadır. Vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olması durumunda, vücut yağ kitlesinin artması ile karakterize bir hastalık olan obezite genetik ve çevresel etkileşimleri olan kronik bir hastalıktır. Obezite farklı birçok yöntem ile ölçülebilmektedir. En sık kullanılan ve en basit yol beden kitle indeksi (BKİ) olarak bilinir. BKİ, bireyin vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun (metre cinsinden) karesine ($BKİ=kg/m^2$) bölünmesiyle elde edilen bir değerdir (1). Böylece, kişilerin kilo ve boy verilerini kullanarak vücut ağırlığının normal mi, fazla kilolu mu ya da obez mi olduğunu öğrenebiliriz.

Obezite, dünyadaki gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin hem çocuk hem de yetişkin döneminde önemli bir sorunu olduğu gibi ülkemizin de önemli sağlık sorunlarından birisidir (2). DSÖ tarafından obezite, sağlığı bozacak ölçüde vücutta aşırı yağ birikmesi olarak tanımlanmıştır. Obezitenin kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, insülin direnci, diabetes mellitus, bazı kanserler, solunum bozuklukları ve beraberindeki psikolojik problemlerle artmış mortalite ile ilişkisi bilinmektedir (3). Obeziteye bağlı bozukluklar incelenirken beden sağlığı üzerinde odaklanılsa da, veriler infertiliteye de neden olduğu yönündedir.

İnfertilite, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yılın sonunda gebelik sağlanamaması olarak tanımlanır ve çiftlerin %15 'ini etkiler. İnfertilite nedeninin yaklaşık %20'si sadece erkek faktörü iken kadın ve erkek faktörü birlikteliğinde bu oran %30-40'lara ulaşmaktadır. Böylece erkek faktörü çiftlerin yaklaşık yarısında bulunmaktadır. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde rutin semen analizi kullanılmaktadır. Semen

analizinde ejakulatın fiziksel özellikleri, toplam sperm sayısı, sperm motilitesi ve morfolojisi, vitalite oranı gibi spermatozoaya ait faktörler incelenmektedir (4). Erkek infertilitesine neden olan faktörler arasında inmemiş testis, testis torsiyonu varikosel, antisperm antikolar, hipogonadotropik hipogonadizm ve üreme kanallarının obstrüksiyonu olarak bilinsede, son zamanlarda bazı çalışmalarla artmış BKİ'nin erkek üreme fonksiyonları üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğu da bilinmektedir (1).

Fertilizasyon doğal olarak bir bireyin gelişmesini sağlayacak olan zigotun olduğu önemli bir süreçtir. Sperm ve yumurta zar füzyonu da dahil olmak üzere sıralı olaylara eşlik eder. Bununla birlikte, insan üreme kontrolünde fertilizasyonun önemine rağmen, füzyonun altında yatan moleküler temel bir sır olarak kalmıştır. Sperm hücrelerinin yapısı üzerinde önemli rolü bulunan hücre membranı genel olarak diğer memelilerin plazma membranları ile benzerdir. Spermatozoa membranında sperm hücresine özgü çeşitli antijenler bulunur. Bunlardan bazıları tirozin kinaz sp 95, proakrozin, PH-20, PH-30, sp 56, galaktoziltransferaz, spermadezinler, progesteron reseptörü ve Izumo-1 vb.'dir. Bir sperm membranı yüzey reseptörü olarak bilinen Izumo-1, sperm ve yumurta hücrelerinin füzyonunda etkili ve gerekli bir membran yüzey reseptörü olarak tanımlanmıştır.

Erkek DNA kalitesi üreme yeteneğini gösterir. Erkeğin sperm sayısı, hareketliliği ve olgunluğunu belirleyen pek çok etken olmakla birlikte bu konuda genetik faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir. Genetik özelliklerin yanında erkeğin yaşam şekli, beslenme alışkanlıkları da sperm DNA'sının sağlığından önemli bir rol oynamaktadır. Obez erkeklerde DNA kırılma oranlarının arttığı bildirilmiştir (5). Semen örneğinin sperm DNA bütünlüğünün tanınması, yüksek oranda üreme etkinliği için çok önemlidir. Semen analizi parametreleri olan morfoloji, motilite ve örnekteki spermatozoa konsantrasyonu; üreme potansiyelinin değerlendirilmesi açısından yetersiz kalmaktadır. Küçük sperm DNA hasarları, pre ve post replikasyon onarım mekanizmalarıyla onarılabilirken; büyük DNA hasarları onarılamayabilir. Böylelikle gerçekte infertil bir erkek rutin spermiyogram verilerine göre görünüşte normal morfolojide spermlere sahip olur, bu germ hücreleri ise hasarlı DNA'yı barındırır. Bu durum, gebelik kayıplarına veya ölü doğumlara neden olur; ya da ciddi dismorfogenetik özellikte major veya minor konjenital malformasyonlar veya retinoblastom benzeri kesin kanser predispozisyonunu

arttırır. Böylelikle DNA bütünlük çalışmaları, yardımcı üreme tekniklerinin kullanımı öncesinde infertil erkeklerin değerlendirilmesinde son derece önemlidir (6).

Bununla birlikte erkek obezitesi ile sperm yüzey reseptörü olan Izumo-1 ile DNA bütünlüğü arasındaki ilişki tam olarak ortaya konulamamıştır. Biz bu çalışmada artmış BKİ değerlerinin bir füzyon proteini olan Izumo-1 ekspresyonu üzerine etkisi ve DNA hasarına ne ölçüde sebep olabileceği düşüncesiyle DNA hasarının araştırılmasına karar verdik (7).

Bu çalışmanın amacı BKİ normal, fazla kilolu ve obez kişilerden alınan semen örneklerinde BKİ değerleri ile sperm morfolojisi, Izumo-1 yüzey reseptörünün western blot analizi ile ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve comet assay metoduyla DNA hasarının incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

Erkek genital sistemi, haploid kromozom içerikli erkek germ hücrelerinin devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından ve erkek seks hormonlarının sekresyonundan sorumludur (8). Erkek genital sistemi, sperm üreten ve androjenleri salgılayan bir çift testis, spermatozoanların dışarıya taşınmasından görevli dış genital kanallar sistemini oluşturan epididimis, duktus deferens, ejakülatuar kanal ve erkek üretrasının bir parçasından ve çiftleşme organı olan penisten oluşmaktadır.

2.1. TESTİSLER

2.1.1. Testisin Embriyonik Gelişimi

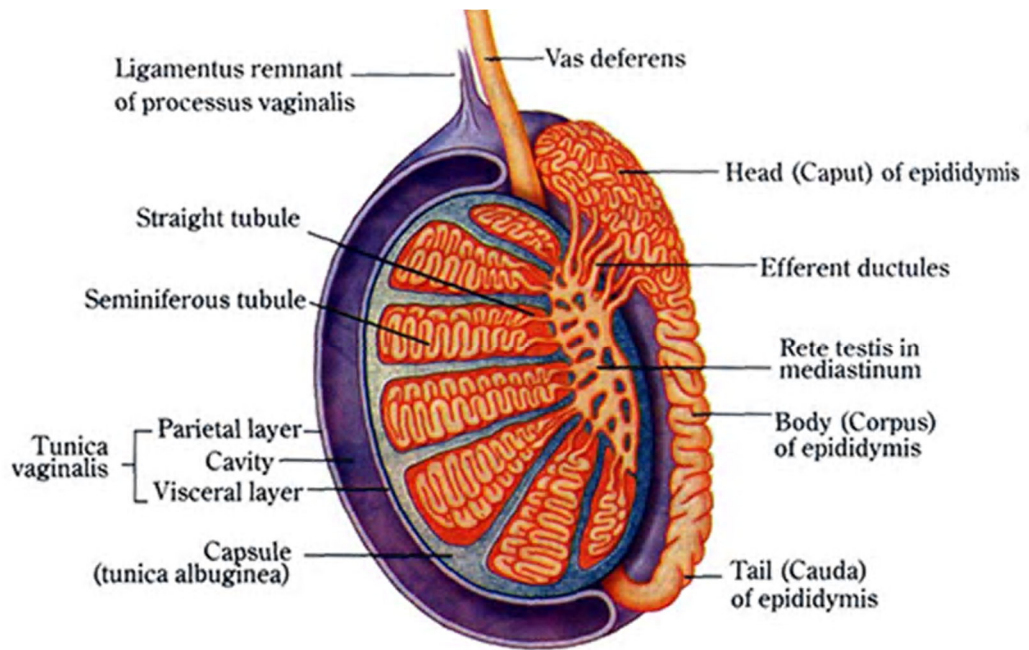
Embriyonun hem kromozomal hem de genetik cinsiyeti sekonder oositi dölleyen bağlı olarak dillenmede belirlenir (9). Testisler vitellus kesesi endoderminden köken alır. İnsan embriyosunun dorsal segmentleri arasından primordiyal gonadın mezenkim kısmı gelişir (10). Primordiyal germ hücreleri ise gelişimin üçüncü haftasında allantoise yakın bir yerde vitellüs kesesi duvarında endoderm hücreleri arasında belirir. Beşinci haftada primitif gonadlara ulaşırken altıncı haftada genital kıvrımlara tamamen yerleşirler. Gebeliğin yedinci haftasından önce, her iki cinsin gonadları benzerdir ve farklılaşmamış gonadlar olarak adlandırılırlar. Gonadlar üç kaynaktan köken alır. Bunlar; Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitelyum), altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu), primordiyal germ hücreleridir. Gonadların erkek ya da dişi yönünde farklılaşmaları XX ya da XY kromozom kompleksine bağlıdır ve cinsiyet gebeliğin yedinci haftasında belli olur (11). Genetik olarak Y kromozomu bulunduran embriyolarda, genellikle testisler gelişmektedir. Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan SRY geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişimini sağlayan bir anahtar rolü görmektedir (12). Testis belirleyici faktör primer seks kordonlarını uyararak,

farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına sebep olur, kordonlar burada dallanarak anastomoz yaparlar ve böylece rete testis meydana gelir (13). Gelişim devam ettikçe testis kordonları yüzey epiteliyle olan ilişkisini kaybeder. Bu testisin üzerini saran fibröz yapıdaki tunika albuginea aracılığı ile olur. Kordonlar puberteye kadar kapalıdır (14). Bu dönemde lümenin oluşumu ile seminifer tübüller meydana gelir. Seminifer tübüller rete testis lümenine bağlanıp sonra duktuli efferentes ile devam edecektir. Bunlarda Wolff kanalına açılarak duktus deferens oluşturur (15). Leydig hücreleri, interstisyel dokudaki mezenkimal hücrelerin farklılaşması sonucu ortaya çıkar. Gebeliğin ortasına kadar bu hücreler testisin %50'sini oluştururken doğuma doğru sayıları giderek azalacaktır. Gelişimin erken dönemlerinde lomber bölgede bulunan testisler, üçüncü aydan itibaren skrotuma doğru inmeye başlar. Hutson hipotezine göre testisin inişinin iki evresi vardır: İlki transabdominal evre olup bu evre androjenden bağımsızdır ve iniş anti mülleryan hormon etkisi ile olur. Testis karın arka duvarı boyunca inerken gebeliğin 17. haftasında iç inguinal halka hizasına gelir ve gebeliğin 28. haftasına kadar burada kalır. İkinci evre inguinokrotal evre olarak bilinir. Bu dönemde testis inguinal kanal yoluyla karın ön duvarını geçer ve skrotuma iner. Testis gelişimin yedinci ayından sonra inguinal kanalı geçmiştir ve doğum gerçekleşmeden önce de gelişimini tamamlamış bir şekilde erişkinde olması gerektiği gibi skrotumdaki yerini almıştır.

Embriyonik gelişim döneminde, gelişmekte olan testisler glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormonu üretmekten sorumludurlar. AMH, destek hücreleri olan sertoli hücreleri tarafından üretilir ve bu hormonun üretimi puberteye kadar devam etsede üretim seviyesi gittikçe azalacaktır. AMH'nin en önemli görevi paramezonefrik kanalların gelişimini bakılmasıdır. Puberteye kadar solid halde kalan seminifer tübüllerde puberteden itibaren lümen gelişir. Seminifer tübüllerde iki farklı hücre tipi bulunur; Sertoli ve spermatogenetik hücreler. Sertoli hücreleri testisin yüzey epitelinden gelişirler. Fötal testise ait seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri çoğunluğu oluşturur. Daha sonra testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dışında bulunan mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktusları oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuslar, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (16).

2.1.2. Testisin Yapısı

Testis epididimis ve tunika vajinalis adı verilen mezotel döşeli boşluğu içine alan deri ile kaplı bir skrotal kese içinde bulunur. Bu şekilde bir yerleşim testislerin normal spermatogenez için gerekli vücut ısısı olan 34 °C ila 35 °C arasında olmalarını sağlar. Testisler, tunika albuginea adı verilen kalın bağ dokusu kapsülü ile sarılmıştır. Oldukça kalın sıkı bağ dokusu yapısında olan tunika albuginea her bir testisi sarar. Kapsülün iç kısmı olan tunika vasküloza kan damarları içeren gevşek bağ dokusudur. Her bir testis, kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından yaklaşık 250 lobüle bölünür. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşır ve mediastinum testisi meydana getirir (17). Buradan bezin içine doğru uzana fibröz septumlar bezi testiküler lobüller olarak adlandırılan yaklaşık 250 adet piramidal loba ayırır. Bu bölmeler genellikle birbirleri ile ilişkilidir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizimi (18).

Her bir lobül, yüksek düzeyde kıvrımlı birkaç seminifer tübülden oluşmaktadır. Testisin her bir lobülü, gevşek bağ dokusu ile sınırlı 1 ile 4 adet seminifer tübül içerir. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir. Seminifer tübül yapılatı erkek germ hücreleri olarak bilinen spermatozonları üretirler. Leydig hücreleri ise testiküler androjenleri salgılar. Lobülün

içindeki her bir tübül bir halka yapar ve uzun olması nedeniyle oldukça kıvrımlıdır ve lobülün içinde kendi üzerine katlanır. Halkanın uçları testisin mediastinumuna yakındır ve burada kısa, düz bir seyir izler (19). Seminifer tübülün bu bölümü düz tübül (tubulus rektus) olarak adlandırılmaktadır. Bu bölüm mediastinumun içinde anastomozlaşan kanallar sistemi olan rete testis ile devam eder. Seminifer tübüller, tunika propriya tarafından çevrelenmiş bir seminifer epitelden meydana gelmektedir. Seminifer epitel iki temel hücre popülasyonundan oluşan kompleks, çok katlı, sıra dışı bir epitelidir.

2.1.2.1. Seminifer Tübüller (Tübüli Seminiferi Kontortiler)

Her lobül yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulundurur. Her bir seminifer tübül çok katlı epitel hücrelerinden oluşan yaklaşık 150-200 µm çapında, 30-70 cm uzunlukta olup bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Her bir tübül lobülün tepesine doğru sonlanırken lumeni daralır ve düz tübüller ya da tübüli rekti adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar (20). Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşmuştur. Seminifer epitelde 2 tip hücre vardır. Sertoli ya da destek hücreleriyle spermatogenezdeki seriyi oluşturan hücrelerdir. Spermatogenez seri hücreleri 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir, işlevleri ise spermatozoonları üretmektir. Seminifer tübülleri çevreleyen adventisyal tabakanın hemen altında tübül lümenine doğru myoid hücre tabakası yer almaktadır. Bu hücrelerin ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretiminde ve sertoli hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alabilecekleri ileri sürülmüştür. Myoid hücrelerin aynı zamanda kontraktıl kapasiteye sahip oldukları da bildirilmiştir (21). Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış myoid hücreler içerir. Myoid hücre tabakası ile bazal membran arasında "iç lamel" adı verilen kollajen tabakası bulunmaktadır (22-24). En iç tabakayı bazal membran oluşturur. Bazal membrandan lümeneye doğru var olan çok katlı hücre tabakası içinde iki tür hücre bulunmaktadır. Bunlar sertoli ve spermatogenez hücreleridir.

2.1.2.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri saran uzamış piramidal hücreler olarak tanımlanır (Şekil 2.2). Bu hücrelerin tabanları bazal laminaya oturmuştur, apikal bölüm ise seminifer tübülün lümenine kadar uzanır. Işık mikroskopunda, Sertoli hücrelerinin sınırları belirgin değildir, çünkü bu hücrelerin spermatogenik seriye ait hücreleri çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları bulunur. Elektron mikroskobu çalışmalarında hücrelerin iyi gelişmiş organelleri (bol miktarda düz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş kaba endoplazmik retikulum, Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozom) içerdiği bilinir. Genellikle üçgen biçiminde uzamış bir çekirdek, belirgin bir nukleolus görülür (25). Sertoli hücreleri, spermatogenetik hücrelerden farklı olarak çoğalma özelliği göstermezler. Sertoli hücreleri, yerleşimleri ve birbirleriyle olan ilişkileri nedeniyle spermatogenetik hücrelere mekanik desteklik sağlar, beslenmelerine yardımcı olur ve onları kan yoluyla gelen zararlı maddelerden korur (26,27). Ayrıca sertoli hücrelerinin fonksiyonları arasında hipofiz bezinden folikül uyarıcı hormon (FSH) salınmasını önleyen inhibin hormonunu salgılamak, seminifer tübül lümenine proteinlerce zengin bir sıvı salgılama ve spermatogenez için gerekli olan testosteron konsantrasyonunu artıran androjen bağlayıcı proteini (ABP) üretmek ve salgılamakta yer almaktadır. Sertoli hücrelerinin salgıladığı androjen tutucu protein, seminifer tübül ve genital boşaltma kanallarındaki testosteronu kontrol eder. Yine sertoli hücrelerince salgılanan uyarıcı ve baskılayıcı yapılar, spermatogenetik hücrelerin geçirdiği mitoz ve mayoz bölünmeleri kontrol eder. Yan yana bulunan Sertoli hücreleri, hücrenin alt yan yüzeylerinde engelleyici sıkı ilişkiler ile birbirine bağlanarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer dinamik yapıdadır ve seminifer tübülü bazal ve adluminal kompartman olmak üzere ikiye ayrılır. Sertoli hücrelerinin lateral membran uzantıları arasında bulunan zonula okludensler sayesinde kan-testis bariyeri oluşmuştur. Bazal kısımda spermatogonyumlar ve erken dönem primer spermatozoidler yer alırlar. İlerleyen aşamalarda adluminal alana geçerken olgunlaşan spermelerde kromozomal yapı değiştiği için kan-testis bariyerinin bu sperm hücrelerinin immün sistemin olası saldırısından korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Kan testis bariyerine myoid hücre tabakası ve endotel tabakasının da katkısının bulunduğu düşünülmektedir. Bu açıdan ele alındığında, sperm üretiminin sürekli olduğu erişkin bireylerde testiste, kan-

testis bariyerinin bozulmasına neden olacak hadise otoimmün bir testis hasarına yol açabilecek antisperm antikorların oluşumuna neden olabilir.

