

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SPERM mtDNA 4977 DELESYONU İLE ATP VE
SAM DÜZEYLERİNİN SPERM MOTİLİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

EZGİ TERZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. AHMET ÖZAYDIN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI

İSTANBUL-2019



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

SPERM mtDNA 4977 DELESYONU İLE ATP VE
SAM DÜZEYLERİNİN SPERM MOTİLİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

EZGİ TERZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. AHMET ÖZAYDIN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 05.12.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Doç. Dr. Ahmet Özyayın
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. İlhan Onaran
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Fahri Akbaş
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Tıp Fakültesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğumu, tezin planlanmasından yazımına kadar olan tüm safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumları kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ezgi Terzi

İmza



İTHAF

Rahmetli babam Şerif Terzi başta olmak üzere;

hayatta tek varlığım olan aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Tezimin planlanma ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübelerini eksik etmeyen tez danışmanım İÜ-Cerrahpaşa C.T.F. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet Özaydın'a;

Tez sürecinde verdiği manevi ve bilimsel destekten dolayı İÜ-Cerrahpaşa C.T.F. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İlhan Onaran'a;

Çalışmamıza her türlü desteğini esirgemeyen ve klinik destek sağlayan İÜ-Cerrahpaşa C.T.F. Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hamdi Özkara'ya;

Laboratuvar çalışmalarım sürecinde teknik destek ve bilgisini esirgemeyen ve her daim manevi destek veren Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fahri Akbaş'a;

Tez çalışmama verdiği izinden dolayı İÜ-Cerrahpaşa C.T.F. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Turgut Ulutin'e;

Laboratuvar çalışmaları ve tez hazırlama dönemi sürecinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Biyofizikçi Nurten Bahtiyar ve Dr. Biyolog Ayla Karimova'ya;

Çalışmada kullandığımız örneklerin tespitini sağlayan Biyolog Tayyar Demiryürek'e;

Tez dönemim süresince arkadaşlık, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Uzm. Biyolog Hülya Arkan ve Uzm. Biyolog Bahar Beydoğan'a;

İÜ-Cerrahpaşa C.T.F. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Protein Laboratuvarı'nda çalışan arkadaşlarıma;

Tez sürecinde tüm sevgi, destek ve inançlarını benden esirgemeyen ve yanımda olan annem ve kardeşim başta olmak üzere tüm aile ve dostlarıma,

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	iv
BEYAN.....	v
İTHAF.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
SEMBOLLER/ KISALTMALAR LİSTESİ	xv
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Erkek Üreme Sistemi	6
2.1.1 Testisler (Orchis, Didymis)	7
2.1.2 Dış Genital Kanallar	8
2.1.3 Yardımcı Bezler.....	9
2.1.4 Penis (Phallus).....	10
2.2 Spermatogenesis ve Spermiyogenesis.....	10
2.2.1 Spermatogoniumlar	10
2.2.2 Spermatozitler.....	12
2.2.3 Spermatozidler	13
2.3 Sperm Morfolojisi	16
2.3.1 Baş kısmı	16
2.3.2 Kuyruk kısmı	17
2.4 Sperm Metabolizması.....	18
2.5 Sperm Motilitesi.....	19
2.6 Erkek İnfertilitesi	19
2.6.1 Erkek İnfertilitesinin Sebepleri.....	20
2.6.1.1 Testiküler Nedenler.....	20
2.6.1.2 Testiküler Ven Varikozu (Varikosel)	20
2.6.1.3 İnmemiş Testis (Kriptorşidizm).....	20

2.6.1.4 Genital Kanal Anatomisi Bozuklukları.....	20
2.6.1.5 Germinal Hücre Aplazisi	20
2.6.1.6 Retrograd Ejakülasyonu.....	20
2.6.1.7 Sperm Kordonunun Bükülmesi (Testis Torsiyonu).....	21
2.6.1.8 Ejakülasyon Oluşmaması.....	21
2.6.1.9 İmmünolojik İnfertilite	21
2.6.1.10 Hiperprolaktinemi	21
2.6.1.11 Genetik Nedenler	21
2.6.1.11.1 Anöploidi	21
2.6.1.11.1.1 Klinefelter Sendromu	21
2.6.1.11.1.2 Down Sendromu (Trizomi 21).....	22
2.6.1.11.1.3 XYY Sendromu.....	22
2.6.1.11.1.4 XX Erkek Sendromu	22
2.6.1.11.3 Primer Silier Diskinezi [İmmotil Silia Sendromu].....	22
2.6.1.11.3.1 Kartagener Sendromu	23
2.6.1.11.3.2 Usher Sendromu	23
2.6.1.11.4 Miyotonik Distrofi	23
2.6.1.11.5 Noonan Sendromu.....	23
2.6.1.11.6 Orak Hücre Anemisi	24
2.6.1.11.7 Polikistik Böbrek Sendromu	24
2.6.1.11.8 Fibröz Kılıfın Displazisi (Dysplasia of Fibrous Sheath, Küt Kuyruk Sendromu).....	24
2.6.1.11.9 Y kromozom Mikrodelesyonları	24
2.6.1.11.10 Cinsiyet Kromozomları Arasında Resiprokal Translokasyonlar ..	25
2.6.1.11.11 Resiprokal Otozomal Translokasyonlar	26
2.6.1.11.12 Robertson Tipi Translokasyonlar	26
2.6.1.12 Genetik Endokrinopatiler.....	26
2.6.1.12.1 Hipogonadotropik Hipogonadizm (IHH).....	26
2.6.1.12.2 LH Fonksiyon Bozuklukları.....	26
2.6.1.12.3 Androjen Sentez ve Fonksiyon Bozuklukları	27
2.6.1.12.4 Androjen Duyarsızlık Sendromu (Testiküler Feminizasyon)	27
2.6.1.12.5 5- α Redüktaz Enzim Bozuklukları	27
2.6.1.13 Sistemik Hastalıklar	27

2.6.1.13.1 Son Dönem Böbrek Yetmezliği (SDBY).....	27
2.6.1.13.2 Karaciğer Sirozu.....	28
2.6.1.13.3 Diyabet	28
2.6.1.14 Enfeksiyon	28
2.6.1.14.1 Orşit.....	28
2.6.1.14.2 Prostatit	28
2.6.1.14.3 Epididimit.....	28
2.6.1.14.4 Üretrit	28
2.6.1.14.5 Lökositospermi.....	28
2.6.1.17 Gonadotoksinler.....	29
2.6.1.18 Sigara	29
2.6.1.19 Sıcaklık	29
2.6.1.20 Radyasyon.....	29
2.6.1.21 İlaçlar	29
2.6.1.22 Likefaksiyon Bozukluğu.....	29
2.6.1.23 Protein Karboksil Metilaz Eksikliği	29
2.6.1.24 Sperm Sayı, Yapı ve Hareket Bozuklukları.....	30
2.7 Astenospermi Tanımı	30
2.8 Mitokondri.....	30
2.8.1 ATP ve Mitokondri İlişkisi.....	35
2.8.2 mtDNA4977 Delesyonu	37
2.9 S-Adenozil-L-Metiyonin (SAM)	38
2.10 Global DNA Metilasyonu	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1 Kullanılan Örneklerin Tanımı	45
3.2 Semen Örneklerinden Sperm Elde Etme.....	45
3.3 DNA İzolasyonu.....	46
3.4 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reel-Time PCR).....	47
3.4.1 Gerçek Zamanlı PZR Standart Değerlerinin Oluşturulması.....	47
3.4.2 Delesyonlu mtDNA'dan mtDNA4977 Primerlerini Kullanarak 270 bç Ürününün PZR Yöntemiyle Elde Edilmesi	48
3.4.3 Agaroz Jelden Gene Özgü PZR Ürününün İzolasyonu	49

3.4.4 Total mtDNA'dan Total mtDNA Primerlerini Kullanarak 249 bç Ürününün PZR Yöntemiyle Elde Edilmesi	50
3.4.5 Agaroz Jelden Gene Özgü PZR Ürününün İzolasyonu	51
3.4.6 Total mtDNA (249 bç) ve 4977 Delesyonlu mtDNA (270 bç) Dizilerinin Vektöre Aktarılması	51
3.4.7 Transformasyon: 249 bç'lik Vektör (Total mtDNA) ile 270 bç'lik Vektörün (4977 Delesyonlu mtDNA) Bakteriye Transfer Edilmesi	52
3.4.8 Plazmid DNA'nın Elde Edilmesi	52
3.4.9 %2 Agaroz Jel Çözeltisi Hazırlanması	53
3.5 Gerçek Zamanlı PZR Ürünlerinin Elde Edilmesi	53
3.5.1 mtDNA4977 Delesyonunun Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi ile Tespiti	54
3.6 Global DNA Metilasyonu Analizi	56
3.6 SAM Analizi	56
3.7 ATP Düzeylerinin Belirlenmesi (Bioluminesans)	57
3.9 İstatiksel Analiz	58
3.10 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	58
3.11 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	60
4. BULGULAR	61
4.1 mtDNA 4977 Mutasyonu ve Total mtDNA Miktarlarının Gerçek Zamanlı PZR Analizi	61
4.2 Global DNA Metilasyonu Analizi	63
4.3 SAM ELISA Analizi	63
4.4 ATP Bioluminesans Analizi	65
4.6 mtDNA 4977 Delesyonu ile ATP, SAM ve Global DNA Metilasyonu Arasındaki Korelasyon Analizi	65
5. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	72
ETİK KURUL ONAYI	81
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	82
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Sperm üretimi için gerekli hormonlar ve etkileri.....	12
Tablo 2-2: İnsan seminal plazmasında bulunan çeşitli maddeler	15
Tablo 2-3: Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri (yüzdeleri ve % 95 güven aralıkları).....	16
Tablo 2-4: Erişkin Klinefelter sendromu hastalarında görülen bulgular	22
Tablo 3-1: mtDNA 4977 delesyonuna ilişkin primer dizileri.....	48
Tablo 3-2: 270 bç ürünü için gerekli PZR malzemeleri	48
Tablo 3-3: 270 bç ürünü için yapılan PZR protokolü.....	49
Tablo 3-4: 249 bç ürünü için gerekli PZR malzemeleri	50
Tablo 3-5: 249 bç ürünü için yapılan PZR protokolü.....	50
Tablo 3-6: Ligasyon işlemlerinde kullanılan malzemeler	52
Tablo 3-7: mtDNA 4977 delesyonunu belirlemede kullanılan primerler.....	54
Tablo 3-8: : mtDNA kontrol ve mtDNA 4977 delesyonu tespiti için gerçek zamanlı PZR malzemeleri.....	55
Tablo 3-9: : Gerçek zamanlı PZR protokolü	55
Tablo 4-1: Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri.....	61
Tablo 4-2: mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasındaki Pearson korelasyon değerleri.....	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Testislerin yapısı, dış genital kanallar ve yardımcı bezler	7
Şekil 2-2: Hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksenin feedback regülasyonu.....	11
Şekil 2-3:Memeli sperm hücresi ve kuyruk yapısı	14
Şekil 2-4: Sperm yapısı ve bölümleri	17
Şekil 2-5:Siliar aksonemin temel yapısı ve şematik görüntüsü	18
Şekil 2-6: Fibröz kılıfın dizplazisi	25
Şekil 2-7:Y kromozomunda delesyon.....	25
Şekil 2-8:Mitokondrinin şematik yapısı	31
Şekil 2-9:Mitokondride gerçekleşen reaksiyonlar	32
Şekil 2-10: Mitokondri D-loop bölgesi, hafif ve ağır zincirler.....	33
Şekil 2-11:mtDNA ve üzerindeki genler	34
Şekil 2-12:Mitokondri ve hücre bölünmeleri sonucu oluşan homoplazmi ve heteroplazmi.....	35
Şekil 2-13:Krebs döngüsü ve hücredeki etkileri.....	36
Şekil 2-14:Mitokondri iç zarında gerçekleşen oksidatif fosforilasyon.....	37
Şekil 2-15:Yabani tip mtDNA ve 4977 delesyonu sonucu oluşan mutant mtDNA	38
Şekil 2-16: DNA metilasyonu reaksiyonu	39
Şekil 2-17:Transsülfasyon ve poliamin reaksiyonları	40
Şekil 2-18:Tek karbon metabolizması ve ilişkili yollar	41
Şekil 2-19: DNA metilasyonu ile gen susturulması.....	42
Şekil 2-20: İnsanda gelişim sürecinde DNA metilasyonunun evreleri.....	43
Şekil 4-1:Total mtDNA PZR analiz sonucu.....	62
Şekil 4-2: mtDNA 4977 delesyonu PZR analiz sonucu.....	62

Şekil 4-3: mtDNA 4977 delesyonu analizi sonucu astenospermi hasta grubu ve kontrol grubunun ortalama değerleri (P=0,0039).....	63
Şekil 4-4:Global DNA metilasyonu analizi sonucu astenospermi hasta grubu ve kontrol grubunun ortalama değerleri (P=0,6821).....	64
Şekil 4-5:SAM analizi sonucu astenospermik hasta grubu ve kontrol grubunun ortalama değerleri (P<0,0001).....	64
Şekil 4-6:ATP bioluminesans analizi sonucu astenospermi hasta grubu ve kontrol grubunun ortalama değerleri (P= 0,0037).....	65



SEMBOLLER/ KISALTMALAR LİSTESİ

- 5-mC (5-metilsitozin)
8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanizin)
ABP (Androjen bağlayıcı protein)
ADP (Adenozin difosfat)
AMH (Anti-Müllerien Hormonu)
ATP (Adenozin trifosfat)
AZF (Azospermi faktör)
bç (Baz çifti)
cAMP (siklik AMP, siklik adenozin monofosfat)
CF (Kistik fibrosis)
CFTR (Kistik fibrosis transmembran regülatör)
CGH (Gonotropin hormonu)
COXIII (sitokrom oksidaz- III)
CpG (sitozin fosfat guanozin)
CV (Değişim katsayısı)
DHT (Dihidroksitestosteron)
dk (dakika)
DNA (Deoksiribonükleik asit)
DNMT (DNA metiltransferaz)
dNTP (Deoksinükleotidtrifosfat)
EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)
ETS (Elektron taşıma sistemi)
FADH (Flavin adenin dinukleotid)
FRET (Fluoresans rezonans enerji transferi)
FSH (Folikül stimüle edici hormon)
GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz)
GER (Granüllü endoplazmik retikulum)
GnRh (Gonadotropin salgılatıcı hormon)
GTP (Guanozin trifosfat)
H (Mitokondri ağır zinciri)
H₂O (Su)

HIV (İnsan immün yetmezlik virüsü)
HPG (Hipotalamik-Hipofiz-Gonadal eksen)
IHH (Hipogonadotropik Hipogonadizm)
Kb (kilobaz)
KCl (Potasyum klorür)
KH₂PO₄ (Potasyum bifosfat)
L (Mitokondri hafif zinciri)
LH (Lüteinleştirici hormon)
LHON (Leber'in heredetik optik nöropatisi)
M (molar)
MAT (Metiyonin adenziltransferaz)
mC (metil sitozin)
MgCl₂ (Magnezyum klorür)
mg (miligram)
ml (mililitre)
mM (milimolar)
mtDNA (Mitokondriyal deoksiribonükleik asit)
MTHFR (Metilentetrahidrofolat redüktaz)
MTOC (Mikrotübül düzenleme merkezi)
Na₂HPO₄ (disodyumbifosfat)
NaCl (Sodyum klorür)
NADH (Nikotinamid adenin dinükleotid)
NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat)
ND3 (NADH dehidrogenaz subunit 2)
ND4 (NADH dehidrogenaz subunit 4)
ND4L (NADH dehidrogenaz subunit 4L)
ND5 (NADH dehidrogenaz subunit 5)
°C (santigrad derece)
PBS (Phosphat buffer saline, fosfat buffer salin)
pmol (pikomol)
PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu)
rRNA (Ribozomal ribonükleotid asit)
SAH (S-Adenzilhomosistein)

SAM (S-Adenozil-L-Metiyonin)

SCF (Kök hücre faktörü, (stem cell factor))

SDS (Sodyum dodesil sülfat)

sn (saniye)

SRY (Sex determining region; insiyet belirleme merkezi)

TDF (Testis belirleyici faktör (Testis Determining Factor))

THF (Tetrahidrofolat)

tRNA (Taşıyıcı ribonükleotid asit)

Xp (X kromozomu kısa kolu)

Yp (Y kromozomu kısa kolu)

μ l (mikrolitre)

ÖZET

Terzi, E. (2019). Sperm mtDNA4977 Delesyonu ile ATP ve SAM Düzeylerinin Sperm Motilitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Anahtar kelimeler: Astenospermi, mtDNA4977 delesyonu, ATP, SAM, global DNA metilasyonu.