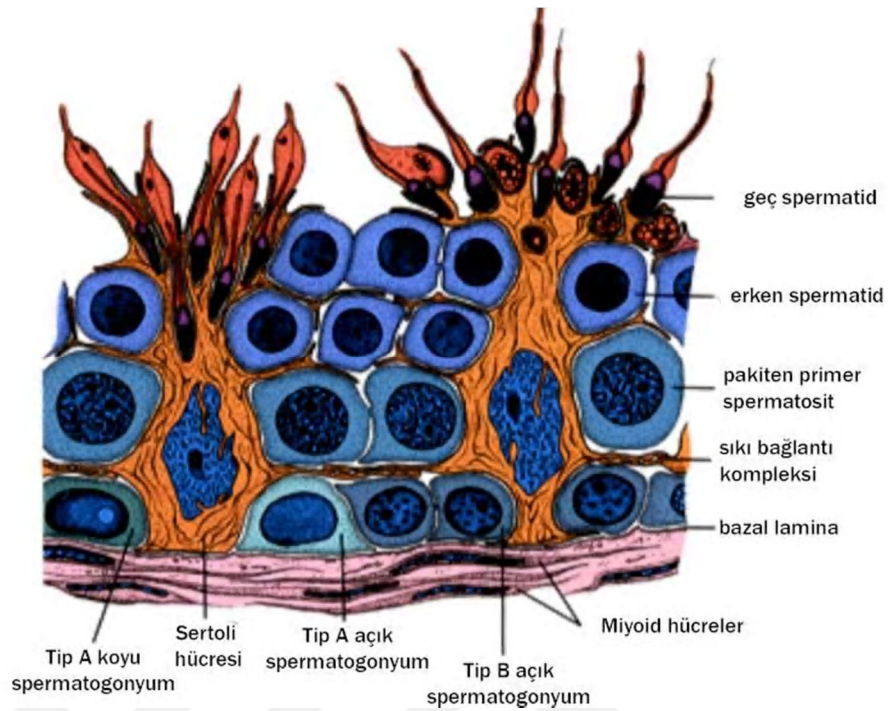
Sertoli hücrelerinin başlıca önemli işlevleri;

1. Gelişmekte olan spermatoozonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi: Spermatozoidler, spermatidler ve spermatozoonlar kan-testis bariyeriyle izole edildiği için, bu spermatogonik hücreler besin maddeleri ve metabolitlerin alınması için Sertoli hücrelerine muhtaçtır. Sertoli hücreleri bariyeri geliştiren sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan da korur.

2. Fagositoz: Fagosite edilen bu sitoplazmik parçalar Sertoli hücrelerindeki lizozomlarda sindirilir.

3. Sekresyon: Bu hücreler seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve spermaların taşınmasında görev alan bir sıvı üretirler. Androjen bağlayıcı protein üretimi Sertoli hücreleri tarafından folikül uyarıcı hormon ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir.

4. Anti-Müllerian Hormon üretimi: Bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta paramezonefrik kanalların gerilemesinde görev alan bir glikoproteindir. Testosteron hormonu mezonefrik kanallardan köken alan yapıların gelişmesinde görev alır.



Şekil 2.2. Seminifer tübülde yer alan spermatojenik seri hücreleri ve bunların Sertoli hücreleri (27).

Testisin seminifer tübülleri arasındaki interstisyel doku bağ dokusu, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir. Bunlar arasında fibroblast, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir çekirdeği ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir. Bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işbirliğine bir örnek oluşturur.

Leydig hücrelerinin aktiviteleri ve miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda gebelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon anne kanından bebeğe geçer ve androjenik hormonları üreten fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Bu hormonlar, embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için mutlaka gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler gebeliğin 18. haftasına kadar tamamen farklılaşmıştır;

bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden sonra salınan Lüteinizan Hormon (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları puberte öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (25).

2.1.3. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan sperm gelişimi sürecidir. Spermilerin üretildiği süreç olan spermatogenezde kompleks ve eşsiz bir olaylar serisi gerçekleşmektedir. Süreç ilkel primitif bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar (28-29). Puberteden kısa bir süre önce, pitüiter gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisi altında başlar ve yaşam boyunca devam eder (30). Tanımlayıcı olması için, üç farklı faza ayrılmaktadır.

Spermatogonyal faz'da spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek kendi yerlerine geçecek hücreleri oluştururken, sonuçta primer spermatositlere farklılaşacak olan adanmış spermatogonyum popülasyonunu da oluştururlar.

Spermatosit faz'da (**mayoz**) primer spermatositler iki mayotik bölünmeye uğrayarak kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını azaltırlar ve spermatid adı verilen haploid hücreleri oluştururlar.

Spermatid faz'da (**spermiyogenez**), spermatidler matür (olgun) sperm hücrelerine farklılaşırlar.

Spermatogenezin sonunda spermatidler son olgunlaşmalarını geçirirler ve spermiasyon olarak adlandırılan bir süreç ile Sertoli hücrelerinden seminifer tübülün lümenine salıverirler.

2.1.3.1. Spermatogonyal Faz

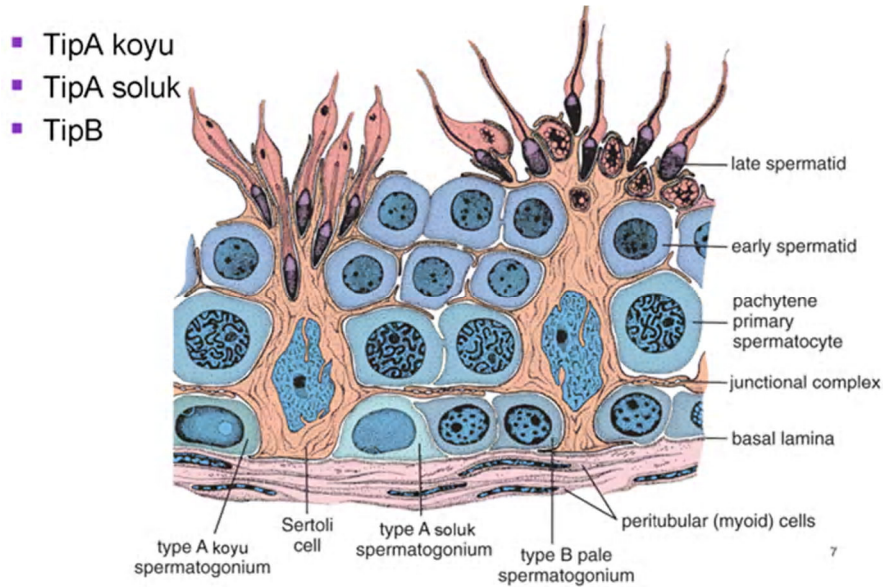
Spermatogonyal fazda kök hücreler bölünerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve adanmış spermatogonyum popülasyonunu oluştururlar (Şekil 2.3). Spermatogonyal kök hücreler çok sayıda bölünme geçirirler ve rutin hemotoksilen eozin (H&E) preparatlarında nüklear görünümde farklılıklar gösteren spermatogonyal soyları üretirler.

İnsan spermatogonyumları, rutin histolojik preparatlarda nükleusların görünümü temel alınarak 3 tip olarak sınıflandırılmaktadır (31).

1-Tip A koyu spermatogonyumlar; İnce granüllü kromatinli, yoğun bazofilik, oval nükleuslara sahiptir. Bu spermatogonyumların seminifer epitelin kök hücre olduğu düşünülmektedir.

2-Tip A açık spermatogonyumlar; Açık renk boyanan ince granüllü kromatinli oval nükleuslara sahiptirler.

3-Tip B spermatogonyumlar; Genel olarak nüklear zarf boyunca ve merkezi bir nükleolusun çevresinde geniş kümeler oluşturacak şekilde yoğunlaşmış kromatini bulunan yuvarlak nükleuslara sahiptirler.



Şekil 2.3. Spermatogonial hücreler (32).

2.1.3.2. Spermatozit Fazı (Mayoz)

Spermatozit fazında primer spermatozitler mayozu uğrayarak hem kromozom sayısını, hem de DNA miktarlarını azaltırlar. Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi primer spermatozitleri üretir. Oluştuktan kısa süre sonra ve mayoz başlamadan önce DNA'larını replike ederler. Böylece, her primer spermatozit normal sayıda kromozom (2n) ve iki katı miktarda DNA içerir. Her kromozom iki kardeş kromatidden oluşur. Mayoz I, kromozom sayısını (2n'den 1n'ye) azaltır ve DNA miktarını haploid duruma (4d'den 2d'ye) getirir. Mayoz II' den önce DNA replikasyonu olmadığı için, bu bölümden sonra her bir spermatid haploid (1n) sayıda kromozoma sahiptir. Her bir

kromozom tek bir kromatid (1d) içerir. İnsan primer spermatositlerde 22 gün kadar birinci mayotik bölünmenin profazında kromatin görülebilen kromozomları oluşturacak şekilde yoğunlaşır. Profazın sonunda 44 otozom ve bir X ve Y kromozomu, her biri iki kromatin ipliğine (kromatidler) sahip halde fark edilebilir. Dört kromatidden oluştukları için tetrad denen homolog kromozom çiftleri, crossing-over olarak adlandırılan süreç ile genetik materyal değişimi yaparlar (33,34). Bu değişim esnasında, dört kromatid yeniden düzenlenerek sinaptonemal kompleks olarak adlandırılan üç parçalı bir yapı oluştururlar. Bu süreç genetik çeşitliliği garantilemektedir. Genetik değişim yoluyla, her spermatositin ürettiği dört spermatid birbirinden ve diğer spermatidlerden farklı olur. Crossing-over tamamlandıktan sonra homolog kromozomlar ayrılır ve mayoz mekiğinin zıt kutuplarına hareket ederler. Böylece, crossing-over ile modifiye edilen tetradlar ayrılırlar ve tekrar diyardları oluştururlar. Homolog bir çiftin bir kromozomunun mekiğin her iki kutbundan birine hareketi rasgeledir. Bu rasgele düzenleme, sonuçta oluşan spermin genetik çeşitliliğinin diğer bir kaynağıdır.

Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler sekonder spermatositler olarak adlandırılmaktadır. Her sekonder spermatosit kromozom sayısını azaltmıştır (1n); 22 otozom ve bir X ya da Y kromozomuna sahiptirler. Bu kromozomların her biri iki kardeş kromatidden oluşur. İkinci mayotik bölünmenin metafazında kromozomlar metafaz plağında dizilirler. Kardeş kromatidler ayrılır ve mekiğin zıt kutuplarına hareket eder. İkinci mayotik bölünme tamamlandığında ve nüklear membranlar yeniden oluştuğunda her bir sekonder spermatositten her biri 23 tek iplikli kromozom (1n) ve 1d miktarında DNA içeren iki haploid spermatid oluşur (35).

2.1.3.3. Spermatid Fazı (Spermiyogenez)

İkinci mayotik bölünmenin sonucunda oluşan her spermatid DNA içeriği olarak haploiddir (1d) ve (1n) olan kromozom sayısı 22 otozom ve bir X ya da Y kromozomu tarafından temsil edilmektedir (36,37). Bu fazda daha fazla bölünme olmaz. Spermatid popülasyonunun olgun sperme farklılaşması esnasında meydana gelen yoğun yeniden şekillenme 4 fazdan oluşmaktadır (Şekil 2.4) Bunlar;

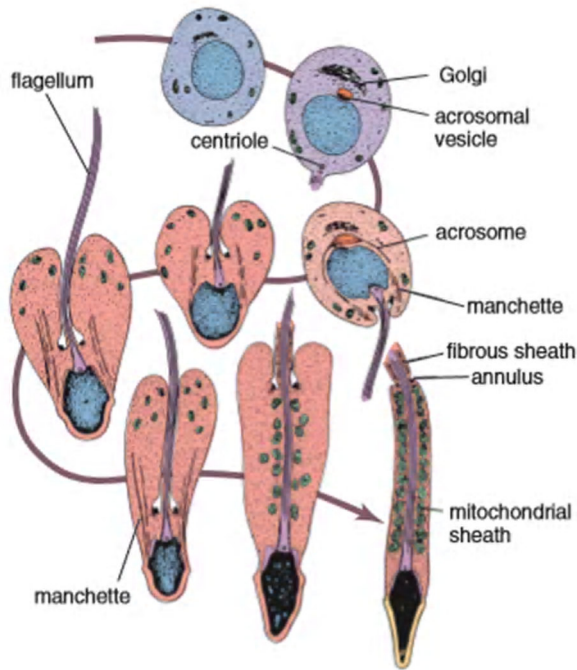
1-Golgi fazı: Bu faz, spermatidin çok sayıdaki Golgi kompleksinde kümelenen periyodik asit Schiff (PAS) pozitif granüllerin bulunması ile karakterizedir. Bu proakrozomal granüller, glikoprotein bakımından zengindirler ve akrozomal vezikül

denen ve nüklear zarfa, komşu membranla sınırlandırılmış bir vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bu fazda akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Akrozomal vezikülün pozisyonu, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler.

2-Kep fazı: Bu fazda akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısının üzerinde yayılır. Bu yeniden şekillenmiş yapıya akrozomal kep denmektedir. Akrozomal kepin altındaki nüklear zarf parçası porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Nüklear içerik de yoğunlaşır.

3-Akrozomal faz: Bu fazda spermatid kendini yeniden hizalar ve baş Sertoli hücresinin içerisine iyice gömülür ve bazal laminaya doğru yönelir. Gelişmekte olan flagellum seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Nükleus ve onu çevreleyen akrozom da plazma membranının ön kısmına hemen komşu bir pozisyona taşınır. Nükleus ise daha uzun ve daha yoğundur.

4-Olgunlaşma (Maturasyon) fazı: Spermatidin yeniden modellenmesinin bu son fazında flagellanın etrafındaki fazla sitoplazma azaltılır ve olgun (matür) spermatozoon oluşur. Daha sonra, rezidüel cisimcik olarak da adlandırılan fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Gelişmekte olan gametleri karakterize eden interselüler köprüler rezidüel cisimlerde kalırlar. Spermatidler artık birbirlerine bağlı değildirlir ve Sertoli hücrelerinden salıverilirler (38).



Şekil 2.4. Spermatogonial hücreler (39).

2.1.4. Testis Ara Dokusu

Testisin yaklaşık %25-30'unu gevşek bağ doku oluşturur, bu ara bağ dokusunda Leydig hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, farklılaşmamış mezenşimal hücreler, kapillerler, lenf damarları ve sinirler bulunur. Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki üçgenlerde yer alırlar. Bu hücreler, testosteron hormonunun üretiminden sorumludurlar. Ayrıca, nöroendokrin fonksiyonları da bulunur. Parakrin olarak oksitosin, substans-P, b-endorfin vb. salgırlar (40). İki çekirdekli içerebilen bu hücreler iyi gelişmiş Golgi kompleksi, tübüler tip kristali mitokondriyonlar ve stoplazmada yağ damlacıkları bulundurlar. Bu hücreler salgı granülü içermez, üretilen testosteron ise ihtiyaca göre sentezlenir ve gerektiğinde kana verilir.

2.1.5. Testisin Histofizyolojisi

Spermatogenezin gerçekleşmesi için ısı oldukça önemlidir. Normal vücut sıcaklığı 37 °C olup bu durum spermatozoon gelişiminde olumsuz bir durumdur. Testis karın boşluğu dışında lokalize olmuştur ve bulunduğu konumda ısısı yaklaşık olarak 35 °C'dir. Zengin bir pampiniform pleksusu testisi besleyen testiküler arterin etrafını sararak testiküler ısınının belirli derecede sürdürülmesinde bir ters akım ısı değişimi mekanizması oluşturur. Spermatogenez için gerekli olan ısının sağlanmasında etkili diğer faktörlerin skrotumdaki terin buharlaşması, spermatik kordonda bulunan krameter kaslarının kasılması ve testisin yüksek ısıda kalabilmesi için inguinal kanallara hareketi sayılabilir (41).Spermatogenez üzerindeki en önemli faktörlerden biride endokrin faktörlerdir. Spermatogenez olayı başlıca hipofiz bezinden salınan FSH ve LH hormonlarının testis üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH leydig hücreleri üzerine etki eder ve spermatogenik seriye ait hücrelerin normal gelişimi için gerekli bir hormon olan testosteron yapımını indükler. FSH ise Sertoli hücrelerini etkileyerek ABP'nin sentez ve salınımını uyarılmaktadır. ABP, testosterona bağlanır ve testosteronun seminifer tübül lümenine kadar taşınmasını sağlar. Spermatogenez olayı testosteron hormonu ile uyarılırken östrojen ve progesteron tarafından inhibe edilir. Spermatozoonlar epididimis içine testiküler sıvı içinde taşınır.Testiküler sıvı testiste sertoli hücreleri ve rete testiste bulunan hücreler tarafından salgılanır ve başlıca steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP bulundurur (42).

2.1.6. Spermin Yapısı

Seminifer tübüller içindeki germinal epitelden insanda günde 200 milyonu aşabilen sayılarda sperm üretilebilmektedir. Bu sayı türler arasında oldukça farklılık gösterebilmektedir. Ovumla kıyaslandığında oldukça küçük bir hücre olan sperm takriben 60-65 mikrometre uzunluğunda, dar sitoplazmalı ve hareket kabiliyeti yüksek özel bir hücredir. Olgun sperm iki elemandan oluşur: Baş ve kuyruk. Bir bağlantı parçası ile baş kuyruğa bağlanmıştır.

Baş, spermin baş bölümü bir takım immünolojik yöntemlerle incelendiğinde akrozomal ve post akrozomal olmak üzere iki kısma ayrılmıştır ve akrozomal kısımda kendi içinde anterior akrozom ve posterior akrozom olmak üzere iki kompartmana ayrılmıştır.

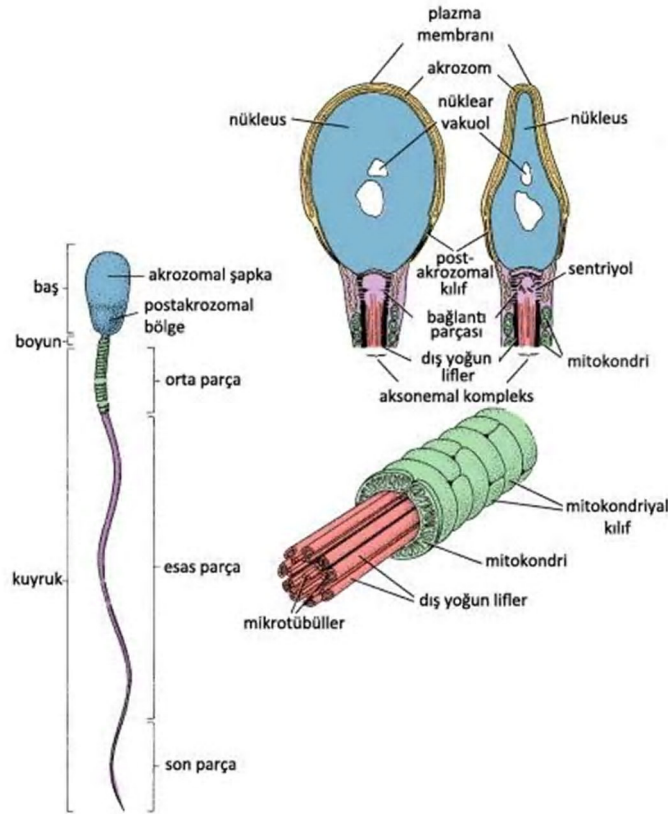
Erişkin spermde, spermin oositle birleşmesi için gereken litik olayları düzenleyen enzimatik etkinliğe sahip birçok proteini içeren akrozom adı verilen plazma membranı ile nükleus zarı arasında yerleşmiş dar bir kesecik bulunmamaktadır. Nükleus zarı, hücre zarı ve akrozomal zarlar arasında yer alan sitoplazmik tabakalarda fonksiyonel veya yapısal özelliği bulunan birçok molekül yerleşmiştir.

Kuyruk, Sperm kuyruğu spermin hareketini sağlayan bölümdür. En iç kısımda yer alan aksonem tüm kuyruk boyunca uzanım gösterir. Merkezde yerleşmiş bir çift tübül ve onun etrafında bulunan 9 çift mikrotübül yapının esasını oluşturur. Periferdeki tübül çiftlerinin hemen lateralinde kuyruğa sağlamlık ve elastikiyet kazandıran 9 adet yoğun dış fibril ismi verilen yapı bulunmaktadır. Kuyruk üç kısma ayrılmıştır: Orta parça, esas parça ve son parça (43).

Bağlantı parçası, bir çift sentriyolün bulunduğu dar bir parçadır. Kuyruğun orta parça kısmı, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka 9+2 mikrotübüller aksonem ve dış yoğun lifler ismi verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk devamınca uzanan dokuz uzamına seyreden kolonlardan meydana gelir.

Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifçe sarılı merkezi aksonem ve fibröz kılıftan oluşur. Fibröz kılıf, eş uzaklıktaki uzamına kolonlardan çıkan dairesel şeklinde iskelet tarafından oluşturulur.

Son parça, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı, sadece aksonem bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. İnsan sperminin şematik gösterimi (44).

2.1.7. Semen Analizi (Spermiyogram)

Erkek infertilitesinin saptanması ve değerlendirilmesinde önemli ve o ölçüde de basit olan test semen analizidir (spermiyogram). Erkek faktörünün kesinlik kazanabilmesi için öykü, semen analizi ve hormonal değerlendirme yapılmalıdır.

Kişiden kişiye değiştiği kadar aynı kişide bile cinsel perhiz süresi, ısı farklılığı, günün farklı saatleri, mevsimler, semen örneğinin verildiği yer ve çalışma koşullarına göre farklılık gösterdiğinden standardize edilmesi oldukça güç bir testir (45,46). Spermatozoa motilitesinin azalmasının önüne geçmek için semen 20-22 °C sıcaklığında tutulmalıdır (47). Semen temiz, toksik olmayan, geniş ağızlı kaplarda toplanmalıdır. Sperm analizinde 2-5 günlük cinsel perhiz sonrası semen örneği incelenir (48). Rutin semen analizinde volüm, renk, koku, pH, viskozite, likefaksiyon süresi gibi fiziksel

özelliklerin ve semenin ön mikroskopik incelenmesinin ardından sperm. konsantrasyonu, motilite ve morfolojik özellikler fonksiyonel parametreler açısından değerlendirme yapılmalıdır (49).

2.1.7.1. Volüm

WHO kriterlerine göre semen 2 ml-6 ml arasında olmalıdır. 6ml'den fazla olan semen hiperspermik, 1 ml ya da daha az ise hipospermik olarak isimlendirilir. Gebelik açısından her iki durumu da olması istenmez.

2.1.7.2. Renk

Normalde semen opak ve grimsi renktedir. Semen, eritrositlerin bulunması halinde ise kırmızı-kahverenkli dir.

2.1.7.3. Koku

Semenin kendine has bir kokusu vardır. Semen prostat bezinin salgıladığı sperminin oksidasyonundan dolayı "at kestanesi çiçeği" gibi benzer kokar.

2.1.7.4. pH

Normal semen pH'ı 7, 2-8 arasındadır. pH'ın 8'in üzerinde olduğu durumlar akut enfeksiyonu veya ölçümün geç yapıldığını gösterir. pH'ın 7'nin altında olduğu azoospermi olgularında boşaltma kanallarının obstrüksiyonu (tıkanıklığı), aksesuar bezlerin agenezisi, veziküla seminalisin kronik enfeksiyonları ve idrarın semene karıştığı düşünülmelidir (50).

2.1.7.5. Likefaksiyon (Semenin Çözünürlülüğü)

Ejakülasyon (menin boşaltılması) sırasında acıca olan, veziküla seminalisin salgıladığı "protein kinaz" enziminin etkisiyle "koagüle olan (pıhtılaşan)" semen 10-20 dakika içerisinde kendiliğinden eriyebilmeli, likefiye olmalıdır.

2.1.7.6. Viskozite

Normalde semen hafifçe visköz yani kıvamlıdır ve prostatit, vezikülit gibi kronik enfeksiyonlarda viskozite artmış olabilir.

2.1.8. Sperm Viabilitesi (Canlılığı)

Semen analizinde hareketli spermeler hareketsiz olanlarda gözlenebilir, ancak bunların oranı %25'den fazla olmamalıdır (51,52). Hareketsiz (immotil) spermeler canlı olabilir

ve canlılıkları ancak özel boyama yöntemiyle gösterilebilir, bu nedenle immotil sperm ölü spermler olarak kabul edilmemelidir. Boyama yöntemleriyle sperm. canlılığı belirlenir ve boyalı preparatlarda 100-200 sperm sayılarak yapılan değerlendirmelerde spermlerin %25 inden fazlası ölü ise nekrospermi olarak tanımlanır.

2.2. NORMAL SPERM

Normal kabul edilebilecek bir sperm hücresi üç kısımdan meydana gelmektedir: baş, orta kısım ve kuyruk. Baş, genetik materyali içermektedir. Orta kısım, sperm hareketi için gerekli enerjiyi, kuyruk kısmı ise sperm hareketini (motiliteyi) sağlar (53). Orta kısım silindir 0.5µm-1µm kalınlıkta, 7-8 µm uzunluğunda ve başa aksiyal olarak bağlanmalıdır. Kuyruk orta kısımdan biraz daha ince, kıvrımsız, düzgün biçimli ve yaklaşık 40-50 µm uzunluktadır.

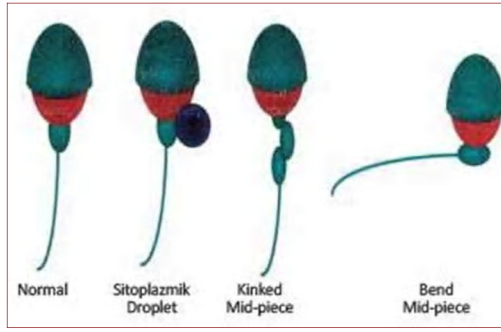
2.3. ANORMAL SPERM MORFOLOJİLERİ

Boyun ve orta kısım defektleri: Başın asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın ya da düzensiz olması, ince olması veya bunların kombinasyonu (55). (Şekil 2.6).

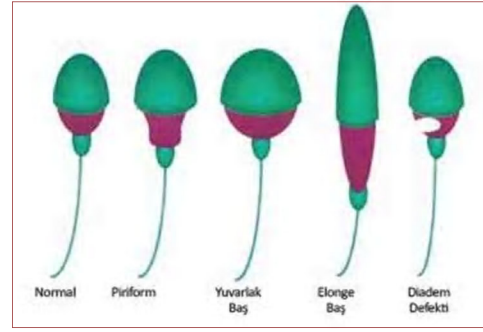
Baş defektleri: Büyük ya da küçük, konik, piriform, yuvarlak, amorf, vakuollü (>2'den fazla vakuol, vakuoler alan boyanması %20'den fazla), çift başlı veya bunların kombinasyonu (55). (Şekil 2.7).

Akrozomal Defektleri: Akrozomal içerik azalması, akrozomal içerik total kaybı, akrozomal membran anomalisi, akrozomal inkomplemt ayrılması ve akrozomal komplemt ayrılması (55). (Şekil 2.8).

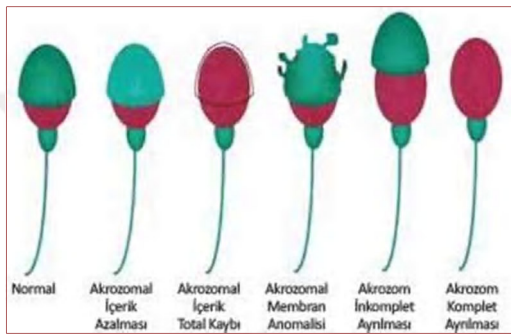
Kuyruk defektleri: Kısa, birden çok, kırık, keskin açılı düzensiz ve bunların kombinasyonları (55). (Şekil 2.9).



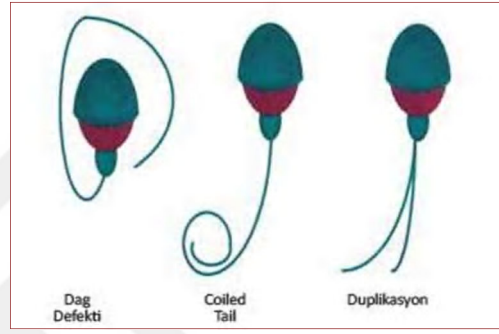
Şekil 2.6. Boyun bölgesi anomalileri (55).



Şekil 2.7. Çeşitli baş anomalileri (55).



Şekil 2.8. Akrozom defektleri (55).



Şekil 2.9. Kuyruk anomalileri (55).

BAŞ ŞEKİL ANOMALİLERİ

- a. **Piriform**; armut şeklinde olan spermlerdir.
- b. **Yuvarlak**; çoğunlukla akrozom yokluğu nedeniyle sperm başı yuvarlak şekil alır.
- c. **Pin-head**; sperm başı toplu iğne başı şeklindedir.
- d. **Diadem defekti**; sperm baş kısmı üzerinde yer alan çöküntü alanlarıdır.
- e. **Küçük Sperm başı**; tanımlanmakta olan boyutlardan daha ufaktır.
- f. **Büyük Sperm başı**; tanımlanmakta olan boyutlardan daha büyüktür.
- g. **Amorf**; sperm baş kısmının ovoid olmaması durumudur.
- h. **Tapered**; sperm baş kısmının uzun ve sivri olması durumudur.
- ı. **Yarık baş**; aynı sperm baş kısmının içinde birden fazla nükleus bulunması durumunda görülebilir.
- j. **Vaküol**; sperm baş kısmında boya almayan boşluklar vardır.

AKROZOM ANOMALİLERİ

a. Primer Akrozom anomalileri; spermin gelişmesi , diferansiyasyonu sırasında meydana gelen anomalilerdir.

b. Sekonder Akrozom anomaliler; sperm membranının dış etkenler, yaşlanma ya da harabiyetine bağlı olarak akrozom içeriğindeki kayıptır.

BOYUN VE MİD-PIECE DEFİKTİ ANAMOLİLERİ

a. Bend; kuyruğun tüm boyunun, başın uzun eksenine 90 ° aç yapmasıdır.

b. Kopuk baş; mide-piece kısmının tamamen yokluğunda olabilir.

c. Mide-piece konturlarının düzgün olmaması (şişme, düzensiz, kıvrık); enerjide (hareket için) azalmaya neden olabilir.

d. Sitoplazmik droplet (artık); immatürite(olgunlaşmama) işaretidir.

KUYRUK ANOMALİLERİ

Total motilite yokluğu veya non-progresif motilite şeklinde hareketlilik bozukluklarına yol açabilen defektlerdir (56-59).

2.3.1. Spermogram Yapılırken Çeşitli Sperm Parametrelerini İfade Eden Terimler

Normospermi: Sperm sayısının, hareketliliğinin, şeklinin normal olmasıdır.

Oligospermi: Sperm sayısının normal değerlerden düşük olmasıdır.

Astenospermi: Sperm hareketliliğinin normal değerlerden düşük olmasıdır.

Teratospermi: Normal şekilli sperm oranının normal değerlerden düşük olmasıdır.

Oligo-astenospermi: Sperm sayı ve hareketliliğinin normal değerlerden daha düşük olmasıdır.

Asteno-teratospermi: Sperm hareketliliği ve şeklinin normal değerlerden düşük olmasıdır.

Oligo-asteno-teratospermi: Sperm sayı, hareketlilik ve şeklinin normal değerlerden düşük olmasıdır.

Şiddetli oligo-asteno-teratospermi: Sperm sayısının 5 milyon/ml dan küçük olması aynı zamanda sperm hareketliliğinin düşük ve şeklinin anormal olmasıdır.

Azospermi: Semende hiç sperm bulunmamasıdır.

Virtual Azospermi (Kriptozoospermi): Kişiyeye ait bazı örneklerde çok az sayıda (<100 bin/ml) sperm saptanırken, bazı örneklerde ise hiç sperm görülmemesidir.

Total immotil sperm: Semendeki tüm spermelerin hareketsiz olmasıdır.

2.4. OBEZİTE

2.4.1. Obezite Tanımı

DSÖ tarafından sağlığı bozacak ölçüde vücutta aşırı yağ dokusu bulunması durumu olarak tanımlanan obezite, endokrin ve metabolik değişikliklerle karakterize, kompleks, multifaktöryel bir hastalıktır. Daha önceleri obezite güç ve refahın bir göstergesi olarak kabul edilirken günümüzde mutlaka tedavi edilmesi gereken bir hastalık olarak görülmektedir (60). Obezite multifaktöryel bir hastalıktır. Etiyolojisi tam olarak açığa kavuşturulamamış olmakla beraber iki büyük etkenin büyük rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar genetik eğilim ve çevresel etkilerdir (61). Genetik, yaş, cinsiyet ve hormonal etkiler belli ortamlarda kilo alınmasını kolaylaştırmaktadır. Ama çevresel faktörler olan sosyal, nutrisyonel, psikolojik ve fizyolojik nedenler obezite epidemisini yöneten asıl olay olarak karşımıza çıkmaktadır (62). Ana sorumlu pozitif enerji dengesidir, yani alınan enerji miktarının harcanan enerji miktarından daha fazla olmasıdır. Fazla enerji alınması ve daha az enerji tüketilmesi obezitenin temelini oluşturmaktadır (63). Obezite gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde epidemik boyutlara ulaşan ve prevalansı giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmakta, beraberinde getirdiği pek çok hastalıklarla bireylerin yaşam kalitesini azaltmakta ve ölümlere yol açmaktadır (64-66).