Astenospermi, sperm hareket bozukluğu ile karakterize olup infertiliteye neden olan sebeplerden biridir. mtDNA 4977 delesyonu sonucu, ATP'nin oksidatif sentezi için gerekli genlerin kaybı söz konusudur. ATP eksikliğinin SAM miktarında azalmaya neden olması sonucu hücrede oksidatif hasarın ve mtDNA'da kırıkların arttığı bilinmektedir. SAM, serbest metil grubu vericisi olarak global DNA metilasyonu için de önemli bir metabolittir. Nükleer DNA'da oluşan hipometilasyon, infertilite ve konjenital sorunlara yol açabilir. Bu çalışmanın amacı, mtDNA 4977 delesyonu nedeniyle oluşabilecek ATP eksikliği nedeniyle SAM ve global DNA metilasyonunda meydana gelen değişikliklerin astenospermi ile ilişkisini belirlemektir. Bu amaçla astenospermik ve sağlıklı bireylerden toplanan semen örneklerinden elde edilen sperm örneklerinden RT-PCR ile mtDNA 4977 delesyonu, ELISA yöntemi ile global DNA metilasyonu ve SAM, bioluminesans yöntemi ile ATP miktarları ölçülmüştür. Astenospermi hasta grubuyla kontrol grubu arasında mtDNA 4977 delesyonu, ATP ve SAM bakımından anlamlılık mevcutken ($P < 0,05$) global DNA metilasyonu bakımından ilişki kurulamamıştır ($P > 0,05$). Hasta ve kontrol grupları arasında mtDNA 4977 delesyonu, ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasında korelasyon kurulamamıştır ($r < 0,05$). Elde ettiğimiz sonuç ve bulguları astenospermi vakalarındaki mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasındaki ilişkileri açıklamakta yeterli değildir. Hasta grubunda gözlenen yüksek ATP değerleri dikkat çekicidir ve mekanizmasının araştırılması yerinde olacaktır. Bu nedenle, ileride yapılması planlanacak çalışmalarda hasta ve kontrol sayısının artırılarak sperm oksidatif stres ölçümü, aksonemi oluşturan genlerin metilasyon veya mutasyon oranları da belirlenip çalışmaya dahil edilmesi yararlı olacaktır.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-31427

ABSTRACT

Terzi, E. (2019). Investigation of the ATP and SAM Levels on Sperm Motility by Sperm mtDNA4977 Deletion. Istanbul University-Cerrahpaşa Graduate Education Institute, Medical Biology Department, Master's Thesis, Istanbul.

Asthenospermia is characterized with the defect of sperm motility and an important cause of men infertility. Because of mtDNA4977, some genes disappear responsible of ATP synthesis. It is known lack of ATP causes low SAM levels. That is cause of oxidative damage in cell and breaks on mtDNA. Also methyl groups for DNA methylation are taken from SAM. The purpose of this study is to determine relationships among mtDNA 4977 deletion with ATP, SAM and global DNA methylation. For this purpose, semen samples are collected from healthy men and asthenospermic men. Analyses of mtDNA4977 deletion is studied by using Real Time-PCR method. Analyses of SAM and global DNA methylation are studied by using ELISA method. Also ATP is studied by using bioluminescence method. Although it is found there are differences among healthy and asthenospermic group for mtDNA4977 deletion, SAM and ATP ($P < 0,05$) there is no relationship among healthy men and asthenospermic men for global DNA levels ($P > 0,05$). We did not find any statistically correlation among mtDNA 4977 deletion and ATP, SAM and global DNA methylation ($r < 0,05$). In conclusion, it is not enough these results we found to explain relationship among mtDNA4977 deletion and ATP, SAM, and global DNA methylation. Thus, to increase of numbers of healthy and control group and to add more parameters to explain effective factors will be beneficial for the studies in the future.

Key words: Asthenospermia, mtDNA4977 deletion, ATP, SAM, global DNA methylation.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite sorunlarının dünyada yaklaşık 200 milyon kişide görüldüğü düşünülmektedir [42]. Kromozomal anomaliler, Y kromozomu mikrodelesyonları, genetik polimorfizmler ve sperm DNA'sını saran protaminler erkek üremesini etkileyebilir. Erkek infertilitesi oluşumunda mitokondriyal DNA (mtDNA)'daki mutasyonlar diğer risk faktörleridir. Mitokondriyal DNA'daki mutasyonların etkisi nedeniyle oluşan sperm hareketliliğindeki azalmanın erkek infertilitesi ile ilişkisi vardır [30]. Fertilizasyon boyunca sperm, flagella hareketi için ve aktif fonksiyon gösterebilmek amacıyla fazla miktarda enerjiye ihtiyaç duyar. Bu enerji ihtiyacını karşılayabilmek amacıyla, olgun sperm hücrelerinde yaklaşık 100 adet mitokondri bulunur [8]. Astenospermi, sperm hareket bozukluğu ile karakterize olup fonksiyonel bozukluklar, varikozel, endokrin anomaliler gibi çeşitli faktörleri içeren, erkek infertilitesine neden olan yaygın sebeplerden biridir [58]. Astenospermiye sebep olup sperm hareketini etkileyen faktörlerden biri sperm mtDNA mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların en bilineni mtDNA4977 bç delesyonudur. mtDNA4977 bç delesyonu sırasıyla 8470- 8482 ve 13447- 13459 pozisyonlar arasında gerçekleşerek altı tRNA geni, ATPaz 6/8, COXIII, ND3, ND4, ND4L ve ND5 gen bölgeleri dahil yirmi yapısal gende delesyona neden olur [30, 42]. Bu gen kümelerinin kaybı, sperm hareketini sağlayacak yeterli enerjinin (ATP) üretilmemesine neden olur. Bu durum da erkek infertilitesine sebep olmasından ötürü oosit fertilizasyonu gerçekleşemez.

S-adenozil metiyonin (SAM) metiyonin adenziltransferaz (MAT) aracılığı ile metiyonin aminositinden oluşturulan, ATP'nin katalizlediği bir reaksiyon sonucu oluşur. SAM, glutatyon sentezinde öncül molekül olup fosfolipitlerin, histonların, amin ve proteinlerin metilasyonu için gerekli olan metil grubunu sağlar. Oksidatif fosforilasyon ile sentezlenen ATP, metiyonin S-adenozilmetiyonin sentetaz tarafından SAM'dan S-adenozilhomosistein (SAH) oluşumunda kullanılır. Açığa çıkan serbest metil grubu, DNA metiltransferaz (DNMT) tarafından DNA metilasyonu için kullanılır. SAM miktarındaki azalma sonucu artmış lipid peroksidasyonu ve mitokondriyal hasarın yanı sıra DNA hipometilasyonu ve zincir kırıklarının olduğu belirlenmiştir [10].

Epigenetik, DNA üzerinde nükleotid değişikliğine sebep olmaksızın gen ekspresyonunu etkileyen kalıtsal değişiklikler olup DNA metilasyonu ve translasyon sonrası histon modifikasyonlarını içerir. Epigenetik modifikasyonlar hücrel

farklılaşma, embriyonik yeniden programlama, X kromozomu inaktivasyonu, gen susturulması gibi hücrel ve gelişimsel süreçlerde rol oynar [82]. DNA metilasyonu, yaklaşık 500 bazlık CpG adalarında sitozin (C) bazının 5' pozisyonuna metil grubunun (CH₃) DNMT tarafından eklenmesidir [25]. DNA hipometilasyonu gen transkripsiyon aktivitesi ile ilişkiliyken DNA hipermetilasyonu gen susturulması (imprinting) ile bağlantılıdır [83]. Sperm hücrelerinde epigenetik programının iki özelliği vardır: Primordiyal germ hücrelerindeki epigenetik işaretlerin çıkarılması, spermiyogenesis sürecinde mayoz sonrası olgunlaşma evresinde germ hücre genomunun yeniden organize olması ve yoğunlaşması [90]. Sperm global DNA metilasyonu düzeyi ile sperm motilitesi arasında bağlantı olduğu ve infertil bireylerde hipometilasyonun daha sık rapor edildiği belirtilmiştir.

mtDNA 4977 delesyonu sonucu ATP miktarındaki azalmanın sperm motilitesi ile ilişkisi dışında SAM sentezinde görev almasından dolayı oksidatif stresle ilişkisi olabilir. Ayrıca metil grubu vericisi olan SAM miktarındaki azalma, sağlıklı spermelerde gerekli olan global DNA metilasyonu düzeylerinde azalmaya sebep olabilir. Literatürde mtDNA 4977 delesyonu, ATP, SAM ve global DNA metilasyonunun astenospermi ile ilişkisine yönelik çalışmalar yapılmasına karşın bunlar arasındaki ilişkiyi sorgulayan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasındaki ilişki belirlenmek istenmiştir. .

2. GENEL BİLGİLER

Mitokondri, normal hücre ve organ fonksiyonu için enerji (oksidatif fosforilasyon) ve metabolik homeostazisi sağlayan; apoptozda esas rolü oynayan; sitozolik Ca^{++} düzeyini, lipid homeostazisini (β - oksidasyon), steroid hormon sentezini kontrol eden; Fe-S merkezini, hem sentezini, doğal immün cevabı, metabolik hücre sinyalini oluşturan; hücre çoğalması, epigenetik regülasyonu, hücre döngüsü kontrolünü, hücre farklılaşmasını sağlayan ökaryotik hücre organelidir [7, 75]. Yapısal olarak dört ana kısımdan oluşur: Dış zar, iç zar, membranlar arası boşluk, matriks. Hücrenin fonksiyonuna bağlı olarak sayıları 1.000- 10.000 arasında değişir. Mitokondriyi diğer organellerden ayıran özelliği, kendi halkasal genomu (mtDNA) ve yerel protein sentezine izin veren kendine özgü ribozomlarının bulunmasıdır [7]. İnsan mtDNA'sı, 16569 baz çiftinden oluşan, çift zincir, halkasal DNA molekülü olup intron içermeyerek her iki zinciri transkribe olur. İnsan mtDNA'sı 2 rRNA (12S ve 16S), 22 tRNA, 13 elektron taşınımı ve oksidatif fosforilasyonla ilgili gen kodlarıdır.[67]. Kodlanan 13 polipeptitten oksidatif fosforilasyon için gerekli olan bileşenler Kompleks-I (NADH dehidrogenaz ve 6 subunit), Kompleks-III (sitokrom-c oksidoreduktaz, sitokrom-bc1 kompleksi, ubikinon), Kompleks-IV (COX, sitokrom-c oksidaz ile 2 subunit, sitokrom aa3 kompleksi), Kompleks-V (ATP sentaz)'dır. Kompleks-II (süksinat dehidrogenaz) ise nükleer DNA üzerinden transkrip olup oksidatif fosforilasyon sisteminde görev alır [5].

Nükleer DNA'nın aksine mtDNA, tamir mekanizmalarına sahip değildir. DNA'ya bağlanan proteinler veya histonlar tarafından korunmayan, D-loop bölgesinden başlayan ve yanlış baz yerleşiminde bunu düzelten tamir mekanizması içermeyen replikasyon mekanizmasına sahiptir. mtDNA, mitokondri iç zarı ile direk temas halinde olup oksidatif fosforilasyon sonucu oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) ile temas haldedir. Bu konuda yapılan çalışmalar, mutasyona uğramış mtDNA'ya sahip mitokondrilerin daha düşük oksidatif zincir reaksiyonuna sahip olduklarını, superoksit ($O^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2) radikallerinin artmış olduğunu göstermiştir. Bunlardan dolayı nükleer DNA'ya göre mtDNA'sının mutasyon oranı 10-100 kat daha fazladır [30]. Mitokondride meydana gelen fonksiyon bozuklukları kanser, diyabet, obezite, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Huntingon hastalığı, Leber'in

herediter optik nöropatisi (LHON), Kearns- Sayre sendromu, infertilite gibi çeşitli mekanizmalara sahip bozukluklara yol açmaktadır.

Sperm hücrelerinin merkezinde 70-80 adet mitokondri yerleşim gösterir. ETZ (elektron transport zinciri)'yi de içeren sperm mitokondriyal enzimlerinin aktivitesi sperm konsantrasyonu, canlılığı ve hareketliliği ile bağlantılıdır [7]. Mitokondriyal DNA (mtDNA)'daki mutasyonlar, erkek infertilitesini etkileyen nedenlerdendir. Astenospermia, sperm hareket bozukluğu ile karakterize olup fonksiyonel bozukluklar, varikosel, endokrin anomaliler gibi durumlar astenospermi ile ilişkilidir [81]. Astenospermia'ya sebep olup sperm hareketini etkileyen faktörlerden biri sperm mtDNA mutasyonlarıdır. mtDNA4977 bç delesyonu, sırasıyla 8470- 8482 ve 13447-13459 pozisyonlar arasında gerçekleşerek Bu delesyon sonucu, oksidatif fosforilasyon için gerekli olan ATPaz-6, sitokrom oksidaz-III (COXIII), NADH dehidrogenaz subunit-2 (ND3), NADH dehidrogenaz subunit-4 (ND4), NADH dehidrogenaz subunit-4L (ND4L), NADH dehidrogenaz subunit-5 (ND5) genleri ve 6 tRNA geni de dahil olmak üzere 20 yapısal gen delesyona uğrar [42, 78]. Bu gen kümelerinin kaybı, sperm hareketini sağlayacak yeterli enerjinin (ATP) üretilmemesine, bu durum da erkek infertilitesine sebep olmaktadır.

SAM, yaşayan tüm canlılarda bulunan ve ATP ile L-metionin kullanılarak sentezlenen bir metabolittir [91]. Hücrede antioksidan özellikteki GSH sentezlenmesine öncülük etmekle birlikte DNA metilasyonu için metil grubu sağlamaktadır [35]. SAM miktarındaki azalmanın lipid peroksidasyonunda ve mitokondriyal hasarda artma ile DNA hipometilasyonu ve zincir kırıkları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [11]. SAM miktarındaki azalma sonucu nükleer metilasyonda oluşan hasarların doğumsal bozukluklar, nörodejeneratif bozukluklar, depresyon ve infertilite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [46, 60].

Epigenetik, DNA'da sekans değişikliklerine neden olmaksızın gen ekspresyonunu etkileyen kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik değişimler mayotik veya mitotik safhada görülmekle birlikte kromatin yeniden düzenlenmesi, non-codin RNA regülasyonu, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu bu tür düzenlemelerdir [22,74]. Erkek bireylerde DNA metilasyonu, implantasyon ve spermatogenesis sürecinde meydana gelir. Genomik DNA metilasyonu spermatogenik hücre tiplerinde gen ekspresyonu kontrolü sağlamazken kromatin düzenlemesi için gereklidir [69].

Montjean ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yüksek sperm DNA hipermetilasyon düzeylerinin spermatogenesis için gerekli olduğu belirtilmiştir [56]. DNA metilasyonu değişimlerinde fertilizasyon bozuklukları, embriyogenesisde fonksiyonel bozukluk, doğum öncesi ölüm, konjenital anomaliler, erken doğum veya düşük doğum kilosu tespit edilmiştir [20]. Ayrıca sitozin bazında metilasyon birikimi ile infertil erkeklerde gen ekspresyonu seviyesi arasında yakın korelasyon olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [50].