Erişkin yaş grubu obezite değerlendirmesinde en yaygın kullanılan ölçüm BKİ'dir (67). BKİ kolay ölçülebilen, güvenilir, vücut yağ kütlesi ve vücut yağ yüzdesi ile doğru ilişkili bir yöntemdir (68).

Beden Kitle İndeksi = (Vücut ağırlığı (kg) / Boy (m²))

BKİ, bireyin vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun (m cinsinden) karesine ($BKİ=kg/m^2$) bölünmesiyle elde edilen bir değerdir. DSÖ obeziteyi vücut kitle indeksinin 30 ve üzerinde olması olarak tanımlamaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.2. Dünya Sağlık Örgütüne göre obezite sınıflandırılması (69).

BKİ (kg/m²)	Vücut ağırlığının durumu
18.5'dan az	Zayıf
18.5-19.9	Normal kabul edilebilir
20-24.9	Normal
25-29.9	Fazla kilolu (Hafif şişman)
30-34.9	I. Derece Şişman
35-39.9	II. Derece Şişman
40 ve üzeri	III. Derece Şişman

2.4.2. Obezitenin Neden Olduğu Sağlık Sorunları

Obez kişilerde pek çok kronik hastalığın görülme sıklığı artmıştır. Obeziteye bağlı hastalıkların oluşturduğu problem total sağlık harcamalarının %3'ünü oluşturmaktadır. Obezite, eşlik eden hastalıklardan bağımsız olarak artmış mortalite nedenidir. Obez kişilerde eşlik eden başka hastalık olmaksızın yaşam beklentisi 5-20 yıl kısalmıştır (70). Obezite, her toplumun özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Dünya genelinde obezite görülme sıklığını etkileyen etmenler arasında; kalıtım, yaş, cinsiyet, beslenme alışkanlıkları yaşam tarzı alışkanlıkları, endokrin ve metabolik etkenler yer almaktadır. Ayrıca obezlerde depresyon, yeme bozuklukları, beden imajı algısına bağlı ruhsal sorunlar, uyku bozuklukları ve diyet komplikasyonları gibi psikososyal sorunlar görülmektedir (71).

2.4.2.1. Obezite ve İnfertilite

WHO her yıl 2.8 milyon insanın obezite nedeniyle hayatını kaybettiğini belirtmektedir. 2008 yılı verilerine göre 20 yaş ve üzeri bireylerden hafif şişman olma oranı erkeklerde

%34 olurken, bu oran kadınlarda %35; obez olma oranı ise erkeklerde %10 olmuştur. Dünya genelindeki obezite oranı 1998-2008 yılları arasında neredeyse iki kat artmıştır. Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması verilerine göre erkeklerin %20,5'i obez olarak saptanmıştır. İnfertilitenin sebepleri arasındaki dağılım genellikle şöyledir; erkeğe bağlı sebepler % 35-40, kadına bağlı sorunlar % 45-55, her ikisine de bağlı olarak gelişen problemler %15, açıklanamayan sebepler ise % 10-15 oranlarındadır (72). Obezitenin erkek üreme fonksiyonları üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Obez erkeklerde kilo artışına paralel olarak serumda seks hormon bağlayıcı globülin, serbest ve total testosteron düzeyleri ilerleyici olarak düşebilmektedir. Obezite kadınlarda birkaç yolla infertiliteye neden olabilmektedir. Bunlar; spontan ovulasyona, hamilelik fizyolojisine ve doğum üzerine olumsuz etki ederek olmaktadır. Destekleyici doğurganlık teknikleri üzerinde de obezitenin olumsuz etkileri bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada gösterilmiştir ki BKİ'nde 1 birimlik artış IVF ile gebelik olasılığını 0,84 oranında düşürmekte ve BKİ'deki her bir birimlik düşüş gebelik olasılığını 1,19 kat arttırmaktadır (73). Obez kadınların gebelikleri de normal kilolu kadınlara göre daha sorunlu olabilmektedir, örneğin obez kadınlarda düşük olasılığı artmaktadır (74).

Obezitenin yayılmasıyla toplum sağlığı için endişe oluşturan bir durumdur. Amerikan Tıp Birliği son dönemde obeziteyi bir hastalık olarak sınıflandırmıştır. Obeziteye bağlı bozukluklar incelenirken beden sağlığı üzerinde odaklansa da, veriler infertiliteye de neden olduğu yönündedir. Erkek BKİ androjen seviyeleriyle ters orantılı olduğu görülmüştür. Progresif motil sperm oranı Tip A fazla kilolu ve obez erkeklerde anlamlı olarak daha düşüktür. Diğer taraftan da, fazla kilolu ve obez erkeklerde istatistiksel olarak anlamlı yüksek Tip C motil sperm oranına sahiptir. Fazla kilolu ve obez erkeklerde ejakülat volümü ve sperm sayısı istatistiksel anlamlı olarak daha düşük çıktı. Diğer taraftan da fazla kilolu ve obez grupta motilite ile de ters ilişkilidir (75).

2.5. SPERM YÜZEY RESEPTÖRLERİ

Sperm-zona bağlanmasında önce postakrozomal bölgede bağlanma olmaktadır. Arkasından zonadaki oligosakkarid zincirlerinin etkisiyle zonaya bağlı sperm yüzey proteinleri postakrozomal bölgeden sperm başının konveks kenarına doğru göç etmektedir (76). Spermatozoanın yapısı ve fonksiyonları üzerinde önemli rolü bulunan sperm plazma membranı genel olarak diğer memeli hücre membranları ile benzerlik

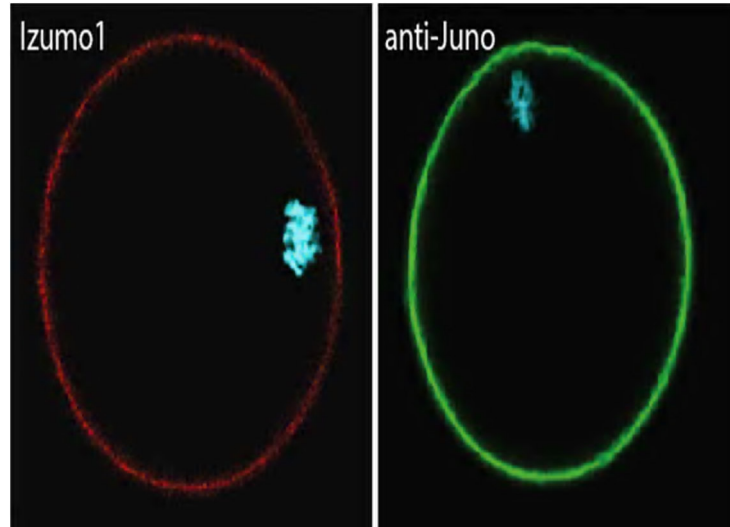
gösterir. Trübner ve arkadaşları sperm membran proteinleri ile ilgili geniş bir literatür taraması yapmıştır. Buna göre spermatozoa membranında spesifik antijenler (tirozin kinaz sp 95, proakrozin, PH-20, PH-30, sp 56, galaktoziltransferaz, spermadezinler, progesteron reseptörü) ve başka somatik dokularda da bulunabilen, hücre-hücre yada hücre-matriks etkileşimini yürüten nonspesifik proteinler, veya matriks proteinleri, (kollagen, fibronektin, laminin, adezyon molekülleri) olmak üzere iki grup madde yer alır (77). Sperm üzerinde hücre adezyon moleküllerinin özellikle integrinlerin gametlerin bağlanmasında önemli rolleri vardır. Adezyon moleküllerine ait patolojiler spermin fertilizasyon kapasitesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (78).

2.5.1. Izumo-1 Reseptörü

Sperm-yumurta füzyonu, fertilizasyonda kritik bir adımdır. Izumo, Inoue ve ark. tarafından tanımlanan immüoglobülin süper ailesinin (IgSF) yaklaşık olarak 56 KDa'lık testise özgü bir üyesi olarak tanımlanmaktadır (79-80). İzumo bir Ig (immunoglobulin) ve birde N-terminal alan bulundurur. Juno, İzumo'nun yumurtadaki reseptörüdür ve memelilerde fertilizasyonun gerçekleşmesi için gereklidir (Şekil 2.10). Bilindiği gibi fertilizasyon spermatozoon ve ovositin birbirini tanıması ve genotip olarak yeni bir organizmanın oluşması için bu iki hücrenin füzyonlarını gerektirir (81). Bu iki hücrenin birbirini tanıması hücre yüzey reseptör proteinlerine bağlıdır. IgSF ailesinin de bir üyesi olan ve Japonların düğün tapınağının adına itafen Izumo-1 adını verdikleri, spermatozoon yüzeyindeki bir reseptörün ovosit ile birleşmesinde temel bir molekül olduğu gösterilmiştir. Kısa süre önce yayınlanan, ovosit üzerindeki (Folr4'ün) folik asit reseptör 4 diğer aile üyelerinden farklı olarak folik asit mekanizmasında etkili olmadığını bunun yerine spermatozoonun yüzey reseptörüyle etkileşime girerek fertilizasyonda rol oynadığı gösterilmiştir. Daha sonra antik Roma'da evlilik ve doğurganlık tanrıçası olan "Juno" adını verdikleri Folr4, spermatozoon yüzeyindeki Izumo-1 ile etkileşime girmektedir. Yapılan bir çalışma, Izumo-1 rolünün zar etkileşimleriyle ilişkili olduğuna işaret eder (82). Izumo-1'in füzyon işlemi için gerçekten önemli bir faktör olarak işlev görüp görmediği, Izumo-1 nakavt farelerin üretilmesi ile cevap bulmuştur.

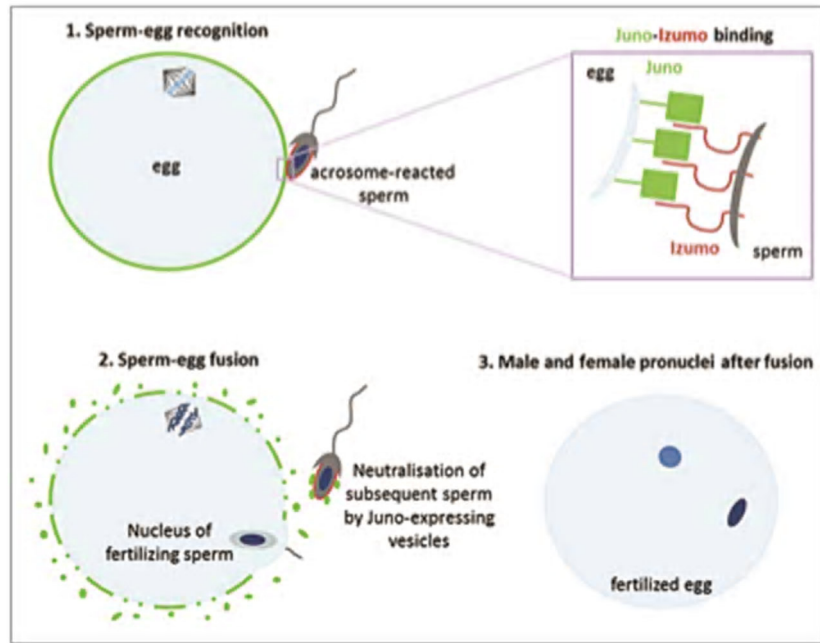
Izumo -/- fareler sağlıklıydı ve herhangi bir gelişimsel anormallik içermiyordu, ancak beklendiği gibi erkekler normal çiftleşme davranışına rağmen sterildi. Sperm, herhangi

bir sorun yaşamadan ZP'ye nüfuz etmiş ancak yumurtayla kaynaşmamış ve yumurta perivitellin alanına sperm birikmiş olduğu gösterilse de Izumo-1 proteininin kesin işlevi çözülmeye devam etmektedir (Şekil 2.10). Bunun yanı sıra Juno ve Izumo-1'in birbirlerine bağlanmasıyla polispermi bloğunun da gerçekleştiği ve böylece poliploid embriyoların oluşumuna engel olduğu da belirtilmektedir (83,84).



Şekil 2.11. Izumo-1 sperm yüzey reseptörü (84).

Fertilize olmamış bir ovosite işaretli (kırmızı sinyal) Izumo-1 proteini verildiğinde ovositteki reseptörüne bağlanarak ovositin etrafını sardığı izlenmektedir. Ovositler anti-Juno primer antikoru ile işaretlendiğinde de (yeşil sinyal) ovositin çevresini saran bir sinyal izlenmektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.12. Juno (yeşil) – izumo (kırmızı) bağlanması fertilizasyon için gereklidir ve polispermi için membranın bloke edilmesine katkıda bulunur. Fertilizasyonu takiben, Juno hızla yumurta zarından dökülür ve ardından gelen spermleri bağlayıp hızla nötralize edebilen poliploid embriyo oluşumunu önleyen veziküller halinde yeniden dağıtılır (84).

2.6. SPERM HÜCRELERİNDE DNA HASARI

Erkek infertilitesi kompleks bir hastalık olup, çeşitli patolojileri içermektedir. Memeli sperm kromatini yapı ve kompozisyon bakımından somatik hücrelerden farklıdır. Sperm kromatin yapısı erkek ve dişi üreme kanallarından geçerken, paternal genomun genetik bütünlüğünü koruyacak şekilde yapılanmıştır. Sperm DNA'sı spesifik küçük bazik proteinlerle, mitotik kromozomlardan en az 6 kat daha kondanse olacak şekilde paketlenmiştir. DNA hasarlı sperm örneğinde motilite anomalisine göre fertilizasyon oranının 9,5 kat düşük olması, ICSI seçimi sırasında motiliteden ziyade DNA hasarına sahip olmayan sperm seçiminin önemli olduğuna işaret etmektedir (85). Günümüzde normal değerlere sahip spermlerin DNA bütünlüğü bilinmemekte ve ICSI yöntemi ile bu tip spermlerin seçimi risk teşkil etmektedir (86,87). Birçok sperm morfoloji ve motilite anomalilerinin DNA hasarı ile ilişkili olduğu, hasarlı DNA'ya sahip spermın negatif fertilizasyon oranı gösterdiği embriyo kalitesini bozduğu ve artmış düşük oranına neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (88,89). Sperm kromatin anormalliklerinin sperm fonksiyonları üzerine etkisinin incelenmesi infertilite çalışmalarının alanlarından birini oluşturmaktadır. Sperm nükleer DNA hasarları ile

infertilite, gebelik oluşumu arasında birliktelik olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sperm DNA hasarlarının oluşumunda başlıca üç önemli mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan ilki matur spermde anormal kromatin paketlenmesi olup yapılan çalışmalarda sperm DNA hasarlarının çoğunun spermde anormal kromatin paketlenmesine bağlı olduğu gösterilmiştir (90). Sperm DNA hasarının görülmesine neden olan diğer mekanizma, spermatogenezis sırasında hasarlı germ hücresinin genetik havuzdan fonksiyonel olarak elimine olabildiği programlı hücre ölümü olan apoptozisten hasarlı DNA'ya sahip spermatozoanların kaçmasıdır. Üçüncü mekanizma ise kötü semen kalitesine eşlik eden, özellikle azalmış protaminasyon ve disülfid bağ yapımı varlığında reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesinin neden olduğu sperm DNA hasarıdır (91).

Bu çalışmada BKİ normal, fazla kilolu ve obez olan bireylerden alınan semen örneklerinde birbirleriyle karşılaştırmalı olarak, BKİ'nin sperm morfolojisi üzerine etkisi ile western blot metodu kullanılarak Izumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve yüksek BKİ'nin sperm DNA hasarı ile ilişkili olup olmadığı değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 20 Mart 2015 tarih ve 2015/153 no'lu kararı ile Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniği ve Histoloji-Embriyoloji AD. Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2015-6180 nolu proje kodu ile projelendirilmiştir.

3.1. ÖRNEKLERİN ELDESİ VE GRUPLARIN OLUŞTURULMASI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniği'ne başvuran hastalara çalışma ile ilgili ayrıntılı açıklama yapıp, 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' ile onayları alındı. Semen örnekleri 18 ile 35 yaş aralığında herhangi bir kronik veya metabolik rahatsızlığı olmayan bireylerden alındı. Çalışmada, hastalardan 2-3 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yolu ile elde edilen steril ve geniş ağızlı plastik kaplardaki semen örnekleri kullanıldı. Çalışmaya katılan bireylere verilen semen kabına hastanın adı, soyadı ve tarih yazılıp, semen verirken dikkat edilecek hususlar ve aynı zamanda bu bilgilerin bulunduğu yazılı bir form verildi. Belirgin hiçbir sağlık sorunu olmayan hastalardan alınan semen örnekleri hastanın BKİ değerlerine göre toplandı ve gruplar oluşturuldu. Bu çalışmaya dahil edilen gruplar aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

a) Normal (N=20); $18.5 \leq \text{BKİ} < 25 \text{ kg/m}^2$

b) Fazla Kilolu (N=19); $25 \leq \text{BKİ} < 30 \text{ kg/m}^2$

c) Obez (N=18); $\text{BKİ} \geq 30 \text{ kg / m}^2$

şeklinde toplamda 3 farklı grup oluşturulacak şekilde alındı.

Böylece, grup 1 normal kilolu erkekler (n=20), grup 2 fazla kilolu erkekler (n=19) ve grup 3 obez erkekler (n=18) şeklinde belirlendi.

3.2. SPERM ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Örnekler 37°C’de etüvde 1 saat inkübe edilerek likefiye olması sağlandı. Semen likefiye olma süresini tamamladıktan sonra WHO kriterlerine göre; sayı, motilite, volüm, pH ve morfoloji yönünden değerlendirilmek üzere ayrıldı (92). Mikroskopik olarak makler sayım kamerası (Şekil 3.1) kullanılarak sperm konsantrasyon ve motilitesi değerlendirildi (Şekil 3.2). Morfoloji için bir damla semen örneği (10 µl) lam üzerine damlatılıp yayılarak havada kurutuldu. Bunu takiben Diff Quik ile boyanarak değerlendirildi. Diff Quik androloji boyası ile sperm boyama işlemi yaklaşık olarak 15-20 dakika sürmektedir. Boya 1 fiksatif ve 2 boya solüsyonundan oluşmaktadır (93).

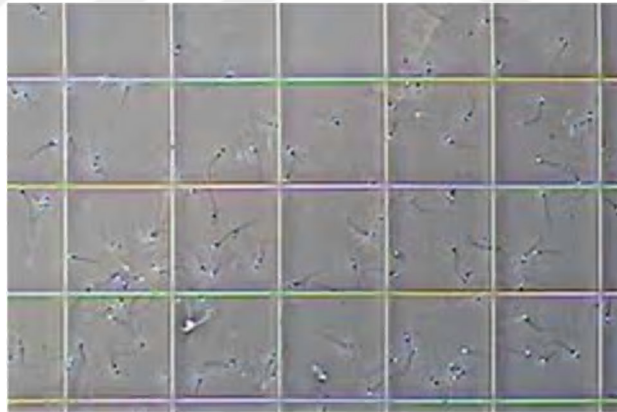
3.2.1. Diff Quik Boyama Yöntemi

1. Cam pastör pipeti ile ufak bir damla semen lam üzerine alındı ve daha sonra başka bir lam yardımıyla, ince ve homojen bir yayma yapıldı.
2. Hazırlanan yayma preparatı kuruması için açık havada ve oda ısısında 10-15 dakika bekletildi.
3. Daha sonra ilk olarak 2 saniye tutup 5 defa batırıp çıkararak fiksatif solüsyonuna bekletilir.
4. Fiksatif solüsyonundan çıkarılıp, 5 defa 2 saniye aralıklarla solüsyon 2’ye batırılıp çıkarıldı.
5. Solüsyon 2’den çıkarılan preparat solüsyon 3’e 5 defa 2 saniye aralıklarla olacak şekilde batırılıp çıkartıldı.
6. Son olarakta distile suya 5 defa 2 saniye aralıklarla batırıp çıkarıldı ve kurutma kağıdı kenarına lamın ucu dokundurularak suyu süzüldü.
7. Kurutma işlemi için oda ısısında 20 dakika bekletildi.
8. Değerlendirme, X100 büyütmede immersiyon yağı ve objektifi kullanılarak yapıldı.

Elde edilen preparatlar Olympus BX51 marka ışık mikroskobunda 100'lük objektifle incelendi ve görüntüler Olympus Camedia kamerayla fotoğraflanarak değerlendirmeye alındı.



Şekil 3.1. Makler kamerasının görünümü.



Şekil 3.2. Makler kamerasında alanlar ve spermelerin mikroskopta görünümü.

3.3. WESTERN BLOT YÖNTEMİ

Western blot, bir protein solüsyonunda aranan bir proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu anlamak için kullanılan bir yöntemdir. Bu metod, bir proteinin varlığını büyüklüğünü, konsantrasyon değişimlerini, farklı gruplararası konsantrasyonların karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Çalışmada, western blot işlemi için gruplara ait bireylerden alınan ejakulatta protein ekstraksiyonu yapıldı. Daha

sonra ekstraksiyonu yapılan proteinlerin konsantrasyonu Bradford tekniğiyle belirlendi. Proteinler uygun konsantrasyonlarda sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) yöntemiyle ayrıştırıldı ve western blot tekniğiyle PVDF membranlara 1 gece boyunca +4°C’de transfer edildi. Transfer işleminin bitmesinin ardından oda sıcaklığında 1 saat süreyle %5’lik skim milk kullanılarak bloke edildi. Bloklama işlemi spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla yapıldı. Bloklama işlemi bittikten sonra membran Izumo-1 antikoru ile bir gece +4°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından bağlanmayan primer antikolar uzaklaştırıldı ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında HPR bağlı sekonder antikor ile inkübe edildi. Bağlanmayan sekonder antikoların da uzaklaştırılması işlemi ardından aranan proteinler gösterildi. Western blot işleminden sonra elde edilen bantların yoğunluğuna göre Image J software programında değerleri alındı ve gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.

3.4. COMET YÖNTEMİYLE SPERMDE DNA HASARININ BELİRLENMESİ

Dilüe semen örnekleri 4 °C de 10 dakika 300 g de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan sperm örnekleri PBS ile yıkandı. Spermde DNA hasarı yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforez (comet) kullanılarak araştırıldı. Kısaca, her bir mikroskop lamı PBS de hazırlanmış % 1 lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, ilk katın üstüne 37 °C ’de % 0,7 lik düşük erime noktalı agarozun 100 µl ile 10 µl hücre süspansiyonu karıştırıldı ve birinci katın üzerine yayıldı. Lamalar 4 °C ’de buz aküsünün üzerinde 5 dakika katılaşmaya bırakıldı. Lameller lamlardan kaldırıldı, taze hazırlanmış soğuk lizis çözeltisinde (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100, %10 DMSO ve 40 mM dithiothreitol, pH:10) 1 saat 4 °C’ de lize edildi. Daha sonra lizis çözeltisine 100 µg/ml proteinase K (Sigma) eklenerek, lamalar 37 °C’ de bir gece inkübe edildi. Lamalar lizis çözeltisinden alındı, yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH: 13) ile dolduruldu ve lamalar yerleştirildi, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dakika bekletildi. 8 °C’da 12 V-250 mA’ de 20 dakika elektroforez uygulandı. Daha sonra lamalar alkali iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için nötralizasyon çözeltisi (0.4 M Tris, pH 7.5) ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra 50 µl ethidium bromide (1 µg/ml) le boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler DNA hasarını önlemek için karanlıkta uygulandı.

Görüntüler floresan mikroskop (Olympus BX51, Japan) kullanılarak 400x büyütmeyle çekildi. Rastgele seçilmiş 100 hücre görüntüsü Comet Assay Software Project (CASP-1.2.2, Windows 2010) programı ile analiz edildi. Hasar sperm başından göç etmiş, comete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyuksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü (94).

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler R Studio 3.2.2 programı ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. İki den fazla gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey ve Dunn Bonferroni kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniği'ne başvuran BKİ normal, fazla kilolu ve obez bireylerden alınan semen örnekleri üzerinde yapılmıştır. Böylece çalışmada, kontrol grubu (normal kilolu) dahil olmak üzere toplamda 3 grup değerlendirmeye alınmıştır.

4.1. SPERM MORFOLOJİ DEĞERLENDİRİLMESİ

4.1.1. Diff Quik Boyama

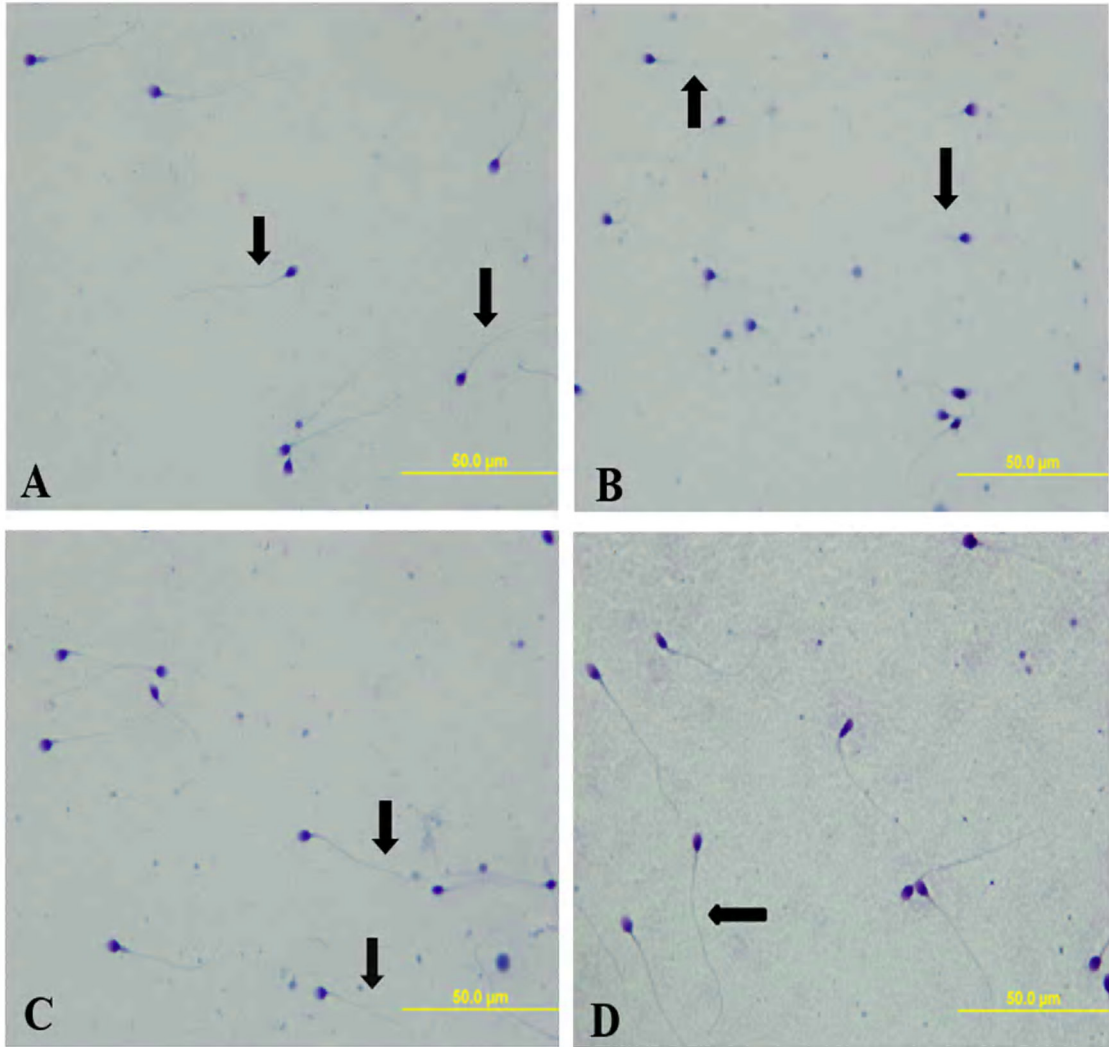
Mevcut çalışmada ilk olarak, BKİ değerlerinin sperm morfolojileri üzerine olası etkilerinin belirlenmesi amacıyla Diff Quik boyama metodu kullanılarak sperm morfolojilerine bakılmıştır. Buna göre, her üç deney grubunda da karşılaşılan bazı anomaliler açıklanmıştır. Farklı gruplara ait olan preparatlardan elde edilen görüntüler fotoğraflarla gösterilmiştir (Şekil 4.1). Sperm morfoloji anomalilerinin şiddetli olanları spermin dölleme kapasitesini değişik oranlarda olumsuz etkilemektedir. En önemli anomaliler büyük baş, yuvarlak baş ve kuyruğa ait anomalilerdir. Bu anomaliler, mevcut oldukları örneklerde yüksek oranda bulunmaları ve dolayısıyla normal sperm seçiminin çoğunlukla mümkün olamaması nedeniyle yüksek dölleme başarısızlığı gösterir.

Çalışmamızda, Diff Quik boyaması sonrası normozoospermik ($BKİ < 25 \text{ kg/m}^2$) örneklerde ($n=20$) ortalama sperm konsantrasyonu 15×10^6 /ml, sperm motilite oranı %75 ve normal morfolojiye sahip sperm oranı %36 olarak bulundu. Fazla kilolu bireylere ($BKİ < 30 \text{ kg/m}^2$) ait ejakulatlarda ($n=19$) ortalama sperm konsantrasyonu 12×10^6 /ml, sperm motilitesi %72 ve normal morfolojili sperm oranı %4 idi. Diff Quik boyaması sonrası obez bireylere ($BKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$) ait ejakulatta ($n=18$) ortalama sperm konsantrasyonu $9,4 \times 10^6$ /ml, sperm motilitesi %67 ve normal morfolojili sperm oranı

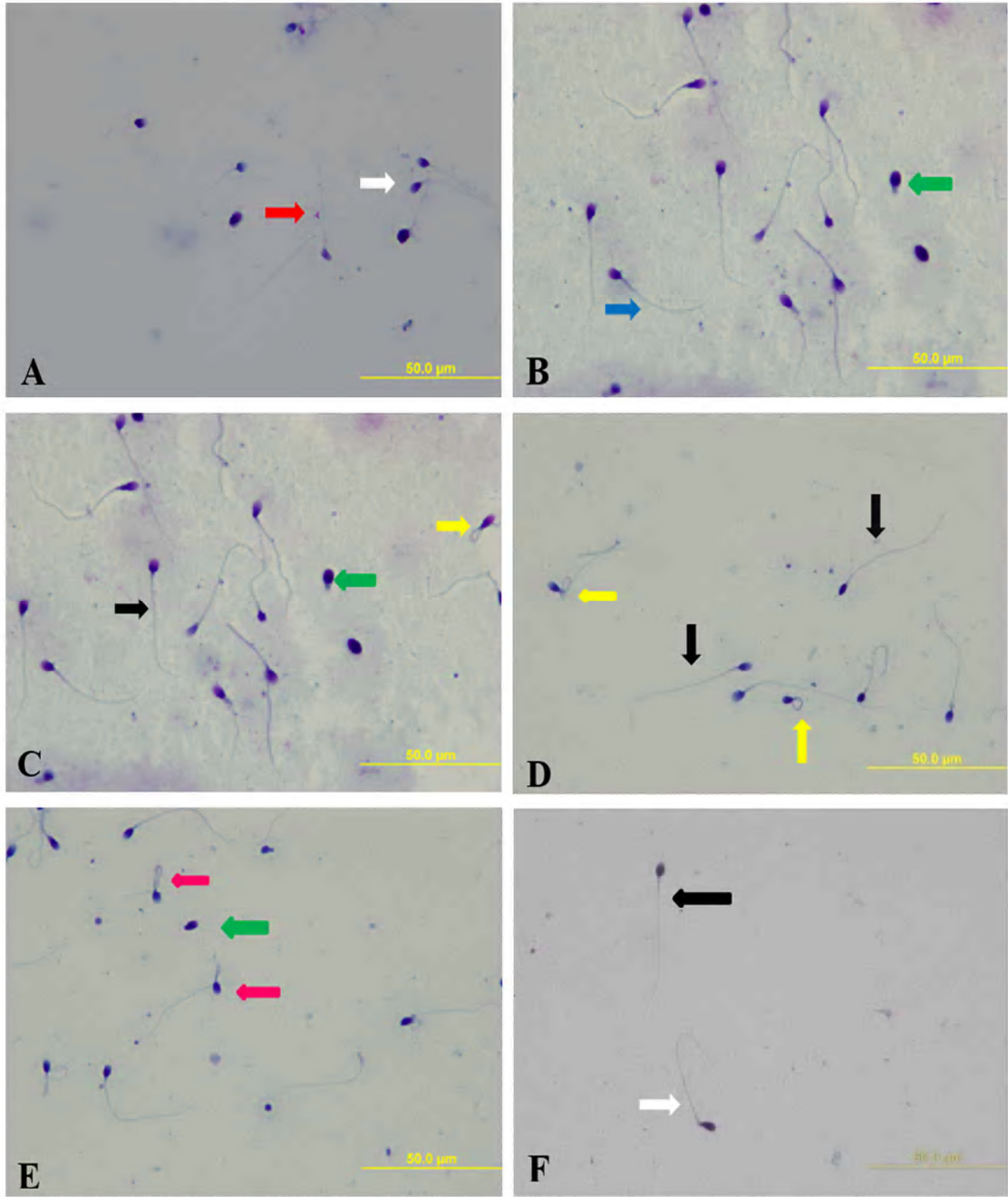
%3 olarak bulundu (Tablo 4.1). Çalışmada, Diff Quik boyama ile hazırlanan preparatlarda morfoloji anomalisine sahip spermelerin detaylı değerlendirilmesi sonucunda, ışık mikroskopi değerlendirilmesinde, sperm başı yapısındaki anomalilerin ve buna benzer birçok parametrenin obez hastalarda diğer gruplara göre çok olup fazla kilolu ve normal kilolulara doğru morfolojik hasarların azaldığını gözlemledik. Görüntüler ışık mikroskobunda x100'lük büyütmede değerlendirilerek ve en az 100 sperm hücresi üzerinde yapılarak elde edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Tablo 4.1. BKİ normal ve yüksek olan ejakulatların spermiyogram ve morfoloji sonuçlarının ortalama değerleri.