2.1 Erkek Üreme Sistemi

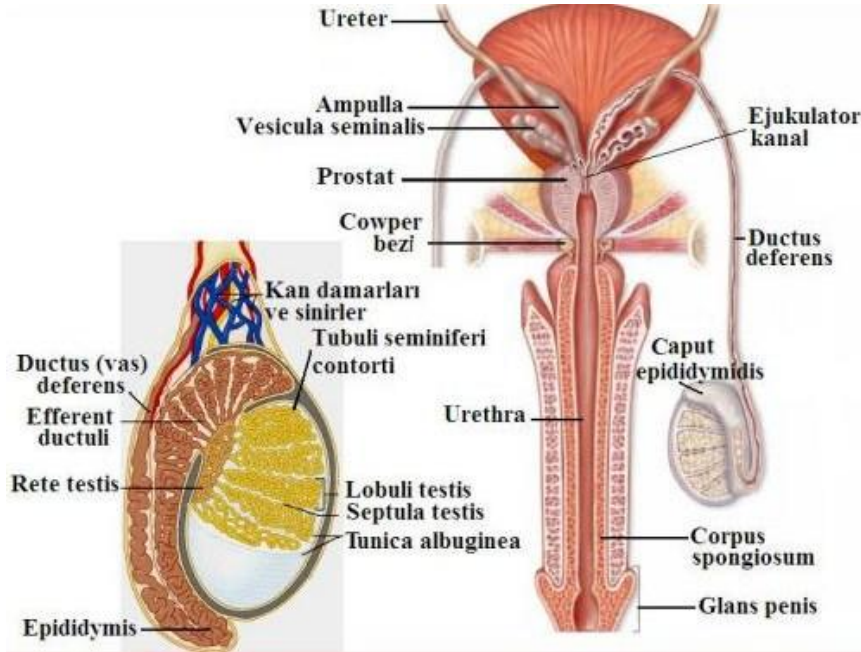
Erkek üreme sistemi, haploid kromozomlu erkek gamet hücresi olan spermin sürekli üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanması ile erkek cinsiyet hormonları olan androjenlerin sentezlenmesi ve salgılanmasından sorumludurlar [46].

Gonadlar, mezenkim, mezodermal sölom epiteli (mezotel), primordial germ hücrelerinden köken alır. Embriyonik gelişimin 21. gününde vitellus kesesi endodermide bulunan epiblast hücreleri primordial germ hücrelerini (PGH) oluşturur. Primordial germ hücreleri 4. haftada bağırsak mezenteri boyunca ilerleyip 5. haftada primitif gonadlara yerleşmesi ile gonadal gelişim başlar. Gonadal gelişimi belirleyen cinsiyet kromozomları olup embriyo dişi (XX) ise gonadın korteksi ovaryum şeklinde gelişip medulla körelir. Embriyo erkek (XY) ise gonadın medullası testise farklılaşp korteks ortadan kalkar. Erkek embriyosunun gelişiminin 6. haftasında mezonefrik tübüllerin dış kısımlarından seminifer tübül, tubuli recti ve rete testis oluşur. Primitif testis kordonlarından gelişerek seminifer tübülü oluşturan farklılaşmamış hücreler sertoli hücrelerine köken olurken, spermatogoniumlar endoderm kökenli primordial germ hücrelerinden oluşur. Gelişen sertoli hücreleri ise mezenşim hücrelerinin mezonefrozdaki testise göçünü uyararak Leyding hücrelerine gelişimini sağlar. Morfolojik farklılaşma embriyogenezin 7. haftasına kadar görülmez. Embriyoda erkek cinsiyet gelişimi, gonatta bulunan somatik hücrelerdeki Y kromozomunun kısa kolu (Yp) üzerindeki SRY gen bölgesinden transkrip edilen *Sry* transkripsiyon faktörü (Testis Determining Factor (TDF)) tarafından belirlenir. Testis belirleyici faktörün (TDF) görevi, gonadlarda testislerin farklılaşmasını sağlamaktır. 8. hafta itibariyle sertoli hücre sinyalleri ve insan koryonik gonodotropin hormonu (CGH) etkisi ile mezenşimden gelişen Leyding hücreleri vasıtasıyla testosteron üretimi başlar. Testosteron üretimi ile mezonefrik kanallarından erkek genital yollarının oluşması sağlanır. Sertoli hücrelerinden salgılanan Anti-Mülleriye Hormonu (AMH) ve testosteron etkisi ile iç ve dış genital organların erkek tipinde gelişmesi uyarılır. [64, 67, 70].

Erkek üreme sistemi başlıca dört kısımdan meydana gelir: testisler, dış genital kanallar, yardımcı bezler, penis (Şekil2-1).

2.1.1 Testisler (Orchis, Didymis)

Karın boşluğunun dış kısmındaki skrotumda bulunan bir çift organdır. Her biri yaklaşık 10-15 gram kütlede, 2-3 cm kalınlıkta ve 4,5-5 cm boyundadır. Olgun bir testis arka yüzünden epididimis ile bağlantılıdır. Testis ve epididimis skrotumda bulunur. Testisler vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksus yapılarını içeren spermatik kordon ile vücuda bağlanır. Testislerdeki sıcaklığın vücut sıcaklığından 2-3°C daha düşük olmasının nedeni spermiyogenez için en uygun sıcaklığın 34°C olmasıdır. Rete testisin bulunduğu yerde kalınlaşarak mediastumu oluşturan tunica albuginea testisi çevreler. Mediastumdan testis içine doğru uzanan fibröz septumlar testiküler dokuyu 250-300 lopçuğa ayırır. Her bir lopçukta 1-4 seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller, spermatogenik hücreleri (spermatogonyumlar, spermatozoidler, spermatidler) ve somatik sertoli hücrelerini içeren seminifer epitelyum ile çevrili bir lümene sahiptir. Seminifer epitel bazal membran, fibroblastlar, kollojen lifler ve miyoid hücrelerle çevrelenmiştir. Miyoid hücreler, hareketsiz spermatidleri kasılma hareketleri ile rete testise iletmekle görevlidir. Seminifer tübüllerin açıldığı rete testis testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonları toplayıp ductuli efferentese ileten bir kanallar ağıdır. [3, 27, 64].



Şekil 2-1: Testislerin yapısı, dış genital kanallar ve yardımcı bezler [72]

Testiküler dokuda germinal spermin beslenmesini sertoli hücreleri sağlar. Komşu sertoli hücrelerinin bazolateral bölgelerinde oluşan okludens bağlantıları seminifer epitelyumu bazal ve adluminal bölgelere ayırır. Okludens bağlantıları kan-testis bariyerini oluşturarak gelişmekte olan spermatosit ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan korur. Sertoli hücrelerinin bazalında spermatogoniumlar bulunurken spermatositler ve spermatidler adluminal bölgesinde yer alır [46].

Gelişmekte olan spermatogenik hücrelerin beslenmesi, desteklenmesi ve korunması sertoli hücreleri tarafından gerçekleşir. Spermiyogenez sonunda spermatidler tarafından atılan fazla hücre kısımlarının fagositozunu sağlar. Olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla (spermiyasyon) seminifer tübül lümenine salınımı ile tübül lümenine protein, fruktoz ve iyonlardan zengin sıvı salgılanmasını sağlar. Demir alınımları testiküler transferin aracılığı ile gerçekleşir. Sertoli hücreleri Folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımına karşı Androjen bağlayıcı protein (ABP), inhibin ve aktivin hormonu salgılar. ABP, testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek bağlanma affinitesine sahip salgısal bir proteindir. İnhibin FSH üzerine negatif feedback, aktivin ise pozitif feedback etki gösterir. [46]

Seminifer tübüller arasındaki boşlukta kan damarları, lenfatik kanallar, makrofajlar ve Leyding hücreleri bulunur. Leyding hücreleri endokrin faaliyet gösteren hücreler olup başta testosteron olmak üzere androjenik türdeki hormonları salgılar. Erken embriyonik safhada gonadların erkek yönde farklılaşmasını sağlayan testosteron pubertede sperm üretimi, yardımcı bezlerin salgı üretmesi, ikincil cinsiyet özelliklerin gelişmesi ve ergin erkek bireyde bu özelliklerin devam etmesini sağlar [3, 46].

2.1.2 Dış Genital Kanallar

Bu yapılar epididimis, ductus deferens (vas deferens) ve ductus ejaculatoriusten oluşur.

Epididimis, her bir testisin arka kısmında bulunan, rete testisten ductuli efferentese doğru gelen spermatidlerin toplandığı ve ductus deferense aktarılmadan kısa süre için depolandığı kanal sistemidir. Spermatidler epididimiste hareket ve fertilizasyon yeteneklerini kazanırlar. Ancak ductus epididimis tarafından salgılanan gliserofosfokolin glikoproteininin etkisi ile spermilerin dışı genital sisteme ulaşana kadar kapasitasyonu önlenir. Epididimiste luminal sıvı geri emilimi ve ölü spermilerin fagositozu gerçekleşir [40, 44].

Ductus deferens, mesane arka düzleminde prostatın tabanına doğru ilerler. Vesicula seminalisin boşaltma kanalı ile birleşerek ductus ejaculatoriusu oluşturur. Ejekülasyondan önce spermiler ductus deferenste depolanır.

Ductus ejaculatorius üretraya açılır. Ductus deferens içeriği, vesicula seminalis ve prostat salgısının karıştırılması ile lümenindeki içeriğin fişkırtilarak atılmasını sağlar.

2.1.3 Yardımcı Bezler

Boşaltma kanalları aracılığı ile ürettikleri salgıları genital yollara aktaran bezlerdir. Bu bezlerin salgıları semen hacminin yaklaşık %95'ini oluşturur. Bu bezlerin salgıları spermilerin beslenmesini, hareket yeteneklerinin artırılmasını, ejakulatın sulandırılmasını, vajinanın asiditesinin nötralizasyonunu sağlar.. Bu bezler vesicula seminalis (seminal veziküller), prostat, glandula bulbourethralis (bulbouretral bezler, cowper bezleri)'dir. Testosteron ve dihidroksitestosteron (DHT) tarafından yardımcı bezlerin fonksiyonları düzenlenir [3, 46].

Seminal veziküller, androjene bağımlı bezlerdir. Seminal sıvının yaklaşık %50-70'ini oluşturan ve seminal vezikülleri oluşturan epitel hücreleri tarafından salgılanan C vitamini, prostoglandinler ile spermeleri besleyici ve aktive edici diğer maddeler ve fruktoz yönünden zengin alkalik visköz yapıda bir salgı oluşturur. Seminal vezikül salgıları, boşaltıcı kanalları aracılığı ile vas deferens ile birleşip ductus ejaculatoriusu oluşturmak için prostatı deler.

Prostat en büyük yardımcı genital bez olup salgısını boşaltım kanalları aracılığı ile üretranın prostatik bölümüne boşaltan 30-50 adet tübüloalveolar bezden oluşur. Üretra ve ductus ejaculatoriumu içerir. Semen hacminin %20-30'unu oluşturan, akışkan ve süt benzeri, pH:6.5 olan bir salgı üretir. Bu salgı içeriğinde pıhtılaşmayı önleyici enzimler, sitrat, asit fosfataz, bazı proteolitik enzimler (prostat spesifik antijen, pepsinojen, lizozim, amilaz, hiyaluronidaz) bulunur. Prostatın en önemli işlevi sperm motilitesine ve sperm canlı kalmasına yardımcı olmaktır [3].

Bulbouretral bezler (Cowper bezi), mukus salgılayan bir epitel ile döşeli bir çift bezdir. Mukus salgısı, boşalma öncesi idrar kanalında kalmış olabilecek idrarın nötrale edilmesini sağlar. Siyalitik asit ve bol miktarda galaktoz içeren salgısı penil üretraya boşaltılır.

2.1.4 Penis (Phallus)

Farklılaşmış toplardamar ve kılcal damarlardan türemiş, silindirik kolon şeklindeki üç adet erektil doku kütesinden oluşan cinsel birleşme ve boşaltım organıdır.

2.2 Spermatogenesis ve Spermiyogenesis

Seminifer tübüllerde testosteron etkisi ile haploid (n) kromozumlu sperm oluşumuna spermatogenesis denir.

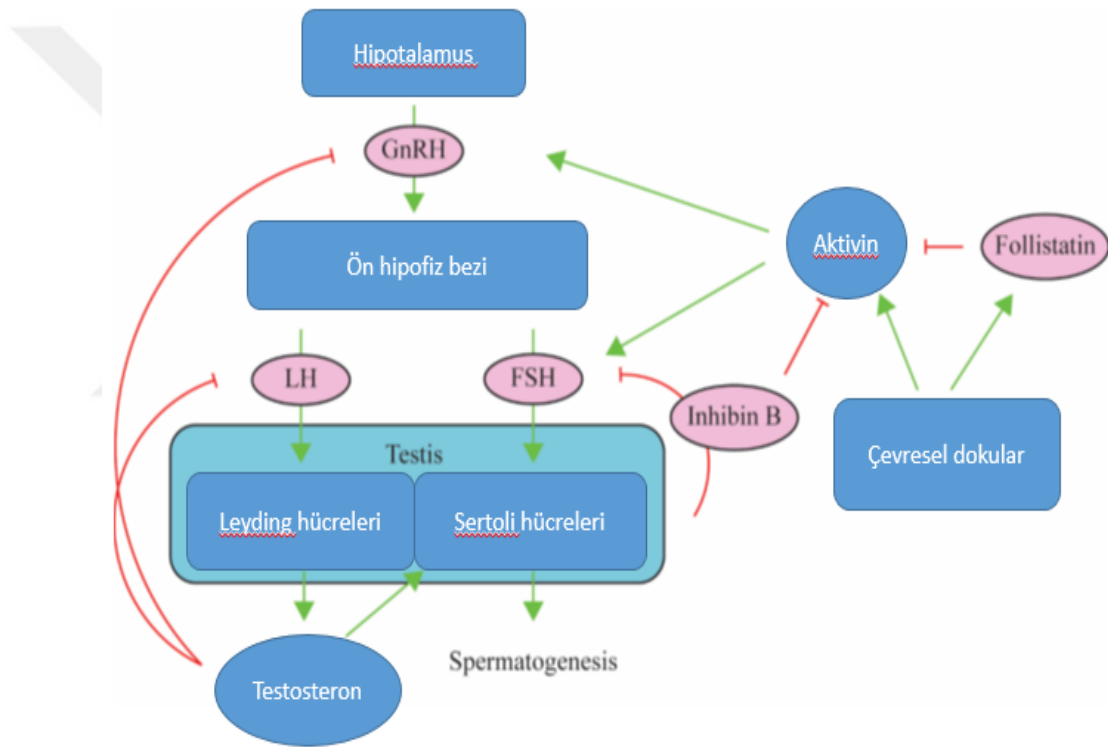
Spermatogenesis sonucu oluşan spermatidlerin FSH etkisi ile olgunlaşma sürecine girmesine spermiyogenesis denir.

2.2.1 Spermatogoniumlar

Seminifer tübülün bazal kısmında, bazal lamina ile direkt ilişkide olan, spermatogonial kök hücrelerden köken alan, diploid (2n) kromozumlu spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri sırasındaki okludens bağlantılarının seminifer tübül lümenine bakan kısmında bulduklarından kan-testis bariyerinin dışında kalırlar. Buna rağmen mitoz bölünmelere başlayan spermatogoniumlar ve spermatogenik kök hücrelerin kan-testis bariyerinin açık kısmında korunmasız kalması ile oluşan genotoksisite, bu hücrelerden köken alan bir sonraki neslin germ hücre popülasyonundaki mutasyonlara sebep olan genetik değişikliklere yol açar. Kan-testis bariyeri birçok ksenobiyotiğe geçirgen olup toksitlerin büyük miktarı, germ hücreleri kan-testis bariyerinin yakınında olmasına rağmen bariyeri geçip spermatogenik kök hücrelere ulaşabilir. Toksitler, spermatogenesi boyunca DNA tamir mekanizmasının doğru gerçekleşmemesine sebep olur. DNA hasarının oluşması sonucu spermden kaynaklanan infertilite veya zigotta anormal değişiklikler görülebilir [11].

Spermatogoniumlar testosteron etkisi ile pubertede aktifleşir. Morfolojik olarak üç tip spermatogonium gözlenir: spermatogonium A koyu ve spermatogonium A açık, spermatogonium B. Seminifer tübülün bazalında bulunan spermatogonium A koyu hücresi mitoz bölünme sonrası spermatogonium A açık hücresine, bu hücre mitoz bölünme ile spermatogonium B hücresine dönüşür. Oluşan her spermatogonium hücresi mitoz bölünme geçirdiği için diploid (2n) kromozomludur. Spermatogonial hücre farklılaşmasının denetlenmesinde sertoli hücrelerinde bulunan SCF (stem cell factor) proteini ve spermatogoniumlarda yer alan c-kit proteini etkilidir. Ayrıca retinoik asit, sertoli hücreleri ve spermatogonium hücrelerinden retinoik asit reseptörlerinin

salgılanmasını uyararak α 8 proteini salgılanmasını uyarır. α 8 proteini, germ hücrelerinin mayoza başlamasına öncülük eder. Spermatogoniumlarda farklılaşma SCF/c-kit, retinoik asit, α 8 proteininin yanı sıra hormonlar tarafından düzenlenir. FSH (Folikül stimüle edici hormon), sertoli hücrelerinin inhibin ve aktivin sentezini başlatırken LH (Luteinleştirici hormon), Leyding hücrelerinin testosteron üretmesini uyarır [33, 79, 91, 94]. Erkek üreme sisteminde görevli hormonların regülasyonu Şekil 2-2'de, bu hormonların görevleri Tablo 2-1'de gösterilmiştir.



Şekil 2-2: Hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksenin feedback regülasyonu

Tablo 2-1: Sperm üretimi için gerekli hormonlar ve etkileri

Hormon	Etkisi
GnRH	FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını sağlar. Hipotalamustan salgılanır
FSH	Sertoli hücrelerini uyararak sperm üretimini sağlar. Hipofiz bezinden salgılanır.
LH	Leydig hücrelerinde testosteron sentezlenmesini ve sperm üretiminin devamlılığını sağlar. Hipofiz bezinden salgılanır.
Prolaktin	LH'ın Leyding hücreleri üzerindeki etkisini artırır. Hipofiz bezinden salgılanır.
Testosteron	Sperm üretiminin devamlılığını sağlar. Leyding hücrelerinden salgılanır.
Estradiol	LH sentezini kontrol eder. Karaciğer, kas ve yağ dokusunda testosteronun metabolize edilmesi ile oluşur. %20-25'i Leyding hücrelerinden salgılanır.
İnhibin	FSH salınımını engeller. Sertoli hücrelerinden salgılanır.
Aktivin	FSH salınımını artırır. Leydig hücrelerinden salgılanır.

2.2.2 Spermatozoidler

Spermatogonium B hücreleri mitoz bölünmelerden sonra 4n DNA içerikleri ile I. mayoz bölünmenin profaz aşamasına girer. Mayotik profazın ilk evresi olan leptotende DNA iplikçik haldedir. Zigoten evresinde belirginleşen homolog kromozomların (otozomlar ve cinsiyet kromozomları X ve Y) eşleşmesi için sinaps oluşumunu kolaylaştıran sinaptonemal kompleks oluşur. Homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri kendi aralarında sinapsis oluştururlar. Pakiten evresinde ise homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri kiazmata bölgeleri üzerinde crossing over (gen alışverişi) gerçekleştirir. Cinsiyet kromozomları olan X ve Y arasında crossing over, pseudootozomal kısımlarda gerçekleşir. Diploten evresinde kiazmaların kromozomların uçlarına doğru kayması ile homolog kromozomlar serbest kalır. Diakinez evresinde eşleşmiş homolog kromozomların ayrılması (disjunction) ile kardeş kromatid çiftleri metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçer. Oluşan yavru hücreler 2n kromozumlu sekonder spermatozoidleri oluşturur. Sekonder spermatozoidlerdeki homolog kromozomlar mayoz II'nin metafazında birbirinden ayrılır. Oluşan yeni

hücrelerdeki kromozom sayısı (n) yarıya inmiş olur. Oluşan bu hücrelere spermatid denir [9, 40, 46].

2.2.3 Spermatidler

Haploid spermatidler semifer tübül lümenine yakın yerleşmiştir. Spermatid oluşumundan (spermatogenesis) sonra spermiyogenesis gerçekleşir.

Spermatidin sitoplazmasında Golgi kompleksi, bir çift sentriol, mitokondriler, düz endoplazmik retikulum tübülleri ve serbest ribozomlar bulunur [2].

1. Golgi evresi: Granüllü endoplazmik retikulumunda (GER) sentezlenen ve spermatidin oosite tutunmasını sağlayan hidrolitik enzimler (hyaluronidaz, akrozin, nöeminidaz, asit fosfataz, tripsin benzeri proteazlar) Golgi kompleksine aktarılır. Akrozomal veziküller, hidrolitik enzimlerin Golgi kompleksinin trans yüzeyinden proakrozomal granül halinde salındıktan sonra birleşerek oluşurlar. Çekirdek membranına yapışık halde bulunan akrozomal veziküller spermin ön kutbunu belirler. Bu evrede, bir çift sentriyol flegellum aksenemini oluşturmak amacıyla akrozomal bölgenin zıt kutbuna hareket eder [40, 46].

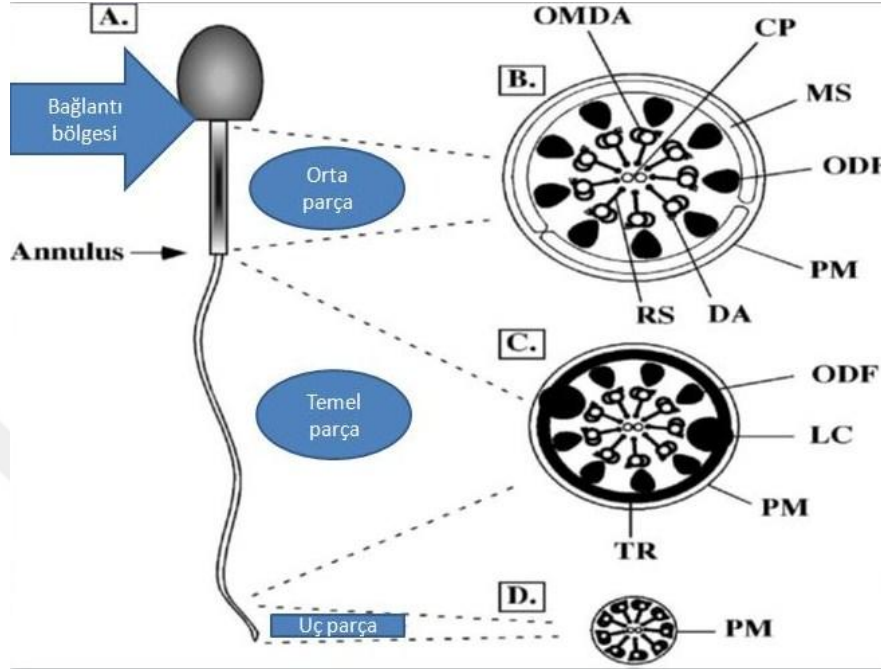
2. Şapka (Kep) evresi: Akrozomal vezikülün genişleyip ile nükleusun ön kısmı yarıya kadar sarılmaya başlar. Sentriyol çiftinin akrozomal vezikülün zıt kutbuna ulaşmasından itibaren akrozomal bölge sentriollere zıt şekilde döner. Akrozomal vezikülün son haline akrozom denir [40, 46].

3. Akrozomal evre: Spermatid morfolojisindeki değişimler belirgindir. Akrozom nükleusu sarmaya devam ederken manşet gelişmeye başlar. Nükleus yassılaşıp DNA heterokromatin yapıya dönüşür. Mitokondriler sitoplazmada yer değiştirir ve hücre uzamaya başlar.

İlk olarak 8 spermatidli evrede görülen ve mikrotübül-aktin filamenti yapısında olan manşet, nükleusun etrafında çevrelenmiş perinükleolar halkanın arasında mikrotübüler kökenli bir yapı oluşturur. Sperm baş kısmının şekillenmesinde aktin ve bağlantılı motor proteini miyozin rol oynar [51].

4. Flagellumun (kamçı) gelişmesi: Kamçı, distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun lifler ve bir fibröz kılıf ile sarılı aksoneme sahiptir. α ve β tübülün heterodimerlerinden oluşan aksonem, sentriyolden (mikrotübül düzenleme merkezi,

MTOC) köken alıp eşmerkez dizimli 9+2 mikrotübül çiftlerinden oluşur (Şekil 2-3). Gelişen aksonem boyunca mitokondri göçü gerçekleşir.



Şekil 2-3: Memeli sperm hücresi ve kuyruk yapısı [86]

PM: Plazma membranı, MS: mitokondriyal kılıf, ODF: Dış yoğun lifler, OMDA: aksonemin dış mikrotübül çiftleri, DA: Dynein kollarlı, RS: Işınsal kol, CP: Merkezi mikrotübül çifti, LC: Fibröz kılıfın boyuna sütunu, TR: enine giriş.

5. Olgunlaşma evresi: Bu evreden itibaren belirgin bir RNA sentezi yoktur. Kamçının orta kısmında dış yoğun liflerin çevresinde mitokondriyeler tarafından sarmal bir kılıf oluşur. Manşet kuyruğa doğru ilerler. Keratin içeren dış yoğun lifler aksonem boyunca dizilirler. Somatik nukleoproteinler olan H1, H2A, H2B, H4 yüksek oranda arginin ve sistein aminoasitleri içerirler. Pozitif yüklü protamin ve negatif yüklü DNA arasında moleküller arası kuvvetli etkileşim, DNA ile bazik karakterli protaminin bağlanmasını kolaylaştırır. Somatik histonların arginin ve lizin zengini protaminlerle yer değiştirmesi sonucu sperm nukleusunda kromatin yoğunlaşması gerçekleşir. Ca^{+2} /calmodulin bağımlı protein kinaz IV histonların değişim mekanizmasında rol oynar. Sperm DNA'sı kromatinin kondensasyonu ile küçük ölçekte paketlenir. Nukleus uzar ve manşet dağılır. Olgunlaşmaya devam eden spermatidler arasındaki sitoplazmik köprülerin ortadan kalkmasıyla spermilerin sahip oldukları fazla sitoplazma, artık cisimcik olarak atılır. Artık cisimcikler, sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir.

Seminifer túbül lúmeninde spermatidlerde gerekleŒen deęiŒikler ile ture has genetik özellikleri taŒıyan fakat hareket ve dölleme yetenekleri olmayan spermatozoa oluŒur [2, 29, 46].

Spermiyogenesisden sonra olgunlaŒmamıŒ spermiler, hareket ve döllenme yeteneği kazandıkları spermiyasyon amacıyla rete testis úzerinden ductus epididimise geçerler. Spermatogenesis, seminifer túbüllerden baŒlayıp ductus ejaculatoriusa ulaŒana kadar yaklaŒık 72 günde tamamlanır.

Orgazm ile penisten çıkan salgıya ejakulat (semen, meni) denir. Semen opak, beyaz-sarımsı grúnüŒte olup testis, epididimis, vesicula seminalis, prostat ve bulbouretral bezlerin salgılarının toplamıdır (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: İnsan seminal plazmasında bulunan eŒitli maddeler [73]

Sodyum	Potasyum	Kalsiyum	Ergotionin
Magnezyum	Klorür	inko	Glutamik asit
Bikarbonat	Fruktoz	Glukoz	Bakır ve kükürt
Sorbitol	İnozitol	Laktik asit	Putresin
Pirüvik asit	Sitrik asit	Noraminidaz	Arjinin
Karnitin	Asetil karnitin	Gliserofosfokolin	Spermin
Askorbik asit	Askorbik asit	Spermidin	Ürik asit
Kreatin	Prostaglandin	Fosfokolin	

2-5 ml olan semen hacminin %1'lik kısmını sperm (60-120 milyon/ml) oluŒtururken semenin pH değeri 7,2-7,7 arasında deęiŒir. Semen karakteristik zellikleri Tablo 2-3'de verilmiŒtir.

Tablo 2-3: Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri (yüzdeleri ve % 95 güven aralıkları) [45]

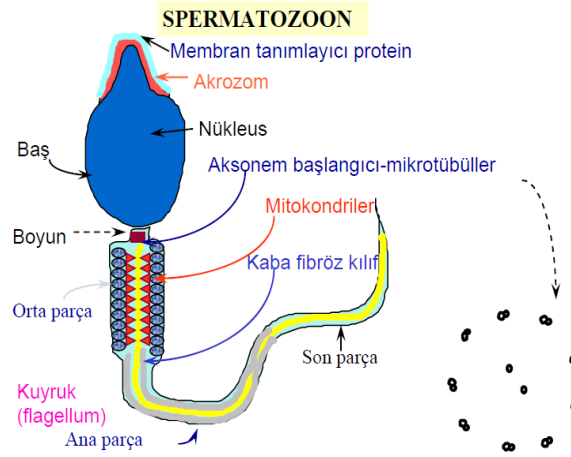
Parametre	Alt referans sınırı
Semen hacmi (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Toplam sperm sayısı (10^6 /ejakülat)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 /ml)	15 (12-16)
Toplam motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
İleriye doğru hareketlilik (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3,0-4,0)
Uzlaşılacak diğer eşik değerler	
pH	$\geq 7,2$
Peroksidaz pozitif lökositler (10^6 /ml)	$< 1,0$
MAR testi (partiküllere bağlı hareketli sperm, %)	< 50
<i>Immunobead</i> test (%)	< 50
Seminal çinko (μmol /ejakülat)	$\geq 2,4$
Seminal fruktoz (μmol /ejakülat)	≥ 13
Seminal nötral glikozidaz (mU/ejakülat)	≥ 20

2.3 Sperm Morfolojisi

Haploid (n) sperm hücreleri, yoğunlaşma ve uzamayı içeren yapısal değişimleri spermiyogenesisin son evresinde geçirir. Böylece sperm hücrelerinin ana kısımları olan baş ve kuyruk meydana gelir. İnsan sperm hücresi uzunluğu yaklaşık $60 \mu\text{m}$ 'dir (Şekil 2-4).

2.3.1 Baş kısmı

Sperm baş kısmı ön yarısını akrozomun çevirdiği nükleus oluşturur. Sperm nükleusu yoğunlaşmış ve yassılaşmış bir yapıya dönüşür. Akrozomal enzimler, yumurta hücrelerini saran corona radiata ve zona pellucida engelini ortadan kaldırmak amacıyla fertilizasyon esnasında salınır. Sperm, bir bağlantı parçası ile kuyruğa bağlanır.



Şekil 2-4: Sperm yapısı ve bölümleri [14]

2.3.2 Kuyruk kısmı

Sperm kuyruk kısmı yapısal olarak dört ana kısma ayrılır.

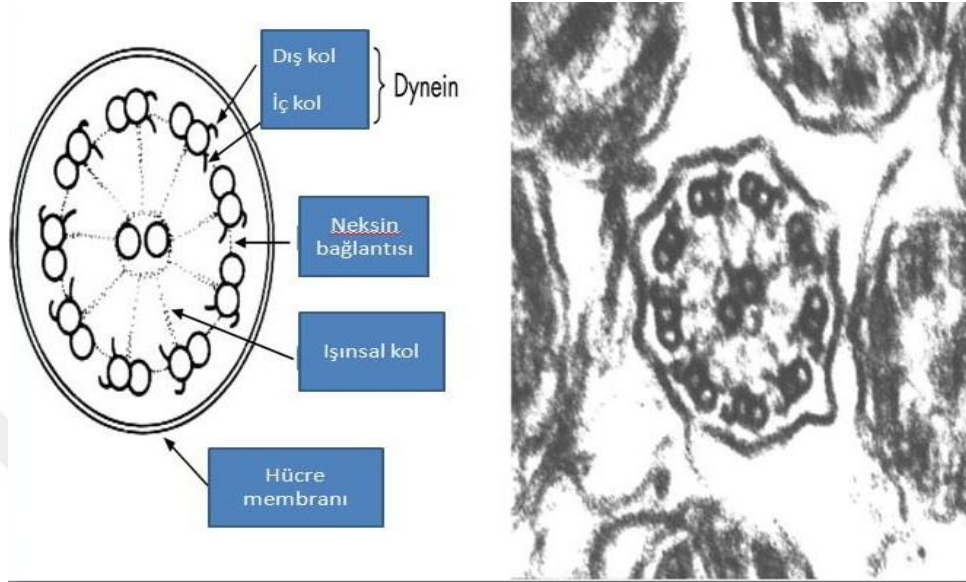
a) Bağlantı parçası: Yoğun fibröz yapıda olan dar bir kısımdır. Aksonemin kuyruk boyunca uzaması bu kısımdan başlar [46].

b) Orta parça: Sarmal olarak dizilmiş mitokondriler, aksonem ve dış yoğun liflerden oluşur. Bağlantı parçasından esas parçaya kadar uzanan dokuz kolon bulunur.