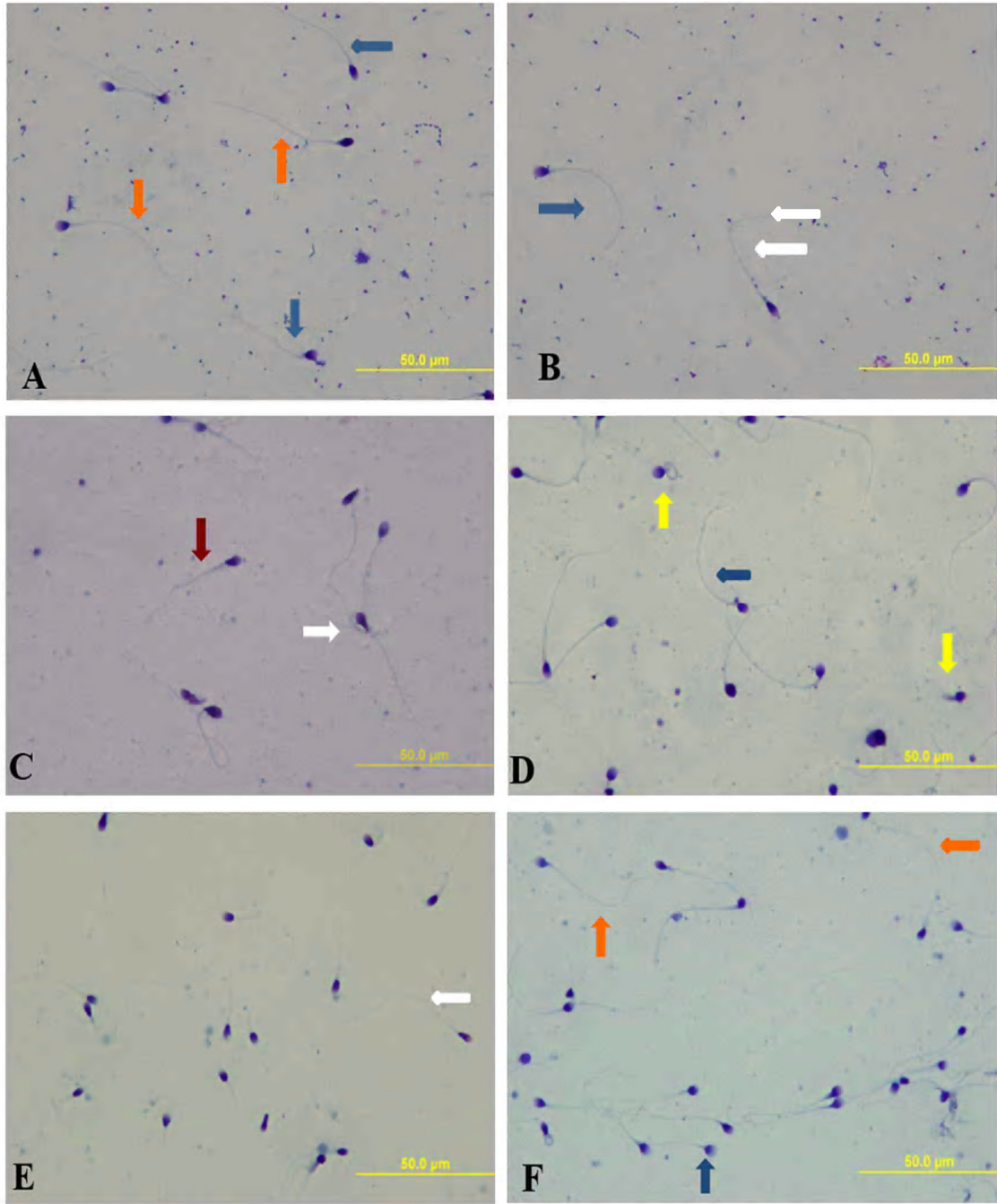
Gruplar	Sperm konsantrasyonu x10 ⁶ /ml	Total sperm x10 ⁶	Total motilite %	Total normal morfoloji	Baş anomalisi	Boyun anomalisi	Kuyruk anomalisi
Normal Kilolu	15	39	75	36	55	25	13
Fazla Kilolu	12	38	72	4	51	31	14
Obez	9,4	24	67	3	57	21	17



Şekil 4.1. BKİ normal bireylere ait sperm morfoloji resimleri **A:** Normal kilolu (Siyah ok: Normal sperm şekli), **B:** Normal kilolu (Siyah ok: Normal sperm şekli) **C:** Normal kilolu (Siyah ok: Normal sperm şekli) **D:** Normal kilolu (Siyah ok: Normal sperm şekli) X100



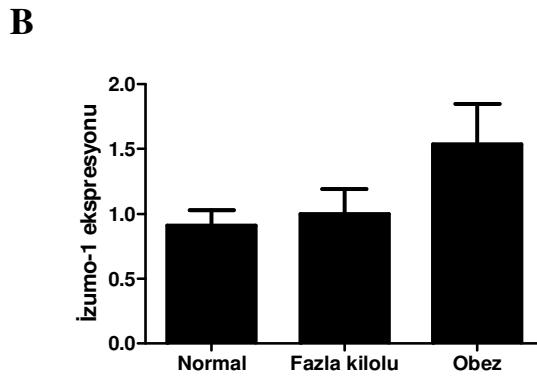
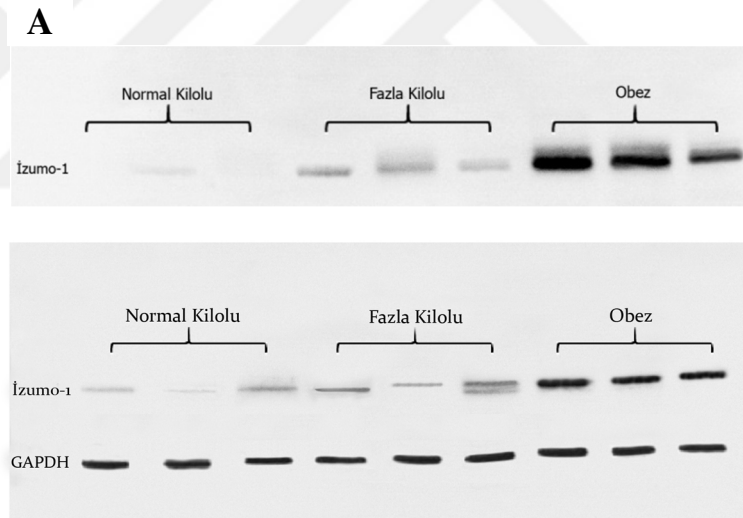
Şekil 4.2. BKİ Fazla kilolu bireylere ait sperm morfoloji resimleri **A:** Fazla kilolu (Kırmızı ok: Pin head, Beyaz ok: Armut baş) **B:** Fazla kilolu (Mavi ok: Abeksiyel implantasyon, Yeşil ok: Serbet) **C:** Fazla kilolu (Siyah ok: Normal sperm şekli, Yeşil ok: Serbest, Sarı ok: Dag defekti) **D:** Fazla kilolu (Siyah ok: Normal sperm şekli, Sarı ok: Dag defekti) **E:** Fazla kilolu (Pembe ok: Sarmal kuyruk, Yeşil ok: Serbest) **F:** Fazla kilolu (Siyah ok: Normal sperm şekli, Beyaz ok: Armut baş) X100



Şekil 4.3. BKİ obez bireylere ait sperm morfoloji resimleri **A:** Obez (Mavi ok: Abeksiyel implantasyon, Turuncu ok: Uzun kuyruk), **B:** Obez (Mavi ok: Abeksiyel implantasyon, Beyaz ok: Armut baş) **C:** Obez (Kahverengi ok: Mitokondriyal kayıp, Beyaz ok: Armut baş), **D:** Obez (Sarı ok: Dag defekti, Mavi ok: Abeksiyel implantasyon) **E:** Obez (Beyaz ok: Armut baş) **F:** Obez (Turuncu ok: Uzun kuyruk, Mavi ok: Abeksiyel implantasyon) X100

4.2. WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE IZUMO-1 SPERM YÜZEY RESEPTÖRÜNÜN EKSPRESYON DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmada, Izumo-1 sperm yüzey reseptörünün normal, fazla kilolu ve obez bireylerdeki ekspresyon düzeylerini western blot yöntemi kullanarak belirledik. Sonuçlarımıza göre, sperm yumurta füzyonunda görev alan Izumo-1 ekspresyonunun tüm gruplarda mevcut olduğu gözlemlendi. BKİ normal bireylerde Izumo-1 ekspresyonu BKİ yüksek olan bireylere göre daha düşüktü. En yüksek Izumo-1 ekspresyonu ise Obez grubunda gözlemlendi (Şekil 4.4). Fazla kilolu grubunda ise, sperm yüzey proteini olan Izumo-1 ekspresyonu ise, kontrole göre yüksek iken obez grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görüldü ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Böylece çalışmamızda, Izumo-1 ekspresyon artışının BKİ ile doğru orantılı olduğunu gösterdik.



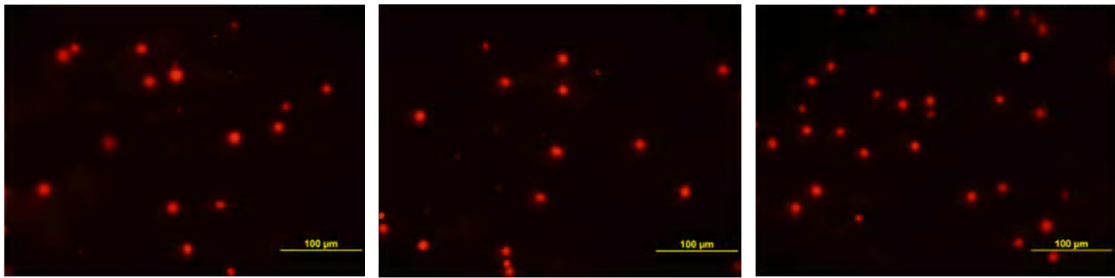
Şekil 4.4. A. BKİ normal, fazla kilolu ve obez gruplarına ait Izumo-1 protein bantları. **B.** Grafik; Izumo-1 protein ekspresyonunun gruplara göre dağılımı.

Tablo 4.2. Gruplara ait istatistiksel sonuçlar.

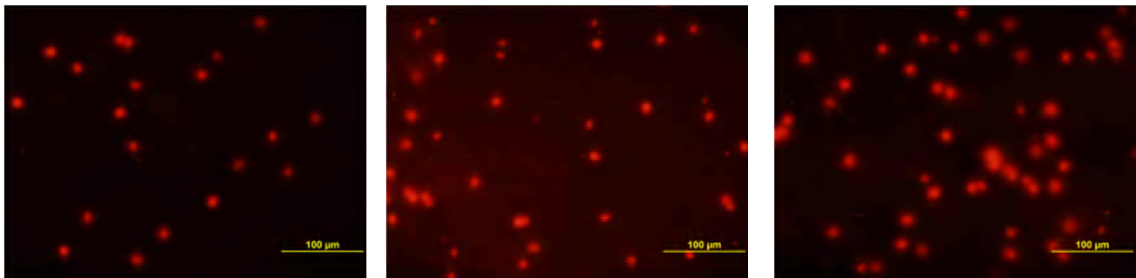
	Gruplar			<i>p</i>
	Normal	Fazla Kilolu	Obez	
Izumo-1	0.91±0.12	1.00±0.19	1.53±0.31	0.099

4.3. COMET YÖNTEMİ İLE DNA HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

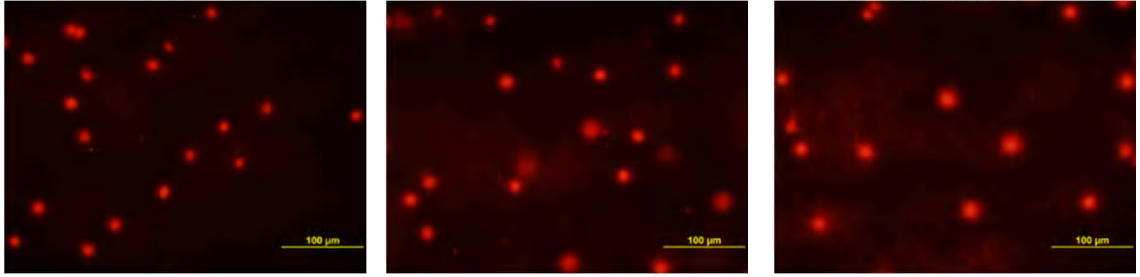
Çalışmada, BKİ değerlerinin sperm DNA hasarı üzerine olası etkileri de belirlendi. Mevcut çalışmada, sperm hücre DNA'sında meydana gelen kırıkları belirlemek için alkali comet yöntemi kullanıldı. BKİ normal, fazla kilolu ve obez bireylerden alınan sperm örneklerine ait tüm comet assay parametrelerinin sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Normal vücut ağırlığına sahip bireylerden alınan sperm örneklerinde (Şekil 4.5) DNA hasarı diğer tüm gruplara göre daha düşüktü ve gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 4.3) ($p < 0,001$). BKİ fazla kilolu grubuna (Şekil 4.6) ait sperm DNA hasarı ise, obez grubuna göre daha düşük iken kontrol grubuna göre ise daha yüksekti ($p < 0,001$). Çalışmada tüm comet assay parametrelerinin obez grubunda (Şekil 4.7) diğer gruplara göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Sonuçlarımız artan BKİ değerlerinin sperm DNA kalitesini olumsuz yönde etkilediğini gösterdi.



Şekil 4.5. Kontrol grubu Tail DNA % 2.53, şekil DNA hasarsız sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, BX51)



Şekil 4.6. Fazla kilolu grubu Tail DNA % 6.5, şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, BX51)



Şekil 4.7. Obez grubu Tail DNA % 10.47, şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, BX51)

Tablo 4.3. Comet assay parametrelerinin gruplararası istatistiksel analizi

Parametreler	Gruplar			<i>p</i>
	Normal	Fazla Kilolu	Obez	
Head comet	140.29±1.29 ^a	130.80±17.13 ^b	110.98±0.87 ^c	<0.001
T tail comet	17.88±0.65 ^a	36.24±0.93 ^b	40.65±0.88 ^c	<0.001
L comet	158.17±1.65 ^a	167.04±1.86 ^b	151.63±1.86 ^c	<0.001
Head DNA comet	97.46±0.08 ^a	93.50±0.16 ^b	89.5±0.24 ^c	<0.001
Tail DNA comet	2.54±0.08 ^a	6.50±0.16 ^b	10.5±0.24 ^c	<0.001
TM	0.30(0.10-0.60) ^a	2.0(1.2-3.0) ^b	4.0(3.0-6.0) ^c	<0.001
OTM	1.45±0.06 ^a	4.36±0.13 ^b	6.26±0.16 ^c	<0.001

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfertilite (kısırlık), herhangi bir korunma yöntemi uygulanmaksızın çiftlerin en az 1 yıl çocuk sahibi olamama durumu olarak tanımlanmaktadır. Bu çiftlerin büyük bir kısmında gebe kalamamanın nedenini açıklayacak sebepler bulunabilirken, yaklaşık % 10-12'sinde herhangi bir patoloji tespit edilemez. Bu çiftler açıklanamayan infertilite olarak adlandırılırlar. Hem kadın hem de erkekten kaynaklanan bir sorun olabilen infertilite, çocuk sahibi olma yaşındaki çiftlerin % 15'inde görülen bir halk sağlığı problemi olup olguların yaklaşık % 50'sinde erkek faktörler bulunmaktadır (95). Birçok sağlık sorununda olduğu gibi infertilite de yaşam tarzından ve bireysel özelliklerden etkilenmektedir. Vücuda besin yolu ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olması durumunda, vücut yağ kitlesinin yağsız vücut kitlesine oranla artması ile karakterize bir hastalık olan obezite bu sağlık sorunlarının başında gelmektedir (96). Özellikle gelişmiş batı ülkelerinde obezite sıklığı yüksek olup günümüzde pandemik bir sorun haline gelmiş modern hayatın olumsuz yönde getirilerinin başında gelmektedir ve sağlık açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Dünya genelinde obezite prevalansı 1980'den beri iki katına çıktığı bilinmektedir (97). Erkek üreme fonksiyonları üzerine etkileri incelendiğinde, obezitenin hipogonadizm, sperm üretimi ve aynı zamanda erektil disfonksiyona neden olabilen etkileri de dahil olmak üzere birden fazla mekanizma yoluyla erkek doğurganlığını olumsuz etkilediği görülür. IVF ve ICSI analizlerinin sonuçları, sağlıklı BKİ ile karşılaştırıldığında obez erkeklerde embriyo transferi başına canlı doğum oranlarının daha düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca, IVF sonrası gebelik kaybı riskinin fazla olmasının olası bir mekanizmasının da muhtemelen artan sperm DNA fragmantasyonu olduğu düşünülmektedir (98). Biz çalışmamızda; erkek kısırlığına sebep olabilen obezitede genel sperm analizinin değerlendirilmesinin yanı sıra normal kilolu, fazla kilolu ve obez bireylerden elde edilen semen örneklerinde bir sperm-yumurta füzyon proteini olarak bilinen Izumo-1 sperm yüzey reseptörünün

ekspresyon düzeylerini karşılaştırmayı ve aynı gruplarda alkali comet metodu kullanarak sperm DNA hasarına dair bilgiler elde etmeyi amaçladık.