Aksonem bir hücre iskeleti yapısı olup merkezde 2 çift ve merkez etrafında çevrili 9 çift mikrotübülden oluşur. Her mikrotübül çifti üzerinde kuyruk hareketinin oluşmasından sorumlu, içe ve dışa dönük şekilde konumlanmış dynein kolları bulunur (Şekil 2-5). Dynein kolları, komşu mikrotübül çiftleri arasındaki kayma hareketinden sorumlu olup dynein I proteininden oluşur. Kayma hareketi için enerji kaynağı olarak fazla miktarda ATP'ye ihtiyaç duyulur. Aksonemde bulunan yapısal proteinler ve enzimler, ATP'den elde edilen kimyasal enerjinin mekanik enerjiye dönüşmesini sağlar. Laktatı oksidatif substrat olarak kullanabilme yeteneği, hipotonik ortama ve yetersiz Ca^{2+} girişine dirençli olması nedeniyle sperm mitokondrileri diğer mitokondrilerden farklılık gösterir [61, 72, 86].

Aksonemi saran dış yoğun lifler aksonemin etrafını sarar. Yapısında bulunan yoğun miktardaki çinko (Zn^{+2}), sperm kuyruğunu oksidasyondan koruyup sağlam bir yapı kazandırır. Zn'nin %60'ından fazlası epididimal geçiş sırasında spermden atılır.

Disülfid köprülerinin artması ve sülfidril grubunda azalma ile dış yoğun liflerin yapısında sertleşme ve kararlılık sağlanır.



Şekil 2-5: Siliar aksonemin temel yapısı ve şematik görüntüsü [17]

2.4 Sperm Metabolizması

Sperm metabolizması, aksonemdeki dynein kollarının birbirlerinin üstünden kaymasını sağlayarak sperm motilitesini ve fertilizasyon sırasında akrozomal enzimlerin ekzositoz ile dışarı atılmasını sağlar. Gerekli olan enerji ATP, GTP ile NADPH moleküllerinde saklanan fosfat molekülünden sağlanır [4].

Sperm glikoliz, oksidatif fosforilasyon (Krebs, sitrik asit siklusu) veya pentoz fosfat yolundan sağlanan enerjiyi kullanır.

Sperm hücre membranında bulunan GLUT proteinleri ile glikoliz için gerekli olan glukoz hücreye alınır. Kuyruğun esas ve son parçasında gerçekleşen glikoliz ile ATP üretilir. Glikolizde görevli heksokinaz ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimleri fibröz kılıfta yer alır. Spermatidlerde glikoliz inhibe edilir [44].

Oksidatif fosforilasyon, sperm orta kısmındaki mitokondrilerde gerçekleşir. Oksidatif fosforilasyon için gerekli olan asetil CoA yağ asitlerinden doğrudan veya glikolizin son ürünü pürivatın matriks kristasında laktata dönüştürülmesi ile elde edilir.

Oluşan ATP'nin büyük bir kısmı aksonemin yapısındaki dynein kollarında yer alan dyneinATPaz'lar tarafından kullanılır [4].

Pentoz fosfat yolu hücrenin ihtiyacı olan NADPH seviyesinin artışı sağlar, nükleotid sentezinde gerekli olan riboz fosfatlar elde edilir, monosakkaritlerin birbirine dönüşmesini sağlayarak glikolizde kullanılmasını sağlar [44].

2.5 Sperm Motilitesi

Sperm hareketinden sorumlu olan aksonem spermin kuyruğu boyunca dokuz adet yoğun dış lif ile çevrili hücre içi iskeletidir. Merkezinde 2 adet mikrotübül ile bunun etrafında 9 çift mikrotübülden oluşur. Aksonem hareketi ile oluşan flagellar kıvrılma için gerekli olan enerji, Mg^{+} -bağımlı dynein-ATPaz'ın ATP'yi hidroliz etmesi ile elde edilir. Aksonemal hareketi düzenleyen faktörler arasında cAMP (siklik AMP), kalsiyum (Ca^{+2}), adenil siklaz, pH, serin proteaz, protein karboksil metilaz bulunur [52].

Aksonem gelişimi seminifer tübüllerde başlayıp epididimiste tamamlanır. Epididimiste hareket kasılma ve hidrostatik basınç yolu ile gerçekleşir. Epididimisten salgılanan ileri hareket proteini (forward motility protein) ile doğrusal hareket sağlanır. Spermin epididimisten geçişi sırasında:

- Sperm kuyruğu ile nukleus arasında disülfid bağları oluşur.
- Sperm membranındaki sülfidril grupları okside olur.
- Glikoliz kapasitesi artar.
- Adenilat siklaz aktivitesi artar.
- Membran fosfolipid içeriği değişir [40].

Spermler dışı genital kanalına ulaştıklarında metafaz-2 evresindeki oositi döleyecek yeterli hareket ve yeteneğe sahip değildir. Sperm motilitesinin başlamasında ve düzenlenmesinde cAMP, pH ve Ca etkilidir. Sperm motilitesi için cAMP üretimi adenil siklaz ile düzenlenirken, sperm motilite inaktivasyonu fosfodiesterazlar ile sağlanır. Sperm plazma membranındaki değişiklikler sonucu spermin moleküler ve fizyolojik değişiklikler geçirerek fertilizasyon yeteneği kazandığı kapasitasyon süreci başlar [4].

2.6 Erkek İnfertilitesi

Herhangi bir korunma yöntemi olmaksızın 1 yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen üreme fonksiyonunun yerine getirilememesi sonucu çocuk sahibi olamama durumuna

infertilite denir. Erkek hastalarda infertilite tanısını koyabilmek için incelenen olgular şunlardır:

- Dişi bireyde belirlenmiş bir sorun olmadığı halde 6 aylık korunmasız süreç sonucu çocuk sahibi olamamak.
- Toplam sperm miktarının <5 milyon/ml'den daha az olması.
- Toplam spermin %50'sinden fazlasının anormal morfolojiye sahip olması.
- Sperm yumurtayı delme yeteneğinin bulunmaması [40].

2.6.1 Erkek İnfertilitesinin Sebepleri

2.6.1.1 Testiküler Nedenler

Testiküler hasar, testiküler tümör, seminal kanallarda tıkanıklık, seminal sıvı bozuklukları bu nedenler arasındadır.

2.6.1.2 Testiküler Ven Varikozu (Varikosel)

Testis toplardamarlarının normalden fazla genişlemesi ile testislerde atrofi oluşmasıdır. Varikosel sonucu testisin beslenmesi ve oksijen kullanımı azalmakır ve bunun sonucunda sperm üretiminde gelişim bozukluğu ortaya çıkabilir.

2.6.1.3 İnmemiş Testis (Kriptorşidizm)

Gelişim sürecinde testisin skrotuma ulaşamaması sonucu karın boşluğu veya inguinal kanalda kalmasıdır. Skrotum iç sıcaklığında artış olduğundan spermatogenez mekanizması bozulur. Testis içyapıları yüksek sıcaklıktan dolayı geri dönüşümsüz olarak bozulur. Böyle testislerde Leyding hücreleri işlevini gerçekleştiremez [57].

2.6.1.4 Genital Kanal Anatomisi Bozuklukları

Vas deferensin konjenital yokluğu, vas deferensin obstruksiyonu, ejakülatör sistemin konjenital anomalileri anatomik bozukluklar arasındadır.

2.6.1.5 Germinal Hücre Aplazisi

Semimifer tübüllerde sadece sertoli hücrelerinin bulunup germinal hücrelerin gelişememesidir. Germinal hücre aplazisine sahip bireyler infertildir [57].

2.6.1.6 Retrograd Ejakülasyonu

Semenin boşalma sırasında penisin ucundan dışarı atılmak yerine mesane içine akmasıdır.

2.6.1.7 Sperm Kordonunun Bükülmesi (Testis Torsiyonu)

Spermatik kordonun bükülmesi sonucu testislere gelen arteriyel kan akımı ve testislerden giden venöz kan akımı bozulabilir.

2.6.1.8 Ejakülasyon Oluşmaması

İktidarsızlık, erektil disfonksiyon, prostat cerrahisi, üretra cerrahisi, diyabet ya da tansiyon ile ilgili uygulamalar sonucu ortaya çıkabilir.

2.6.1.9 İmmünolojik İnfertilite

Spermatozidler, spermatidler ve spermiler immün sistem için yabancı antijen olarak karşılanır. Normalde ise seminifer tübül içerisinde kan-testis bariyeri bulunur ve immün hücreleri bulunmaz.. Fakat rete testis ve epididimis, zayıf hücresel bağlantılara sahiptir ve makrofajlar bulundurur. Epididimiste travma sonucu sperm antijenlerinin miktarının artması sonucu oluşan immün yanıt patolojik sonuçlar doğurur.

2.6.1.10 Hiperprolaktinemi

Dopaminin cinsel istek ve davranışları uyarır ve prolaktinle ilişkilidir. Prolaktin cinsel isteği uyarmasına karşın fazla miktarda sentezlenmesi devam ettiğinde oluşan aşırı uyarı dopamin reseptörlerinde yıkıma yol açmaktadır. Sürekli prolaktin salınımı inhibitör etki meydana getirerek cinsel işlevlerde kayıp meydana getirmektedir [48].

2.6.1.11 Genetik Nedenler

2.6.1.11.1 Anöplidi

Bir veya iki kromozomun kaybı ($2n-1$, $2n-2$ vb.) ya da artışıyla ($2n+1$, $2n+2$ vb.) oluşan kromozom anomalisidir. Germ hücrelerinin mayoz bölünmeleri sürecinde ayırlamaması veya anafazda geri kalmaları sonucu bir kromozomun homoloğu ile yavru hücreye geçişi sonucu oluşur.

2.6.1.11.1.1 Klinefelter Sendromu

Erkekler, X ve Y olmak üzere 2 farklı cinsiyet kromozomuna sahiptir. Sayısal kromozom anomalilerinden biri olan Klinefelter Sendromunda hastaların karyotipi $47,XXY$, $48,XXX$, $48,XXYY$, $49,XXXXY$, $46,XY/47,XXY$ şeklindedir [12]. Klinefelter sendromu görülen bireylerdeki fenotipik özellikler Tablo 2-4'de verilmiştir.

Tablo 2-4: Erişkin Klinefelter sendromu hastalarında görülen bulgular [12]

Küçük testisler	İnfertilite	Azospermi
Artmış gonadotropin seviyeleri	Jinekomasti	Kas gücünde azalma
Azalmış testosteron düzeyi	Variköz venler	Metabolik sendrom
Azalmış fasiyal kıllanma	Libidoda azalma	Tip-2 diyabet
Azalmış pubik kıllanma	Osteopani	Mitral kapak prolapsusu
Abdominal obezite	Osteoporoz	

2.6.1.11.1.2 Down Sendromu (Trizomi 21)

Gametogenez sonucu fazladan bir X kromozomu taşıyan gametin normal haploid gamet ile döllenmesi sonucu görülen bir durumdur. Down sendromlu erkek bireylerde germ hücre sayısı azalmış ve spermatogenez gerçekleşmemektedir.

2.6.1.11.1.3 XYY Sendromu

Gametogenez sonucu fazladan bir Y kromozomu taşıyan gametin normal haploid gamet ile döllenmesi sonucu görülen bir durumdur. Üreme hücrelerinde olgunlaşmanın durması ya da yokluğu görülür [64].

2.6.1.11.1.4 XX Erkek Sendromu

Y kromozomunun kısa kolu (Yp) üzerinde bulunan SRY gen bölgesinin X kromozomuna translokasyon sonucu oluşur. *Sry* geni transkripsiyonu gerçekleşmesine rağmen azospermi görülür [64].

2.6.1.11.2 Kistik Fibrosis

Kistik fibrosis (CF), kistik fibrosis transmembran regülatör (CFTR) genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan otozomal resesif geçişli konjenital bir rahatsızlıktır. CFTR geni, iyon kanalı olarak işlev gören bir membran proteinini kodlar. Ayrıca CFTR geni ejakülatör kanal, seminal vezikül, ductus deferens ve epididimisin distal 2/3'sinin oluşumunu etkiler. Bu nedenle CFTR genindeki mutasyon, ductus deferens gelişiminin olmaması ile sonuçlanır.

2.6.1.11.3 Primer Silier Diskinezi [İmmotil Silia Sendromu]

Otozomal resesif geçişli olup sil ve flagellar hareket yokluğu veya bozukluğu görülür. İnfertil erkeklerde sperm kuyruk aksonemlerinde mikrotübül ve dynein kollarında defektler ile karakterizedir.

Aksonemde yapısal bulgular:

- İç ve dış güç kollarında kayıp
- İç kollarda kayıp, dış kollarda kısalık
- İç kollar, neksin bağlantıları ve radyal uzantılarda kayıp
- Mikrotübüler ikililerde bozulma
- Dış güç kollarında kayıp
- Radyal bağlantı ve bağlantı başlarında kayıp
- Merkezi mikrotübüler ikililerin eksik veya defekte olması [17, 32].

Siliilli hücrelerin aksonemlerine ait bazı defekleri içeren sendromlar tanımlanmıştır. Bunlar arasında Kartagener sendromu ve Usher sendromu bulunur.

2.6.1.11.3.1 Kartagener Sendromu

Otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Genetik hasar dynein genindeki mutasyon veya delesyondan kaynaklanır. Kronik sinüzit, bronşektazi, retinitis pigmentosa, sağırılık ile karakterizedir. Spermatogenez bozulmamasına rağmen immotil sperm oluşumu görülür [48].

2.6.1.11.3.2 Usher Sendromu

Retinal fotoreseptörler ve odyovestibüler organlardaki silier defekt sonucu oluşan, retinitis pignemtosa ve sağırılık ile birlikte görülen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Sperm motilitesindeki bozukluk nedeniyle infertiliteye neden olmaktadır [17].

2.6.1.11.4 Miyotonik Distrofi

19. kromozom üzerinde serin-treonin kinaz proteinini kodlayan bir gendeki CTG trinükleotid tekrarı ile oluşan otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Erişkin dönemde başlayıp kas zayıflığı ve atrofisi, katarakt, endokrinopatiler görülür. Sperm kapasitasyonunda defekt ve akrozom reaksiyonlarında bozukluk infertiliteye sebep olabilir [48].

2.6.1.11.5 Noonan Sendromu

Noonan sendromlu infertil erkeklerde kriptorşidizm görülür [48].

2.6.1.11.6 Orak Hücre Anemisi

Otozomal resesif geçişli, 11. Kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan β -globin (HBB) geninde meydana gelen nokta mutasyonlar nedeniyle normal hemoglobinin beta zincirinin 6. sırasındaki glutamik asit aminoasitinin yerine valin aminoasitinin gelmesiyle oluşan bir hastalıktır. Testislerde fonksiyon bozukluğu, çok sayıda kan transfüzyonu sonucu gonadlarda gelişen demir depozisyonu gelişimi infertiliteye sebep olmaktadır [48].

2.6.1.11.7 Polikistik Böbrek Sendromu

Hastaların böbrek, karaciğer, epididimis ve seminal veziküllerinde çok sayıda kist bulunur [41].