Semen analizi, bir erkeğin üreme potansiyelini belirlemek için kullanılan başlıca testlerden biridir. Eğer erkeğin üreme potansiyeli ile ilgili herhangi bir sorun varsa, semen analizi sayesinde nasıl bir tedavi yöntemi izleneceği ile ilgili de bilgi sahibi olunabilmektedir. Semen analizinde semen ve sperm ile ilgili birçok parametre değerlendirilmektedir. Bir semen analizi 2-3 hafta arayla en az iki örnekte değerlendirilmelidir. Çünkü sperm sayısı ve semen yoğunluğu günden güne değişebilmektedir ve bazı koşullar sperm seviyelerini etkileyebilmektedir. Sperm analizi sonucunda birçok parametreye bakılmaktadır. Bunlar sperm morfolojisi, sperm konsantrasyonu, motilite, vitalite (spermin canlılığı) gibi parametrelerdir. Sperm morfolojisinin incelenmesinin, spermatogenez kalitesi ve fertilitenin duyarlı bir göstergesi olduğu ortaya konulmuştur. Yakın zamanlarda Amerika Ulusal Çevresel Sağlık Bilimleri Enstitüsünce (AUCSE) yürütülen çalışmalar, artmış BKİ'si bulunan erkeklerin kısır olma olasılıkları, normal kilodaki erkeklerden önemli ölçüde daha fazla olduğunu doğrulamaktadır. AUCSE verileri bir erkeğin kilosundaki yaklaşık 10 kg'lık artış, kısırılık olasılığını %10 kadar artırabileceğini öne sürmektedir (99,100). İnfertilite konusunda yapılan çalışmalarda erkeklerde BKİ'nin artışı infertilite görülme oranını arttırabilmektedir. Erkek obezitenin sperm parametreleri (sayı, motilite ve morfoloji) üzerindeki etkisi, hem insan hemde hayvan modellerinde gösterilmiştir. Kemirgenlerde diyetle indüklenen obezitenin, sperm hareketliliğini, epididimaldeki artışlarla birlikte sperm sayısını azalttığı ve normal morfolojiye sahip sperm yüzdesini düşürdüğü gösterilmiştir (101). Ancak bir çalışmada, 16 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenmenin sperm motilitesi üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını gösteren bir çalışma da mevcuttur (102). Çalışmada, bu durumun serum kolesterol düzeyindeki artışın az olması ile açıklamışlardır. Bazı çalışmalarda BKİ ile sperm konsantrasyonu arasında anlamlı ilişkinin olmadığı gösterilmiştir (103). MacDonald ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları bir meta analizde de BKİ ile sperm konsantrasyonu ve sperm sayısı arasında ilişki bulunmadığı belirtilmektedir (71). Sperm morfolojisinin kesin kriterler ile değerlendirilmesinin fertilizasyon şansını tahmin etmede son derece önemli olduğu ve fertilizasyon ile anlamlı bir pozitif korelasyon gösterdiği çok sayıda çalışmada vurgulanmıştır. BKİ>25 kg/m² olanların %22'sinde sperm konsantrasyon ve

sayısı normal bireylere göre düşük olduğunu saptamıştır (104,105). Akamine ve ark. çalışmalarında; ratları 120 veya 180 gün boyunca yüksek yağ içeren diyetle beslenerek insülin direnci oluşturmuşlardır. Çalışma sonunda insülin direnci artmış obez ratlarda infertiliteye yatkınlık da artmıştır. Fernandez ve ark., wistar ratları iki gruba ayırmış, 1. gruba yüksek yağ içeren diyet, 2. gruba standart yem 15, 30 ve 45. haftalar boyunca vermişlerdir. 15 hafta ratların obez olması için yeterli olmuştur. Çalışmada, obez ratlarda sperm kalitesi ve motilitesi düşerken, estradiol seviyesi artmıştır (106). Martini ve ark, 34.9 ± 0.2 yaş ortalamasına sahip 794 erkek hasta üzerine yaptıkları çalışmada ise; BKİ ile sperm motilitesi ve hızı arasında negatif bir ilişki bulunmuştur (107). Bütün bu çalışmalar obezite ve infertilite ilişkisinin olduğunu göstermektedir. Biz çalışmamızda, normal, fazla kilolu ve obez bireylerden elde edilen semen örneklerinde ilk olarak sperm analizlerine baktık. Çalışmamızda, literatürdeki çoğu çalışmaya paralel olarak normal kilolu bireylere ait örneklerde ortalama sperm konsantrasyonu, sperm motilite oranı ve normal morfolojiye sahip sperm oranları BKİ yüksek olan bireyler ile karşılaştırıldığında normal kilolu bireylerde (BKİ<25 kg/m²) daha yüksek olduğu gözlemlendi. Buna rağmen BKİ yükseldikçe bu değerlerin düştüğü ve obez grubuna ait sperm kalitesinin daha da azaldığı belirlendi. Şişman erkeklerde sperm kalitesinde düşüklükler olduğu benzer çalışmalar ile tespit edilmiştir. Normalde erkeklerde yağ dokusundan östrojen hormonu az miktarda salgılanmaktadır. Obez erkeklerde yağ dokusunda testosteronun östrojene dönüşmesi artar ve dolayısıyla testosteron azalır ve buna bağlı olarak da sperm kalitesi düşer. Sperm morfolojisi ve motilite anomalilerinin obezite ile ilişkili olduğunu hasarlı DNA'ya sahip spermin fertilizasyon oranını negatif yönde etkilediği embriyo gelişim kalitesini bozduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (108).

Mevcut literatür çalışmalarına ve bizim sonuçlarımıza göre, BKİ daha yüksek olanlarda daha fazla riskin olduğu anlaşılmaktadır (109,110). Örneğin, Magnusdottir ve arkadaşlarının çalışmalarında, 72 çiftin incelenmesi sonrası BKİ'nin 30 kg/m² ve üzerinde olmasının subfertilite riskini yaklaşık 3 kat arttırdığı saptanmıştır. Benzer sonuçlar pek çok çalışmada bildirilmiştir (111). Bunun yanı sıra her iki eşin obez olmasının tek bir eşin obez olmasına göre infertilite riskini daha fazla arttırdığı da belirtilmiştir (112). Literatür analizlerine göre obezite infertilite ilişkisinin daha az incelendiği anlaşılmaktadır. Shalaby ve arkadaşlarının çalışmalarında yüksek kolesterol

ile beslenen ratlarda kontrol grubuna göre fertilité oranlarının azaldığı, sperm karakteristk özelliklerinin ise bozulduğu gösterilmiştir (113).

Trübner ve ark. sperm membran proteinleri ile ilgili geniş bir literatür taraması yapmıştır. Buna göre spermatozoa membranında hücre-hücre ya da hücre-matriks etkileşimini yürüten spesifik antijenler ve nonspesifik proteinler veya matriks proteinlerinin (kollagen, fibronektin, laminin, adezyon molekülleri) bulunduğu gösterilmiştir. Sperm membranında, fertilizasyon için birçok sperm yüzey reseptörü görev almaktadır. Bunlardan biri olan ve çalışmamızda da ele aldığımız Izumo-1 sperm yüzey reseptörü IgSF ailesine ait bir transmembran proteindir. Western blot analizleri Izumo'nun hem testis hem de spermde eksprese olduğunu göstermiştir. Fare ve insanlarda, Izumo-1'in sperm zarı üzerindeki bir moleküler kompleksi organize ederek veya stabilize ederek gamete füzyonu için gerekli olduğu bilinmektedir. Nakavt fare modellerinin oluşturulması, döllenmede rol oynadığı tahmin edilen proteinlerin fonksiyonel önemini test etmek için güçlü bir araç sağlamaktadır. Izumo-1 nakavt farelerle yapılan çalışmada, sperm-yumurta füzyonunun gerçekleşmediği ve bu farelerin steril olduğu belirtilmiştir. Yapılan son çalışmalarda Izumo-1'in gamete füzyonu için kesinlikle şart olduğu gösterilse de, Izumo-1'in moleküler fonksiyonu ve diğer sperm proteinleri ile olan ilişkisi, yapısı ya da farklı sperm membranlarındaki ifadesi hakkında yetersiz bilgi bulunmaktadır. Literatüre baktığımızda, BKİ ile sperm hücrelerinde Izumo-1 ekspresyon düzeylerini gösteren yeterli çalışmanın bulunmadığı görülmektedir.

Biz çalışmamızda, sperm-yumurta füzyonunda önemli olduğundan dolayı henüz yeni keşfedilen Izumo-1 sperm yüzey reseptörünün normal, fazla kilolu ve obez bireylerdeki ekspresyon düzeylerine de baktık ve Izumo-1'in farklı BKİ değerlerine sahip tüm gruplarda eksprese olduğunu gösterdik. Western blot yöntemini kullanarak elde ettiğimiz verilere göre, normal ve fazla kilolu bireyler ile karşılaştırıldığında en yüksek Izumo-1 ekspresyonunun obez ($BKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$) grubuna ait bireylerde olduğunu gösterdik. Çalışmamızdan elde edilen veriler her ne kadar Izumo-1 ekspresyon artışının BKİ ile doğru orantılı olduğunu gösterse de sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak, bu sonuçlara göre obezitenin spermde bulunan membran proteinlerinin kompozisyonunu da değiştirdiği söylenebilir.

Cooper ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada sperm parametreleri ve sperm kromozom anomalileri arasında anlamlı bir bağlantı olduğu ve düşük kalitede sperm parametreleri bulunan olgularda sperm kromozom anomalisi oranının, normal donörler ile karşılaştırıldığında 2-10 kat yüksek olarak saptandığı rapor edilmiştir (114). Bu nedenle sperm sayısı normal kabul edilen olgularda daha az sperm kromozom anomalisi gözlenmiştir. DNA fragmantasyonu var ise kaliteli bir embriyo elde edilemeyebilir. Bu nedenle, başarısız IVF denemelerini en aza indirmek ve gebelik oranlarını artırmak için araştırmalar yapılmalıdır. Bu araştırmalar esnasında hasta için kromozom ve genetik kusurların erken embriyogenetik iletim riskini belirlemek esastır. Hasarın belirsizliği, doğurganlığın karmaşık yapısı, bizi belirsizliğe götürse de erkek faktörünün infertilite üzerindeki etkisi bakımından DNA hasarı testleri klinik açıdan önemlidir (115).

İnfertil erkeklerin spermleri kullanılarak gerçekleştirilen ICSI gibi IVF sonrası oluşan gebelik sonuçları, bu kromozom anomalilerinin büyük kısmının paternal kaynaklı olduğunu göstermiştir (116,117). Sperm parametrelerindeki anormallikler sperm anöploidileri ile ilişkilendirilmektedir (118). Sperm morfoloji bozukluğu ne derece şiddetli ise fertilizasyon oranları da o derece azalmaktadır. IVF yöntemlerinde başarıyı etkileyen faktörler araştırıldığında sperm motilitesi ve morfolojik özelliklerinin infertilite sebebini belirlemede yetersiz olduğu açıklanmıştır. DNA hasarlı sperm örneğinde fertilizasyon oranının, motilite anomalisine göre 9,5 kat düşük olması, motiliteye dayanan seçimden ziyade DNA hasarına sahip olmayan sperm seçiminin önemine işaret etmektedir. Yapılan çalışmalarda normal sperm morfolojisi ile DNA fragmantasyon derecesi arasında negatif bir ilişki olduğu saptanmıştır (119). Yüksek oranda baş anomalisi gösteren, özellikle yüksek amorf başlı sperm yüzdesine sahip örneklerde artan derecede DNA fragmantasyonu (DNA bütünlüğünün bozulması) saptanmıştır (120). Bu durum, anormal sperm baş morfolojisinin sperm DNA hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir (121).

Sperm DNA hasarının infertil erkeklerde fertil erkeklere oranla daha fazla görüldüğü ve sperm DNA hasarının bu hastalarda fertilite potansiyelini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (122). Sperm DNA hasarı infertil erkeklerde daha sık görülmektedir ve DNA fragmantasyon oranı arttıkça fertilite bozulmaktadır (123). Böylece, erkek infertilitesinin önemli bir sebebi olan DNA hasarının fertilite potansiyelini tahmin

etmede faydalı bir gösterge olduğu ve IVF’te başarının düşmesine sebep olduğu genel olarak kabul edilen bir görüştür.

Obezite, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalık ve proinflamatuvar bir durum olmak üzere birtakım kronik hastalıklarla ilişkilidir. İlginç olarak, metabolik sendrom, hiperlipidemi ve proinflamatuvar bir durumun hepsi erkek subfertilitesi ile bağımsız olarak bağlantılıdır (124) . BKİ yüksek veya çok yüksek olması, özellikle de seminal sperm konsantrasyonundaki azalmalara ilişkin sperm kalitesindeki bozulmalarına neden olduğu vurgulanmıştır (125). Obez kişilerde muhtemelen oksidatif stres nedeniyle sperm DNA bütünlüğü hasarının arttığı bilinmektedir (126). Literatürde, obez erkeklerde DNA kırılma oranlarının arttığı bildirilmiştir. Sallmen ve arkadaşları BKİ artışının ile DNA kırılmalarını arttırdığını buna karşın motilitenin azaldığını saptamışlardır (127). Bu durumun kötü kaliteli spermatogenez ve dolayısı ile azalmış sperm sayısı ve azalmış motilite ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Sperm nükleer kromatin anormallikleri veya DNA hasarı, spermatogenezde ya da DNA’nın paketlenmesinden kaynaklanabilir (128,129). Oosit ve zigot paternal genomdaki hasarı bir dereceye kadar onarabilme yeteneğine sahip olmakla birlikte DNA çift zincir kırıklarının onarımı güçleşmekte ve bu durum embriyo gelişimini etkilemektedir (130). Bu nedenle fertilize olabilen ancak implantasyon başarısızlığı veya erken dönem düşüklerinin görüldüğü durumlarda sperm DNA’sı önem taşımaktadır (131).

Az sayıda çalışma, BKİ’nin sperm DNA bütünlüğü üzerindeki etkisini değerlendirmiş olup, araştırılan vakaların sayısının düşük olması ve kullanılan teknikler arasındaki farklılık nedeniyle tartışmalı sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle son yıllarda spermdeki DNA hasarını belirlemede birçok yöntem kullanılmaktadır. Comet metodu, uygulanabilirliğinin basit ve duyarlı olmasının yanı sıra, radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Bizde çalışmamızda, BKİ normal, fazla kilolu ve obez olan bireylerde BKİ’nin DNA bütünlüğü üzerine olası etkisini belirlemek amacıyla alkali comet assay yöntemini kullandık. Çalışmada elde ettiğimiz veriler, en yüksek comet parametrelerinin obez bireylere ait olan semen örneklerinde olduğunu gösterdi. Buna rağmen, BKİ normal bireylerde comet parametreleri diğer iki gruba göre daha düşüktü ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktaydı.

Obezitenin spermatogenez üzerindeki etkisi ve sonraki nesiller için potansiyel etkileri hakkındaki ilgili araştırmaların klinik ve deneysel anlamda giderek artan oranlarda ortaya çıktığı görülmektedir. Ancak bilinen o ki, normal DNA yapısına sahip sperm, fertilizasyonun sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi ve sağlıklı bir embriyo gelişimi için gereklidir. DNA fragmantasyonuna sahip olan spermiler ile döllenen embriyoların gelişimini etkileyeceğinden DNA yapısının bütünlüğünün korunması IVF’de önemlidir. Obezitenin sperm üzerindeki etkilerini nasıl ortaya çıkardığını belirlemeye uğraşan birçok çalışma halen devam etmektedir. Çalışmamız, mevcut literatür hakkında bir güncelleme sağlayarak obezitenin hem sperm fonksiyonları ve hem de sperm DNA bütünlüğünün bozulmasına neden olduğunu göstererek bazı tartışmalar sunmaktadır. Mevcut çalışmada, erkeklerde obezitenin erkek subfertilitesi ile ilişkili olduğunu, obezite sonucunda sperm fonksiyonundaki bu değişikliklerin obez erkeklerin çocuklarının sağlığını da etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Tüm bu veriler beraber değerlendirildiğinde elde edilen bulgular ile klinik olarak riskli gruba giren bireyin sağlıklı bir bebeğe sahip olma şansı hakkında bir risk belirleme ön görülebilecektir. Çalışmamıza ilaveten daha fazla hasta popülasyonları ile yapılan yeni çalışmaların üreme bozuklukları tedavisinde ilerleme kat edilmesini sağlayarak bu konuya açıklık getireceği ve tüp bebek merkezlerinin başarı yüzdelerine önemli ölçüde katkı sağlayabileceği düşüncesindeyiz. Elde edilen bulgular, erkek obezitesinin doğurganlık üzerindeki etkilerinin birçok nedene bağlı olabileceğini, gebelik hatta daha sonraki evrede çocuk sağlığını dahi etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, Western blot analizi ile elde edilen veriler ışığında çalışmamızda henüz çok güncel olan Izumo-1 ekspresyon düzeylerinin gruptaki örnek sayısının az olmasına rağmen, bir başlangıç olarak diğer çalışmalara ışık tutması, sonuçların diğer çalışmalarla karşılaştırılması ve değerlendirilmesi gerektiği kanısındayız. Artmış BKİ’nin sperm moleküler yapısını değerlendiren gelecek çalışmalar, yağlanmanın artmış sperm fonksiyonu üzerindeki etkisini belirlemede yardımcı olmasının yanı sıra klinikte BKİ’nin ötesine bakılması gerektiğini gösterir. Böylelikle sperm morfolojilerinin anlaşılması, tedavinin yönlendirilmesi, IVF sırasında sperm seçimi ve değerlendirmesi için önceden elde edilecek bilgilerle üremeye yardımcı tedavi tekniklerine yarar sağlanacaktır.