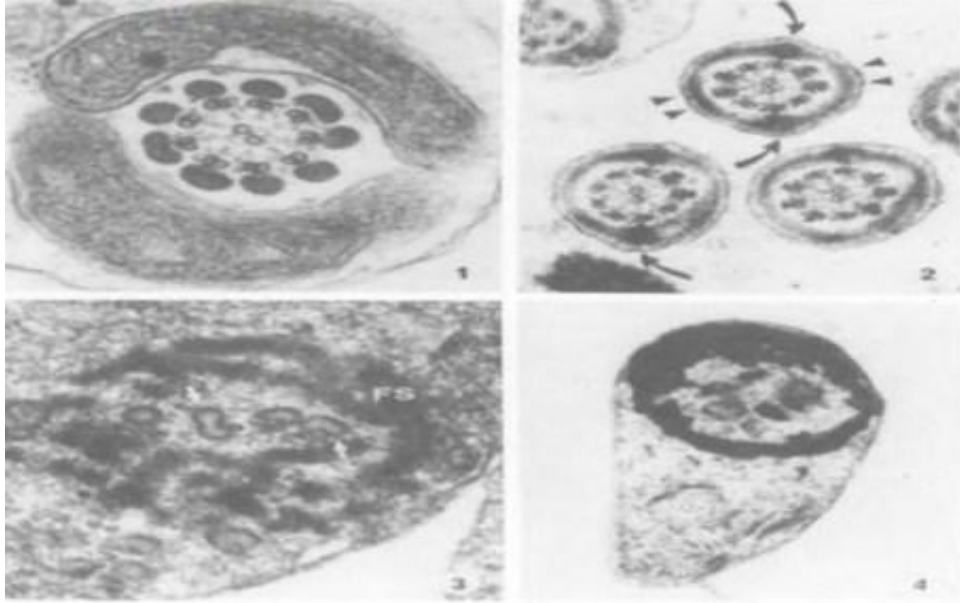
2.6.1.11.8 Fibröz Kılıfın Displazisi (Dysplasia of Fibrous Sheath, Küt Kuyruk Sendromu)

Fibröz kılıf displazisi, aksonemal hücre iskeletinin gelişim bozukluğu ile karakterize genetik sperm yapı bozukluğudur. Spermiyogenesis sürecinde gelişen bozuk fibröz kılıf sperm kuyruğunun kısa, kalın ve düzensiz olmasına yol açar. Motilite bozukluğunun sebepleri:

- Merkezi mikrotübül çiftinin kaybı
- Güç kollarının yokluğu
- Dış yoğun liflerden 3. ve 8.'de anormal uzantılar parçalarda birleşme bozukluğu (Şekil 2-6) [19].

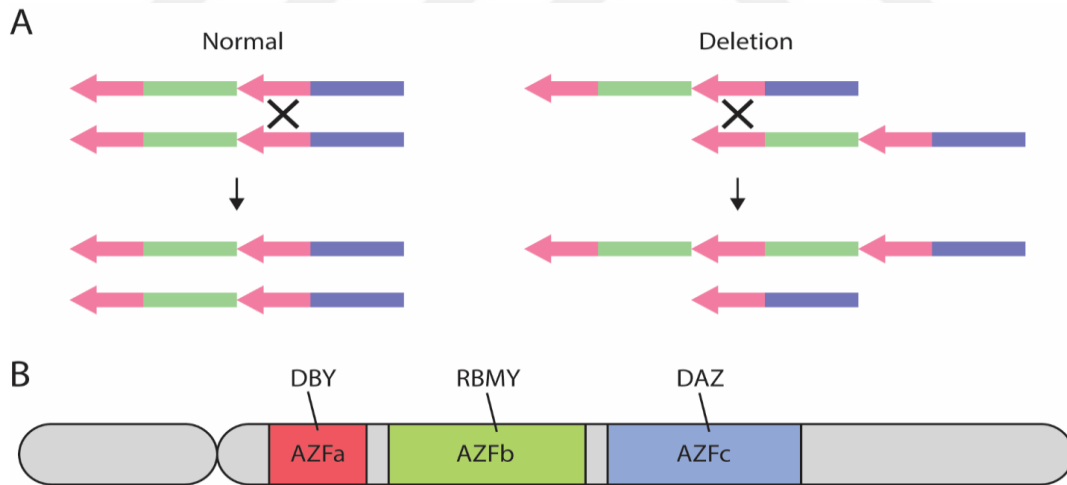
2.6.1.11.9 Y kromozom Mikrodelesyonları

Testis gelişiminde ve spermatogenezde rol alan genler, Y kromozomunun kısa kolundaki (Yp) SRY bölgesinde bulunur. Azospermi görülen erkeklerin bir kısmında Y kromozomunun uzun kolunda delesyonlar saptanmış ve bu bölge azospermi faktör bölgesi (AZF) olarak adlandırılmıştır. AZF bölgesindeki genler spermatogenezle ilgili genlerdir. Y kromozomunun AZFa bölgesinde yer alan genler spermatogenezde rol oynarlar. AZF bölgeleri arasında delesyonlar en sık AZFc bölgesinde görülmekte olup spermatogenez düşük seviyede gerçekleşir [91] (Şekil 2-7).



Şekil 2-6: Fibröz kılıfın dizplazisi

1 ve 2 Normal görünümlü aksonem ve fibröz kılıf. 3 Dağınık fibröz kılıf ve parçalanmış, dağınık aksonem. 4 Bozuk yapılu kamçı. Aksonemi kayıp ve fibröz kılıf düzgün olmayan kalınlıkta halka halinde. [19]



Şekil 2-7: Y kromozomunda delesyon

A: Y kromozomları arasında normal crossinover ve yanlış eşleşme sonucu oluşan crossinover

B: Y kromozomu üzerinde erkek cinsiyet genleri

2.6.1.11.10 Cinsiyet Kromozomları Arasında Resiprokal Translokasyonlar

Y kromozomundaki genlerin transloke olması genlerin inaktivasyonuna sebep olup mayotik eşleşmeyi engelleyebilirken X kromozomundaki genlerin translokasyonları sonucu spermatogenez bozulur [64].

2.6.1.11.11 Resiprokal Otozomal Translokasyonlar

Translokasyonlar 1-9, 1-16, 16-1, 18-3/4 kromozomları arasındadır. Mayoz I' in pakiten safhasında XY bivalentleri ile transloke kromozomların sentromerik kaynaşması ile ilgili kanıtlar bulunmuştur. Translokasyon sonucu primer spermatisitlerde X kromozom inaktivasyonunu geliştirmekte ve spermatogenezisi etkilemektedir [64].

2.6.1.11.12 Robertson Tipi Translokasyonlar

Robertsonian translokasyonlar, akrosentrik kromozomların sentromerik bölgelerinden kaynaşması sonucu oluşur. 13. ve 14. kromozomlar arasındaki robertsonian translokasyonun infertil erkeklerde ortak olduğu belirlenmiştir [64].

2.6.1.12 Genetik Endokrinopatiler

Cinsel gelişme ve fonksiyonun endokrin veya humoral regülasyonunda görevli olan spesifik genlerde meydana gelen mutasyonlar veya polimorfik değişiklikler sonucu rahatsızlıklar gelişir [48].

2.6.1.12.1 Hipogonadotropik Hipogonadizm (IHH)

Anatomik sorun olmaksızın folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) seviyelerinde görülen düşüklük, gonadotropin regüle edici hormonun (GnRH) anormal sentezi ve salınımı sonucu oluşabilir. Gonadotropin seviyesindeki anormallik nedeniyle androjen üretimi azalır ve spermatogenesis yetersiz kalır.

X'e bağlı kalıtım gösteren ve IHH'nın bir sebebi olarak bilinen Kallman sendromlu bireylerde, X kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan Ka1 genindeki bir mutasyon, hipotalamustan GnRH salınımının bozulmasına sebep olur. Hastalarda renal anomaliler ve krişortizm görülür. Prader-Willi sendromunda da 15. Kromozomun uzun kolu üzerinde meydana gelen bir delesyon sonucu obezite, krişortizm ve IHH meydana gelir [48].

2.6.1.12.2 LH Fonksiyon Bozuklukları

Hipofizden salgılanan luteinleştirici hormonun (LH) inaktif üretimine sebep olan mutasyonlar erkeksi gelişimde bozukluğa sebep olurken LH reseptörlerinde oluşan mutasyonlar ise pseudopuberte ve pseudohermafroditizme sebep olabilir.

2.6.1.12.3 Androjen Sentez ve Fonksiyon Bozuklukları

Androjen sentezinde görevli enzimlerin mutasyonları infertiliteye sebep olur. Kolesterolde testosteron sentezi için gerekli olan ilk üç enzimin mutasyon sonucu işlevlerini kaybetmesi adrenal hiperplaziye neden olur ve infertilite gözlenir. Yolakta gerekli olan son iki enzimin disfonksiyonuna neden olan mutasyonlar ise pseudohermafroditizme veya inmemiş kriptorşizmle beraber dışı genital görünüme sebep olur [48].

2.6.1.12.4 Androjen Duyarsızlık Sendromu (Testiküler Feminizasyon)

Erkek embriyoda gebeliğin 8. Haftasında androjen reseptörleri eksprese edilmektedir ve gebeliğin 9. haftasında testis testosteron üretimine başlamaktadır. 11-18. gebelik haftaları arasında testosteron üretiminin en yüksek seviyelere ulaşması ile dış genital kanal gelişiminin başlamasına neden olmaktadır Androjen reseptöründeki defekt sonucunda mezonefrik kanallara ait yapılar olan epididimis, vas deferens ve seminal vesikul gelişimi olmamaktadır.

Androjen reseptörlerindeki bozukluk sonucunda ürogenital sinüs dışı yönünde farklılaşır. Olgunlaşmamış germ hücreleri ve sertoli hücreleri ile çevrili olgunlaşmamış seminifer tübüller oluşur [63].

2.6.1.12.5 5- α Redüktaz Enzim Bozuklukları

Testosteronun dehidrotestosterona dönüşümünü sağlayan 5- α redüktaz enziminde meydana gelen mutasyonlar sonucu dış genital organların gelişimi ve sperm salınımı bozulur [44].

2.6.1.13 Sistemik Hastalıklar

2.6.1.13.1 Son Dönem Böbrek Yetmezliği (SDBY)

Son dönem böbrek yetmezliği, böbreğin sıvı-elektrolit dengesini sağlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarını gerçekleştirmesinde yetersiz kalması ortaya çıkar. Hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların cinsel fonksiyonlar üzerinde olumsuz etkileri vardır. Erkeklerde görülen cinsel fonksiyon bozuklukları libidoda azalma, infertilite, ereksiyon ve ejakülasyon problemleridir [31].

2.6.1.13.2 Karaciğer Sirozu

Karaciğer sirozu olan hastaların bir kısmında testosteronun plazma proteinlerine bağlanması arttıkça, plazmada testosteron seviyesi düşer ve FSH ve LH seviyeleri artar. Bunun sonucunda testis atrofisi, erektil disfonksiyon (impotans), infertilite, jinekomasti ve koltuk altı kıllarının azalması gibi endokrin değişiklikler görülür.

2.6.1.13.3 Diyabet

Diyabetik bireylerde FSH ve LH salınımının kontrol mekanizmaları bozulur. Hormonal değişimlerden etkilenen sertoli hücrelerinde spermatogenik germ hücrelerini ve spermlerin spermatogenesisin sürekliliği etkilenir [6, 43].

2.6.1.14 Enfeksiyon

2.6.1.14.1 Orşit

Testiste oluşan enfeksiyon ve enflamasyon durumuna orşit denir. Kabakulak, viral orşit nedenleri arasında en sık görülenidir. Orşit nedeni olabilecek diğer virüsler Koksaki, Varicella ve insan immun yetmezlik virüsü (HIV) dır [9, 32].

2.6.1.14.2 Prostatit

Prostat enfeksiyonları sonucu sperm motilitesinde azalma görülür. Prostatın enfeksiyonlarında en sık görülen patojenler, Klebsiella türleri, *E. Coli*, *E. fekalis*, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*, ve *Psödomanas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)'dır [32].

2.6.1.14.3 Epididimit

Epididimis enfeksiyonuna cinsel yolla bulaşan mikroorganizmalar ve Gram negatif bakteriler sebep olur. Epididimit enfeksiyonu sonucu sperm motilite bozukluğu, sperm sayısında azalma, sperm disfonksiyonu gelişebilir [32].

2.6.1.14.4 Üretrit

Üretrite sebep olan patojenler *C. trahomanis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma genitalium*'dur. Üretritin epididimiste enfeksiyona yol açması fertilité sorunlarına yol açabilmektedir [32].

2.6.1.14.5 Lökositospermi

Seminal sıvılarındaki lökositin görülme nedenleri genitoüriner enfeksiyon, sigara, çevresel toksinler, marihuana, bazı ilaçlar, genitoüriner kanal cerrahisi

(vazektomi geri dönüşümü, üretral cerrahi) ve otoimmunitedir. Artmış lökosit seviyelerinin sonucu olarak azalmış sperm sayısının ve azalmış sperm hareketliliği gözlemlenir [32].

2.6.1.17 Gonadotoksinler

Değişik mesleklere özgü gonadotoksinler değişik pestisitler, organofosfatlar, organoklorinler (örneğin DDT), karbamatlar (örneğin karbaril), fumigantlar, herbisitler ve fungusitlerdir. Tedavi amacıyla bu etkenlerden uzak kalma ya da korunma sağlanır [25].

2.6.1.18 Sigara

Sigara kullanımı veya sigara dumanına maruz kalma durumunda sperm konsantrasyonunda azalma, sperm motilitesinde azalma, normal morfolojili sperm sayısında azalma, penetrasyon yeteneğinin azalması, sperm DNA hasarının artmasına neden olabilir [80].

2.6.1.19 Sıcaklık

Uzun süreli çok sıcak ortamda çalışanlarda spermatogenez bozulmaktadır.

2.6.1.20 Radyasyon

Uzun süreli röntgen ışınları ya da tedavi amacıyla uygulanan iyonizan ışınlar germinal hücrelerde bozucu mutasyonlar oluşturmaktadır.

2.6.1.21 İlaçlar

Bazı ilaçlar değişik etkilerle spermatogenezi bozarlar. Bunlar, monoaminoksidaz inhibitörleri, reserpinle birlikte steroidler, yoğun ve sık kullanılan antibiyotikler, nitrofuranlar ve birçok antikanseröz (kolşisin vb.) ilaçlardır.

2.6.1.22 Likefaksiyon Bozukluğu

İnsan ejakulatu dışarı atıldığında bir koagulum olup rahat hareket edebilmeleri için bu koagulumun likefiye olması gerekir. Bunu sağlayan, prostat orijinli seminal bir proteazdır.

2.6.1.23 Protein Karboksil Metilaz Eksikliği

Aksonemal fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan protein karboksil metilaz, en çok testiste ve sperm kuyruğunda bulunur. Spermatogenez sırasında enzim

düzeıı yükselir. Protein karboksil metilaz, S-adenozil metiyoninden proteinlerin karboksil gruplarına metal grupları taşır ve calmodulin metilasyonunu sağlar. Calmodulin ve calmodulin bağlayıcı proteinler aracılığı ile Ca, sperm kuyruğunda harekette rol oynar.

2.6.1.24 Sperm Sayı, Yapı ve Hareket Bozuklukları

Oligospermik infertil bireylerde sperm sayısı 20 milyon/ml'den daha azdır.

Teratospermik infertil bireylerde sperm şekil bozukluğu görülür. Anormal morfolojili spermın kapasitasyon yeteneğinin düşmesi ile infertilite sorunlar görülür.

Astenospermik infertil bireylerde sperm hareket bozukluğu bulunur.

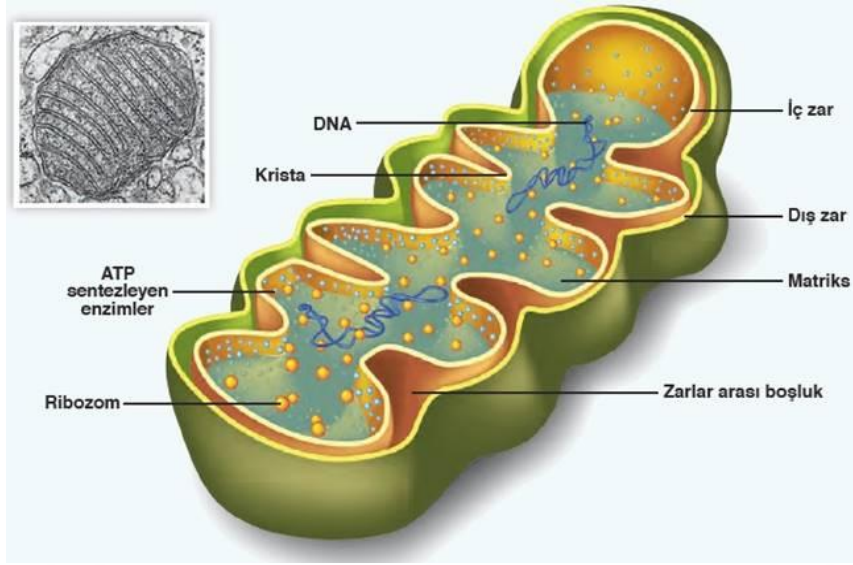
2.7 Astenospermi Tanımı

Erkek infertilitesi nedenleri arasında yer alan sperm motilite bozuklukları (astenospermi), spermiyogram analizinde sperm hareket kabiliyetinin toplam %40'tan daha az olması olarak tanımlanır [44]. Ejakülasyondan sonraki bir saat içinde faz-kontrast mikroskobunda 200-400 büyütmede yapılan semen incelemesinde sperm motilite değerlendirmesi yapılır. Spermiyogramda hareketlilik dört derece ile belirlenir: a. Hızlı doğrusal progresif hareket, b. Yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan hareket, c. Progresif olmayan hareket, d. Hareketsiz. Normal sperm konsantrasyonunda spermelerin %50'den fazlasının hareketli olması beklenirken, bu değerin %25'inin progresif hareketli olması gerekir [39].

Aksonemal dynein tarafından kullanılan ATP sperm hareketini sağlar. ATP üretimini sağlayan proteinlerin mitokondrideki genlerinde mutasyonlar, oksidatif stres, enfeksiyon, sitokinler ve anormal spermatozoidler gibi durumlarda sperm hareketliliği olumsuz etkilenir.

2.8 Mitokondri

Mitokondriler, bazı protozoonlarda ve memeli eritrositleri hariç tüm hücrelerde bulunan, küresel veya silindirik şekilli, çift membranla sarılı bir hücre organelidir (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Mitokondrinin şematik yapısı

Mitokondri yapısal olarak dört ana kısımdan oluşur: dış zar, iç zar, membranlar arası boşluk, matriks.

1. Dış zar üzerinde lipid sentezinde görev alan çeşitli proteinler bulunur. İç zar krista adı verilen katlanmalar yaparak zar yüzeyinin artmasını sağlar.

2. İç zar üzerinde üç farklı fonksiyona sahip proteinler bulunur:

- Hücresel solunumun elektron taşıma sisteminde (ETS) görev alan enzimler,
- Çeşitli metabolitlerin zardan mitokondriye giriş ve çıkışını sağlayan ve permeaz adı verilen taşıyıcı proteinler,
- ATP üretimi ve depolanmasıyla ilişkili proteinler (ATP sentetaz).

3. Membranlar arası boşlukta nükleotidlerin fosforilasyonu gerçekleşir.

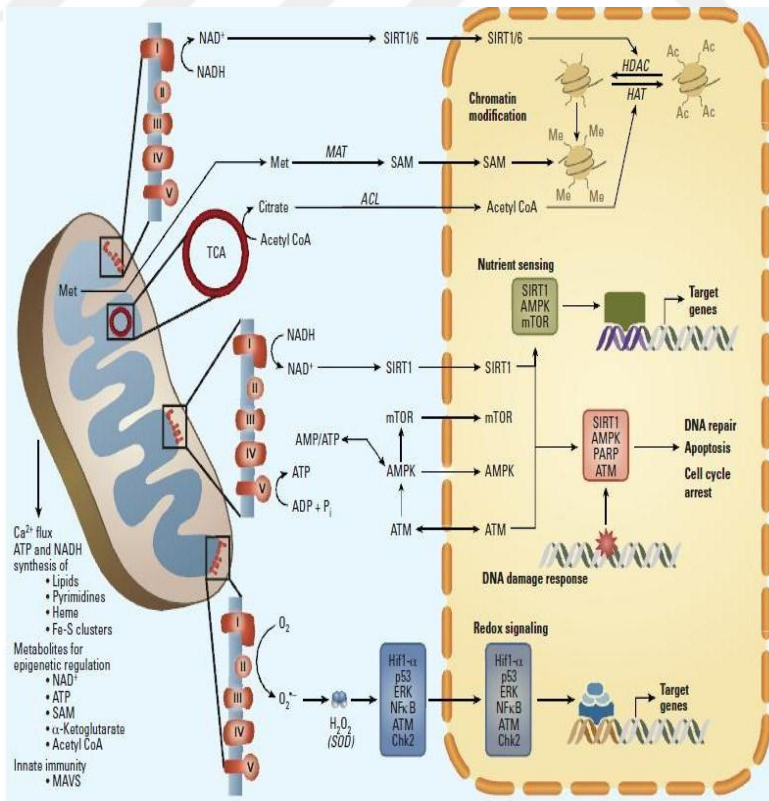
4. Matrikste mitokondriyal DNA, ribozomlar ve tRNA'lar bulunur.

Matrikste gerçekleşen diğer olaylar şunlardır:

- Pirüvat oksidasyonu,
- Sitrik asit döngüsü,
- Yağların β -oksidasyonu,
- DNA replikasyonu,
- RNA sentezi,
- Protein sentezi.

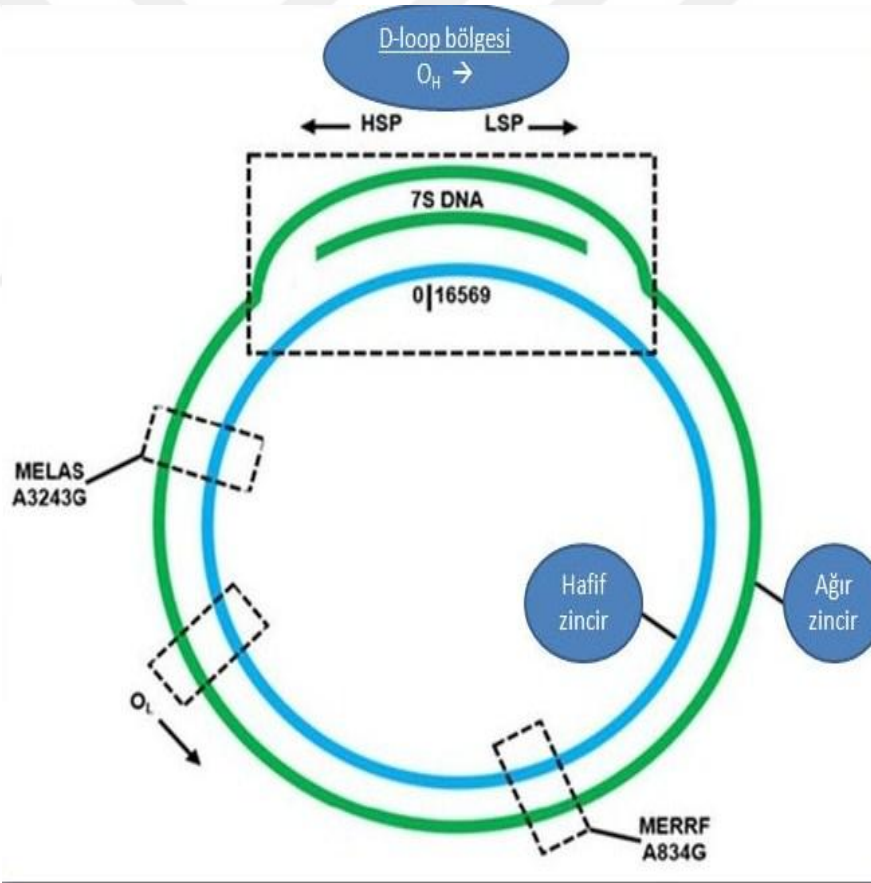
Mitokondri;

- oksidatif fosforilasyon,
- sitrik asit döngüsü,
- hem biyosentezi,
- yağ asitleinin β -oksidasyonu,
- demir sülfür oluşumu,
- reaktif oksijen türlerinin oluşumu yeri olup ayrıca;
 - homeostazın düzenlenmesi
 - hücre içi sinyal iletimi,
 - hücre döngüsünün kontrolü,
 - epigenetik regülasyonun düzenlenmesi,
 - apoptozisin kontrolü,
 - sitozoldeki Ca^{+2} seviyesinin kontrolü,
 - doğuştan kazanılan bağışıklıkta (doğal immün sistem)
 - steroid hormon sentezinde rol oynar. (Şekil 2-9)



Şekil 2-9:Mitokondride gerçekleşen reaksiyonlar [74]

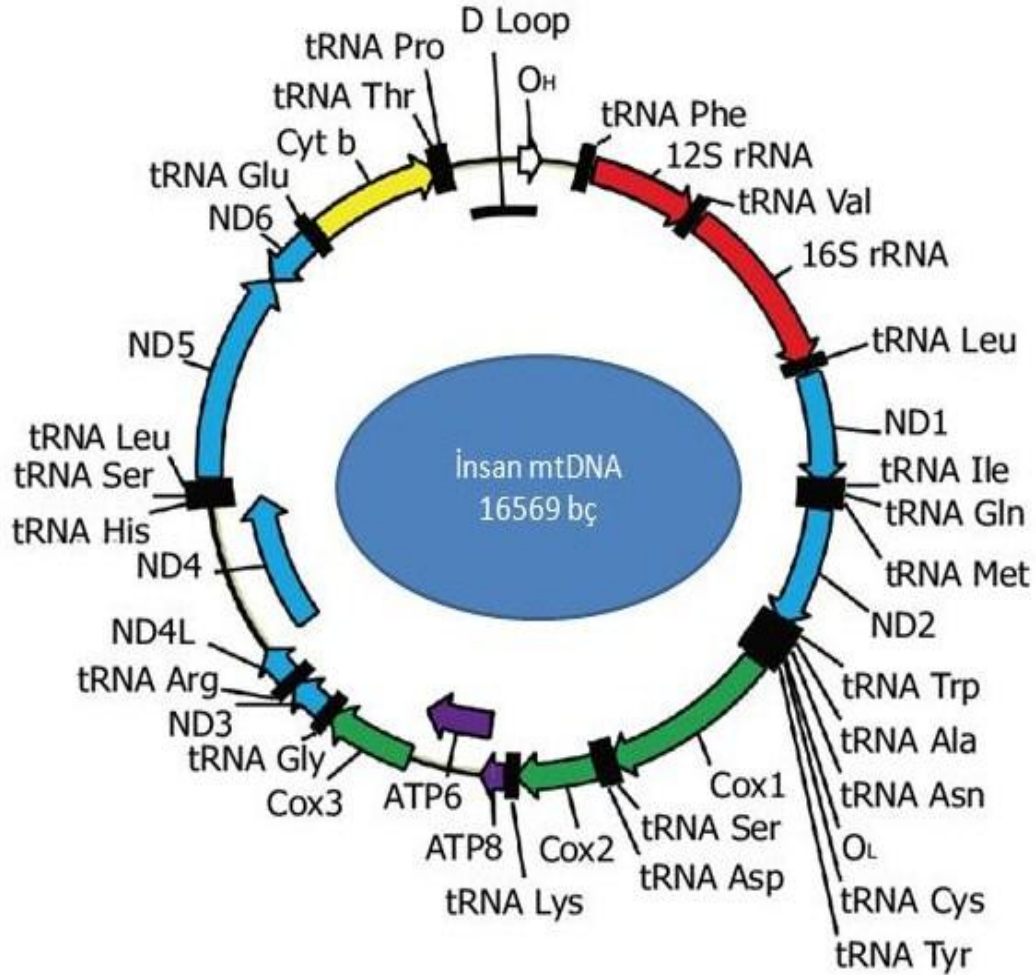
Bir hücrede 1.000-10.000 arasında mtDNA bulunup 16569 baz çifti uzunluğundadır. mtDNA halkasal, çift zincirli olup intron içermez. Çift zincirden içteki hafif inciri (L), dıştaki ağır zinciri (H) oluşturur. Ağır zincirde guanin bazı bakımından zenginken hafif zincir sitozin bazı bakımından zengindir. mtDNA'nın ufak bir bölümünü oluşturan ve üç zincirli yapıdan oluşan D-loop bölgesi, üçüncü zincir olan 7S DNA'nın H zincirinin tekrarlayan sentezinden oluşan kodlanmayan bir bölgedir (Şekil 2-10). Farklı orijin noktalarından başlayan H ve L zincirlerinin replikasyonu tek yönde gerçekleşir. Mitokondri genomunun sahip olduğu yirmi sekiz gen ağır zincir, dokuz gen hafif zincir üzerinde bulunur [21]. Mitokondri genomundan transkrip edilen mRNA'nın baş kısmına Cap ve son kısmına poliA kuyruğu eklenmez.



Şekil 2-10: Mitokondri D-loop bölgesi, hafif ve ağır zincirler

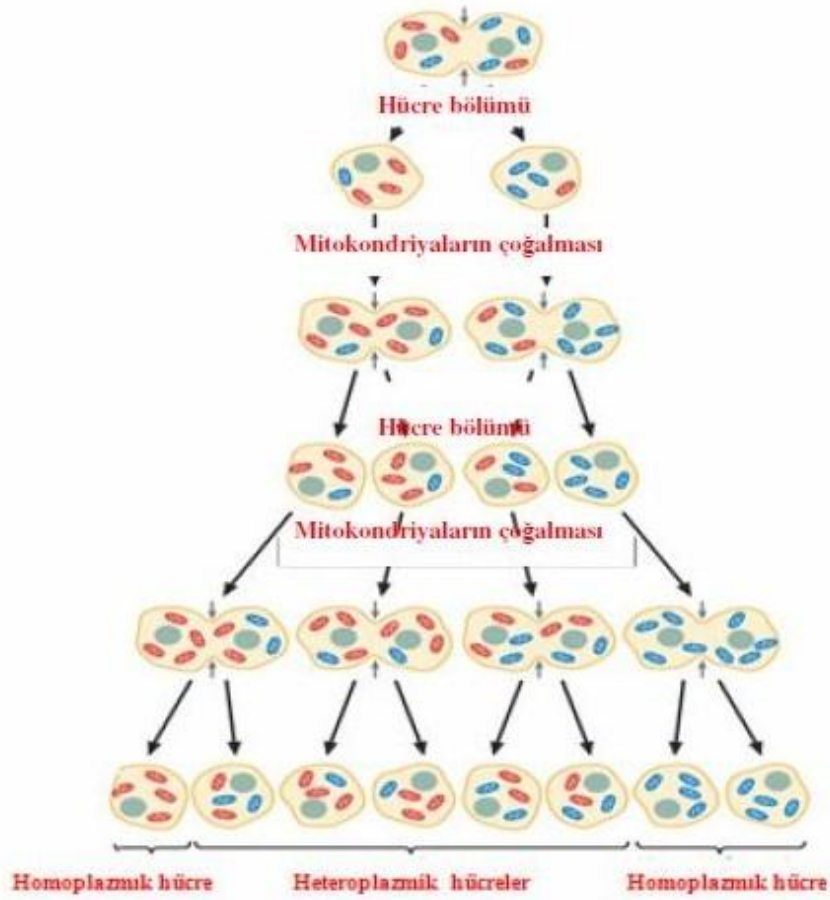
Mitokondriyal genomda 2rRNA (16S ve 12S rRNA) geni, 22 tRNA geni, 13 ETS ve oksidatif fosforilasyonla ilgili genler bulunur. Bu genler sitokrom C oksidaz

subunitleri I, II ve III, ATPaz subunit 6/8, sitokrom b, COX3/2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6'dır. (Şekil 2-11)



Şekil 2-11:mtDNA ve üzerindeki genler [96]

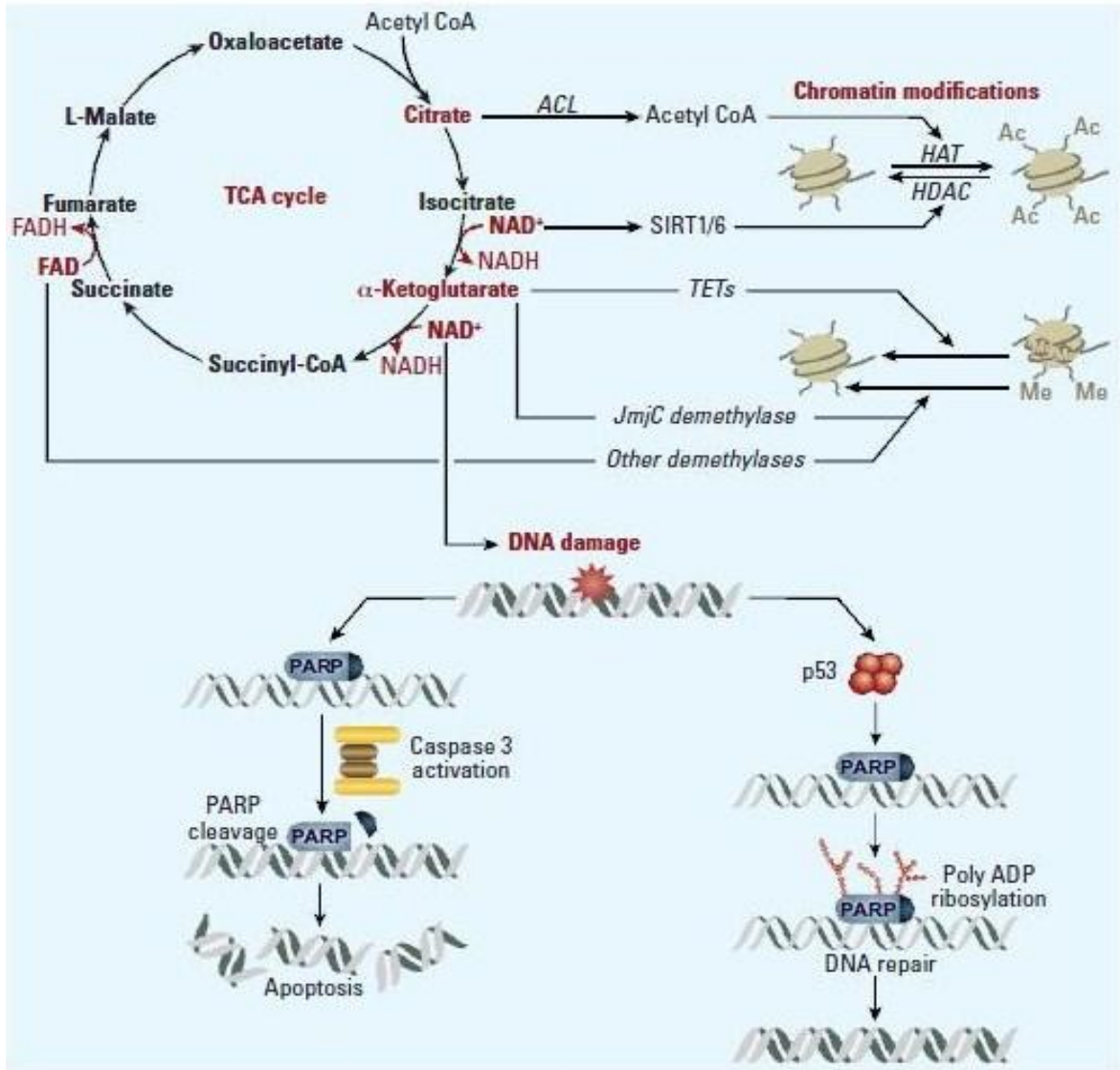
Hücre bölünmesi sırasında replike olan mtDNA'nın hücelere dağılımı rastgele gerçekleşir. Bir hücrede mtDNA kopyalarının aynı olması durumuna homoplazmi denir. Eğer replike olan mtDNA herhangi bir şekilde mutasyona uğrarsa, etkilenmiş ve etkilenmemiş mtDNA molekülleri tek bir hücrede toplanabilir. Hücrenin çok sayıda farklı mtDNA kopyaları içerme durumuna heteroplazmi denir (Şekil 2-12). Heteroplazminin neden olduğu patolojik durumlar dokudan dokuya farklılık gösterir.



Şekil 2-12:Mitokondri ve hücre bölünmeleri sonucu oluşan homoplazmi ve heteroplazmi

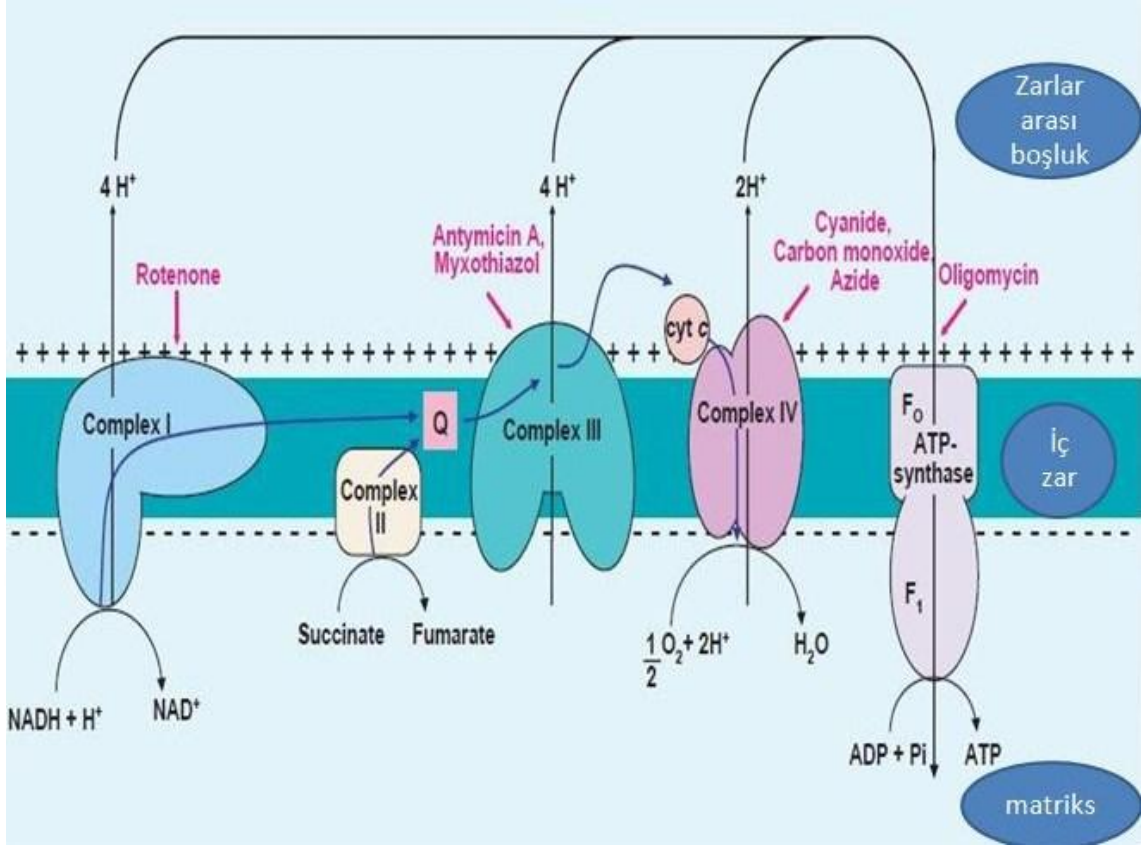
2.8.1 ATP ve Mitokondri İlişkisi

Hücrel olayların gerçekleşebilmesi için gerekli olan enerji kaynağı, yapısındaki yüksek enerjili fosfatı düşük enerjili moleküllere aktaran ATP'den (adenozin trifosfat) karşılanır. Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile hücre için gerekli enerjinin büyük çoğunluğu mitokondride üretilir. Sitozolda glikoliz sonucu oluşan pirüvat, aminoasitler ve yağ asitleri matrikste metabolize edilerek asetil CoA'ya dönüştürülür. Sperm hücrelerinde de glukoz ve yağ asitleri metabolize olurlar (Şekil 2-13).



Şekil 2-13: Krebs döngüsü ve hücredeki etkileri [74]

Metabolizma sonucu ortaya çıkan son ürünün Asetil CoA'ya dönüştürülmesi ve Krebs döngüsünde okside olması ile açığa çıkan elektronlar FADH ve NADH tarafından mitokondri iç membranındaki proteinlere taşınır. Oksidatif fosforilasyon sürecinde gerekli olan yetmişdört polipeptid nükleer genom tarafından eksprese edilir. Oksidatif fosforilasyon kompleksleri olan NADH dehidrogenaz I, sitokrom C oksidredüktaz III, süksinat dehidrogenaz II, sitokrom C oksidaz IV ve ATP sentetaz V aldıkları elektronları moleküler oksijene aktararak ADP'den ATP ve su (H₂O) oluşmasını sağlarlar (Şekil 2-14).



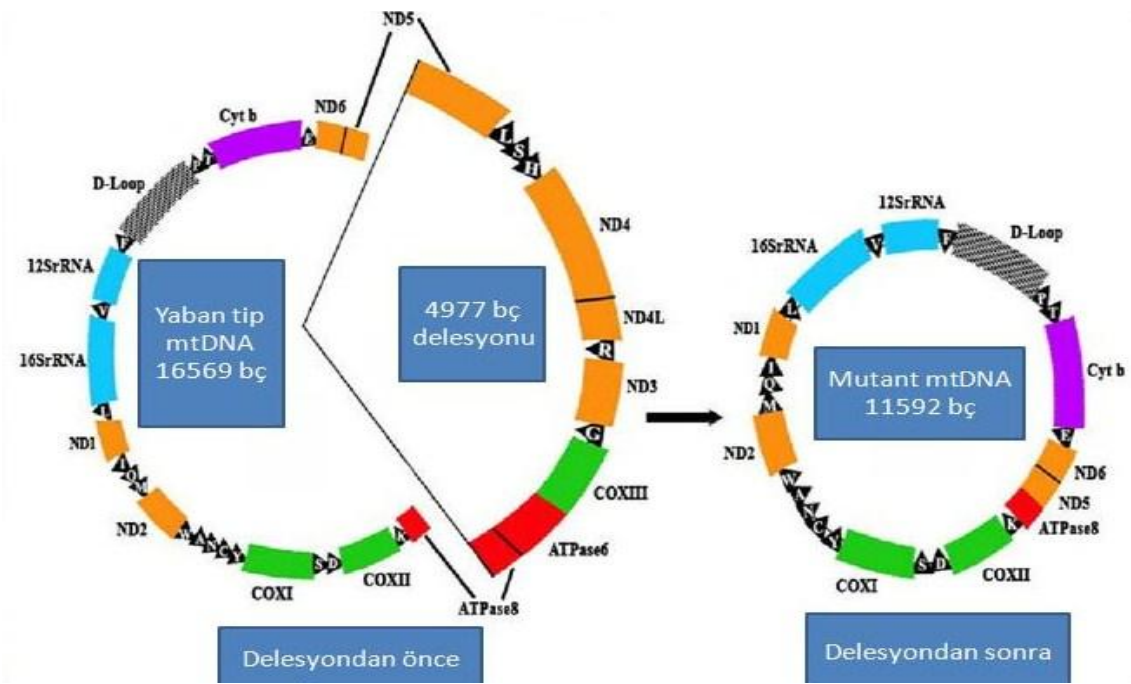
Şekil 2-14: Mitokondri iç zarında gerçekleşen oksidatif fosforilasyon [66]

2.8.2 mtDNA4977 Delesyonu

Nükleer DNA'nın aksine mtDNA, tamir mekanizmalarına sahip değildir. DNA'ya bağlanan proteinler veya histonlar tarafından korunmayan, D-loop bölgesinden başlayan ve yanlış baz yerleşiminde bunu düzelten tamir mekanizması içermeyen replikasyon mekanizmasına sahiptir. Ayrıca kristada meydana gelen oksidatif fosforilasyon nedeniyle oluşan oksijen radikallerinin mitokondriyal DNA ile direk temas halinde olması nedeniyle mitokondriyal DNA üzerinde mutasyonların oluşma olasılığı nükleer DNA'ya göre 10-100 kat daha fazladır.

Sperm hareketliliğindeki azalmanın erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [7]. Astenospermia, sperm hareket bozukluğu ile karakterize olup fonksiyonel bozukluklar, varikosel, endokrin anomaliler gibi çeşitli faktörleri içeren, erkek infertilitesine neden olan yaygın sebeplerden biridir [58]. Astenospermiya sebep olup sperm hareketini etkileyen faktörlerden biri sperm mtDNA mutasyonlarıdır. Bu mutasyonların en bilineni mtDNA 4977 delesyonudur.

4977 baz çifti delesyonu, mtDNA üzerinde 8470-8482 ile 13447-13459 pozisyonları arasında meydana gelir. Delesyonun bu pozisyonlarda meydana gelmesinin nedeni, kırılmanın gerçekleştiği dizinin uç kısımlarında 5'-CCAT-3' tekrarlarının 8-hidroksi-2'-deoksiganazinin (8-OHdG) oluşumuna duyarlı olmasıdır. Bu delesyon altı tRNA geni, ATPaz 6/8, COXIII, ND3, ND4, ND4L ve ND5 gen bölgeleri dahil yirmi yapısal gende delesyona neden olur (Şekil 2-15).



Şekil 2-15:Yabanil tip mtDNA ve 4977 delesyonu sonucu oluşan mutant mtDNA

Mitokondride meydana gelen mutasyonlar fonksiyonel bozukluklara neden olup kanser, diyabet, migren, obezite, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Huntingon hastalığı, Leber'in hereditik optik nöropatisi (LHON) Kearns-Sayre Sendromu, infertilite gibi sorunlara yol açmaktadır.

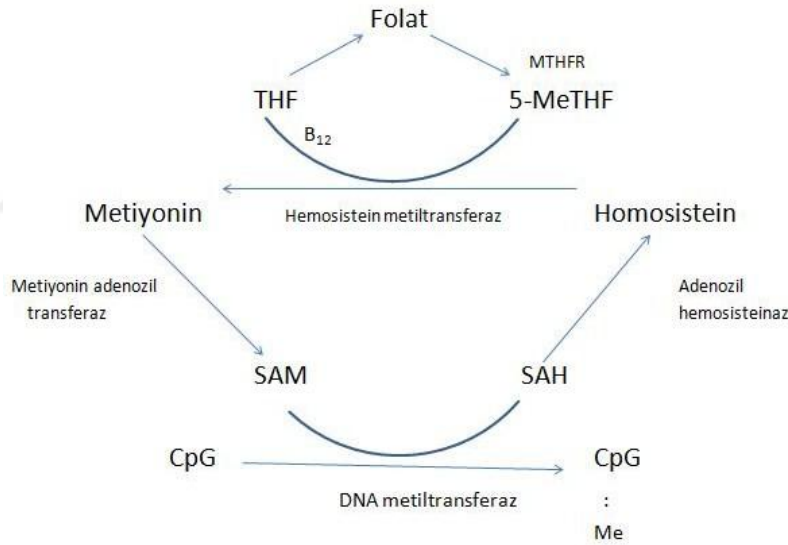
2.9 S-Adenozil-L-Metiyonin (SAM)

S-adenozil-L-metiyonin (SAM, SAME, AdoMet), yaşayan tüm canlılarda bulunan, metiyonin adenoziltransferaz (MAT) enzimi aracılığı ile ATP ve L-metiyonin kullanılarak sentezlenen bir metabolittir [95].

SAM hücrede;