Sonuç olarak BKİ ile erkek infertilitesi ve bununla ilişkili olan sperm morfolojisi ve ya sperm DNA hasarı ilişkisi ile ilgili klinik ve deneysel araştırmalar git gide artmaktadır. Bizim çalışmamızın sonuçları, BKİ'nin artış seviyesi, sperm fonksiyonlarının bozulma oranlarını paralel olarak etkilendiğini göstermiştir. Bunun yanı sıra henüz yeni keşfedilen ve sperm-oosit füzyonunda gerekli olan Izumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyonunda da artış olduğu gözlenmiştir. Obezite ve beraberinde gelen moleküler komplikasyonların patogeneğinde rolü olan faktörlerin aydınlatılması ve bilinen risk faktörleri ile ilişkisinin belirlenmesi yeni tedavi yollarının geliştirilmesinde önemlidir. Bu nedenle başta deneysel araştırmalar olmak üzere gebelik oranlarını da içeren klinik çalışmalarla bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

6.KAYNAKLAR

1. Erdemir F. The evaluation of the relationship between obesity and male infertility. *J Clin Anal Med* 2013; 4: 76-82
2. Krishnamoorthy U, Schram CM, Hill SR. Maternal obesity in pregnancy: is it time for meaningful research to inform preventive and management strategies? *BJOG* 2006; 113: 1134-1140
3. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 24: 683-689
4. Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme (1. Baskı), Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara, 2002: 231-244
5. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil.* 2010; 13: 189-193
6. Agarwal A, Allameneni SSR. The effect of sperm DNA damage in assisted reproduction outcomes. *Mineva Ginecologia* 2004; 56: 235-245
7. Klinovska K, Sebkova N and Hortova KD. Sperm-egg fusion: A molecular enigma of mammalian reproduction. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 10652-10668
8. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji (7. Baskı), (Çeviri: Başaklar AC), Palme Yayıncılık, Ankara, 1996: 274-275
9. Okuda H, Tsijimura A, Irie S, et al. A single nucleotide polymorphism within the novel sex-linked testis-specific retrotransposed PGAM4 gene influences human male infertility *PLoS One* 2012; 7:351-359

10. Colaci DS, Afeiche M, Gaskins AJ, et al. Men's body mass index in relation to embryo quality and clinical outcomes in couples undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2012; 98: 1193-1199
11. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi (3. Baskı), Feryal Matbaası, Ankara, 1998: 346-350
12. Garter LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology (Second Ed)*, WB Saunders Company, Philadelphia, 2001: 487- 508
13. Moore KL. *The Developing human*. 4th ed. Saunders Co, Philadelphia, 1998: 262-268
14. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*, (Eds.), Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapbevleri, Ankara, 2006: 431-438
15. Sadler TW. *Langman Medikal Embriyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2005: 52-59
16. Moore KL. *The developing human clinically oriented embryology, the beginning of human development: first week (Seventh Edition)*, Saunders Co, Philadelphia, 2008: 15-41
17. Özdamar S, Çetin N, Sorkun H. *Genel Embriyoloji*, E.Ü.T.F Yayınları, Kayseri 2002: 4-15
18. Aydos K. *Erkek İnfertilitesi. Temel Üroloji Kitabı (Üçüncü Baskı)*, Editörler: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2007: 989-992
19. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Türk Ürol Sem*, 2011; 2:11-17
20. Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas (4th Ed)*, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011: 784-816
21. Erkoçak A. *Özel Histoloji, Genital Sistem (2. Baskı)*, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara, 1990: 166-194
22. De Jonge CJ, Barratt C. *The Sperm Cell, Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press, Cambridge, 2006: 1-25
23. Freund M. Standards for the rating of human sperm morphology. A co-operative study. *Int J Fertil* 1996; 11: 97-180

24. David G, Feneux D, Serres C, et al. Anomalies morphologiques du spermatozoïde de humain. 1) Propositions pour un systeme de classification. J Gynecol Obstet Biol Reprod 1975; (Suppl. 1): 17-36
25. Jangueria LC, Carneiro J, Kelley OR. Temel Histoloji (Çeviri Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahışhalı B., Barış Kitabevi, İstanbul, 1998: 407-422
26. WHO Laboratuvar El Kitabı, İnsan Semeni ve Sperm-Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi (4.baskı), (Çev ed: Günalp S), Tıp Teknik Kitabevi, Ankara, 2002: 29-32
27. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, et al. DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. J Androl 2000; 21: 33-44
28. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. Fertil Steril 1992; 57: 1289-1293
29. Hosokawa H, Tanaka T, Kato M, et al. Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. Proc Natl Acad Sci 2013; 110: 18626-18631
30. Mortimer D. Practical Laboratory Andrology, Oxford University Press, New York-Oxford, 1994: 5-13
31. Cocuzza M, Athayde KS, Alvarenga C, et al. Grade 3 varicocele in fertile man: a different entity. J Urol 2012; 187:1363-1368
32. Oldstein M, Chan PT, Sigman M. American urological association guidelines, Annual Meeting, 17-22, May 2008, Orlonda
33. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor -quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1998; 69: 528-532
34. Güneş S, Sevgili E, Aşçı R. Sperm DNA Damage Mechanisms and Evaluation Assays: Review. Turkiye Klinikleri J Urology 2013; 43: 107-114
35. Honig SC, Lipshultz LI, Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. Fertil Steril 1994; 62: 1028

36. Hammiche F, Laven JSE, Twight JM, et al. Steegers-Theunissen RP Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples. *Hum Reprod* 2012; 27: 2365-2372
37. Sermin P. *Histoloji* (1. Baskı), Uludağ Üniversitesi Yayınları, Bursa, 1990: 260-28722-28724
38. Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, et al. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reproductive BioMedicine* 2009; 18: 609-616
39. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJV, et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction* 1990; 5: 586-592
40. Pryor JL, Howards SS, Varicocele, *Urol Clin North Am* 1997; 14: 499-513
41. Hoogendijk CF, Kruger TF, Menkveld R. Spermatozonun Anatomisi ve Moleküler Morfolojisi. *Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi Kitabı*, (Çeviri editörü: Kilciler M), Habitat Yayıncılık, İstanbul, 2010: steven1-8
42. Flint M, Lampiao F, Agarwal A, du Plessis SS. Sperm Assessment: Traditional Approaches and Their Indicative Value. In *Practical Manual of In Vitro Fertilization*, Springer, New York, 2012: 185-192
43. Zhu Y, Hu HL, Li P, et al. Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (İPS cells): an in vitro and in vivo study. *Asian Journal of Andrology* 2012; 14: 574-579
44. Eliasson R. Standards for investigation of human semen Untersuchungsstandards für das menschliche Sperma La standardisation de l'analyse du sperme humain. *Andrologia* 1971; 3: 49-64
45. Zavos PM, Correa JR. Effect of treatment of seminal viscosity difficulties with-chymotrypsin on the recovery of spermatozoa for assisted reproductive technologies: comparison between the SpermPrep™ filtration and Percoll gradient centrifugation methods. *Middle East Fertility Society Journal* 1997; 3: 223-229
46. Chiou RK, Anderson JC, Wobig RK, et al. Color doppler ultrasound criteria to diagnose varicoceles: correlation of a new scoring system with physical examination. *Urology* 1997; 50: 953-956

47. Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv. Exp. Med. Biol* 1998; 444: 789–791
48. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr* 2012; 10: 22
49. Dere F. *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı* (3. Baskı), Nobel Tıp Kitabevleri, Adana, 1999: 987-1008
50. Orhon E. *Sperm Morfoloji Atlası*, Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları, İstanbul, 1995: 17-29
51. Snell RS. *Tıp Fakültesi Öğrencileri için Fonksiyonel Anatomi* (2. Baskı), (Çeviri editörü: M. Yıldırım), Nobel Tıp Kitabevleri ve Yüce Yayıncılık, İstanbul, 1998: 316-320
52. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A. Normal sperm morphology and chromatin packaging: Comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 1999; 31:361-366
53. Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, et al. Impact of overweight on assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2004; 19: 2523-2528
54. Vardar E. Obezitenin psikososyal özellikleri. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005; 1: 615
55. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, et al. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by Ilnicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril* 2005; 83: 95-103
56. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş* (Birinci Baskı), Palme Yayıncılık, Ankara, 2006: 531-544
57. Erbenği T. *Histoloji II* (İkinci Baskı). SBAD Yayınları, Ankara, 1996: 156-172
58. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil* 2010; 13:189-193
59. Naour LF, Rubinstein E, Jasmin C, et al. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 2000; 287: 319-321

60. Özata M. Obezite, Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet (2. Baskı), İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2011: 471-493
61. Boggs DA, Rosenberg L, Cozier YC. General and abdominal obesity and risk of death among black woman. *N Engl J Med* 2011; 365: 901-908
62. Maher A, Wilson N, Signal L. Advertising and availability of 'obesogenic' foods around New Zealand secondary schools: a pilot study. *NZ Med J* 2005; 118:U1556
63. Kotz CM, Levine AS, Billington CJ. Etiology of Obesity. In: Bray GA (ed). *Office Management of Obesity*. Philadelphia, Saunders, 2004: 33-46
64. Pekcan G. Şişmanlık (Obezite): Dünyada ve Türkiye’de Görülme Sıklığı, Cem Ofset Matbaacılık, Ankara, 2012: 1-24
65. Zini A, Kamal K, Phang D, et al. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 2001; 58: 258-261
66. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006; 27:450-452
67. Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, et al. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: Data from the LIFE study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2014; 29: 193-200
68. Gallagher D, Visser M, Sepúlveda D, et al. How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? *Am J Epidemiol* 1996; 143:228-239
69. Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, et al. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 1999; 282:1530-1538
70. Kaya E, Sikka SC, Gur S. A comprehensive review of metabolic syndrome affecting erectile dysfunction. *J Sex Med* 2015; 12: 856-875
71. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 293–311
72. Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; 14: 482-487

73. Bellver J, Busso C, Pellicer A, et al. Obesity and assisted reproductive technology outcomes. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 562-568
74. Koloszar S, Fejes I, Závaczki Z, et al. Effect of body weight on sperm concentration in normozoospermic males. *Arch Androl* 2005; 51: 299-304
75. Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, et al. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 2005; 20: 208-215
76. Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, et al. Patient predictors for outcome of gonadotrophin ovulation induction in women with normogonadotrophic anovulatory infertility: A metaanalysis. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 429-449
77. Verit FF, Verit A, Kocyigit A, et al. No increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stress in patients with idiopathic infertility. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2006; 274: 339-344
78. Nicopoulou SC, Alexiou M, Michalakis K, et al. Body mass index vis-a-vis total sperm count in attendees of a single andrology clinic. *Fertility and Sterility* 2009; 92: 1016-1017
79. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434: 234-238
80. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Calogero AE. Negative effect of increased body weight on sperm conventional and nonconventional flow cytometric sperm parameters. *J Androl* 2012; 33: 53-58
81. Hofny ER, Ali M, Abdel-Hafez HZ, et al. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertility and Sterility* 2010; 94, 581-584
82. Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, et al. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 2013; 140: 3221-3229
83. Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia* 2011; 43: 121-128
84. Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 2008; 29: 251-259

85. Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2011; 57: 133-138
86. Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N. Is sperm dna damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28: 391-397
87. Avendano C, Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era?. *Journal of Andrology* 2011; 32 : 356-363
88. Zhang L, Wang L, Zhang X, et al. Sperm chromatin integrity may predict future fertility for unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *International Journal of Andrology* 2012; 35: 752-757
89. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 2012; 27: 2908-2917
90. Teerds KJ, de Rooij DG, Keijzer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 667-683
91. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: Analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202-205
92. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil and Steril* 1988; 49: 112-117
93. Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the environment: where do we go from here?. *Science* 2003; 29:853-855
94. Sariozkan S, Canturk, F, Yay A, Akcay A. The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored new zealand rabbit spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18: 475-480
95. Altunkaynak BZ, Özbek E. Obezite: nedenleri ve tedavi seçenekleri. *Van Tıp Dergisi* 2006; 13:138-142

96. Moragianni VA, Jones S-ML, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil and Steril* 2012; 98: 102-108
97. Fernandes GS, Arena AC, Campos KE, et al. Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 105
98. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, et al. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int* 2012; 110: 863-867
99. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 79:559-563
100. Sadler T. *Langman's Medical Embryology* (5th Ed), William And Wilkins, Baltimore, 1985: 7-83
101. Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011; 9: 32
102. Palmer NO, Fullston T, Mitchell M, et al. SIRT6 in mouse spermatogenesis is modulated by diet-induced obesity. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 929–939
103. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, et al. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile ? *Fertil and Steril* 2008; 90: 619-626
104. Huang CC, Cheng Lin DP, Tsao HM, et al. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and Sterility* 2005; 84: 130-140
105. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil and Steril* 2004; 82: 863-870
106. Akamine EH, Marçal AC, Camporez JP, et al. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *Journal of Endocrinology* 2010; 20: 65-74

107. Martini AC, Tissera A, Estofán D, et al. Overweight and seminal quality: A study of 794 patients. *Fertility and Sterility* 2010; 94: 1739-1743
108. Pauli EM, Legro RS, Demers LM, et al. Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertility and Sterility* 2008; 90: 346-351
109. Sekhavat L, Moein MR. The effect of male body mass index on sperm parameters. *Aging Male* 2010; 13:155-158
110. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, et al. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2010; 1: 2222-2231
111. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, et al. Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod* 2007; 22: 1634-1637
112. Shalaby MA, el-Zorba HY, Kamel GM. Effect of alpha-tocopherol and simvastatin on male fertility in hypercholesterolemic rats. *Pharmacol Res* 2004; 50: 137-142
113. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology* (3rd edition), Saunders Elsevier, Philadelphia, 2006: 490-500
114. Cooper TG, Handelsman DJ. Afterword to Semen Analysis in 21st Century Medicine special issue in *Asian Journal of Andrology*. 2010; 12: 118-123
115. Dariš B, Goropevšek A, Hojnik N, Vlaisavljević V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2010; 281: 363-367
116. Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility* 2010; 94: 549-557
117. Mehdi M, Smatti B, Saad A, et al. Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomal aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia. *Andrologia* 2006; 38: 137-141
118. Asada H, Sueoka K, Hashiba T, et al. The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2000; 17: 51-59

119. Shen HM, Dai J, Chia SE, et al. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002; 17: 1266-1273
120. Vicari E, De Palma A, Burrello N, et al. Absolute polymorphic teratozoospermia in patients with oligoasthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. *J Androl* 2003; 24:598-603
121. Sharbatoghli M, Valojerdi MR, Amanlou M, et al. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 286: 1315-1322
122. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil and Steril* 2000; 73: 43-50
123. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*, 2001; 345: 1388-1393
124. Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 2014; 15: 277–287
125. Hammiche F, Laven JS, Boxmeer JC, et al. Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *J Androl* 2011; 32: 70–76
126. Sermondade N, Faure C, Fezeu , et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2012; 19: 221-231
127. Sallmén M, Sandler DP, Hoppin JA, et al. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology* 2006; 17: 520-523
128. Stanton RA. Nutrition problems in an obesogenic environment. *Med J Aust* 2006; 184: 76-79
129. El-Melegy NT, Ali M. Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *International Braz J Urol* 2011; 37: 495-506
130. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*, Editör çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapbevleri, Ankara, 2006: 431-438

131. Cavkaytar S, Batioglu S, Gunel M, et al. Genetic evaluation of severe male factor infertility in Turkey: a cross-sectional study. *Human Fertility* 2012; 15:100-106



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN BAĞI	Normal, fazla kilolu ve obez bireylerde İzmit-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11
	FAKS	0 352 437 52 85
	E-POSTA	byanca@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Yardı Doç. Dr. Arzu Hanım Yay			
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji-Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı/Kayseri			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>			
	Gözetimsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>			
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	<input type="checkbox"/>			
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>			
	İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans Tezi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOKMERKEZ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

ASLI GİBİDİR



Etik Kurul Başkanının
Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Normal, fazla kilolu ve obez bireylerde Iuzmo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLEN DIRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ BÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	DI.GU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama
	SİGORTA	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	
	ILAN	
	YILLIK BİLDİRİM	
	SONUÇ RAPORU	
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	
DİĞER		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2015/153	Tarih : 20.03.2015
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma İle İlişki		Katılım (*)		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk. Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
Prof. Dr. Karamehmet YILDIZ	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
Prof. Dr. Salih KUK	Tıbbi Parazitoloji	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	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. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk. Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	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. Hüseyin ARINÇ	Kardiyoloji	Kayseri Eğitim Hast.	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. Erdem KILIÇ	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	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. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
Yard. Doç. Dr. Afra EKİNCİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
Yard. Doç. Dr. Ferhan ELMALI	Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	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"/>	
Av. Zafer Tuğrul SARIASLAN	Avukat	Hukuk Müşaviri	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"/>	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	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"/>	
Serkan KARACA	Sivi Üye	Öğretmen	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"/>	

*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

NORMAL, FAZLA KİLOLU VE OBEZ BİREYLERDE İZUMO-1 SPERM YÜZEY RESEPTÖRÜNÜN EKSPRESYON DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%27
BENZERLİK ENDEKSİ


%25
İNTERNET
KAYNAKLARI

%5
YAYINLAR

%
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

 dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı **%2**

 ERDEMİR, Fikret. "The Evaluation of the Relationship Between Obesity and Male Infertility", Derman Tıbbi Yayıncılık, 2013. Yayın **%2**

 www.biyorad.com İnternet Kaynağı **%2**

 www.androloji.info İnternet Kaynağı **%2**

 angora.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı **%2**

 www.dirimbilim.net İnternet Kaynağı **%1**

 openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı **%1**

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Vahide Cansu SEYMENOĞLU

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 1990/ Çorlu –Türkiye

E-mail : cansu_s90@hotmail.com

Tel : -

EĞİTİM

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D	2017
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008-2012

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2017-Halen	ASKİ	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce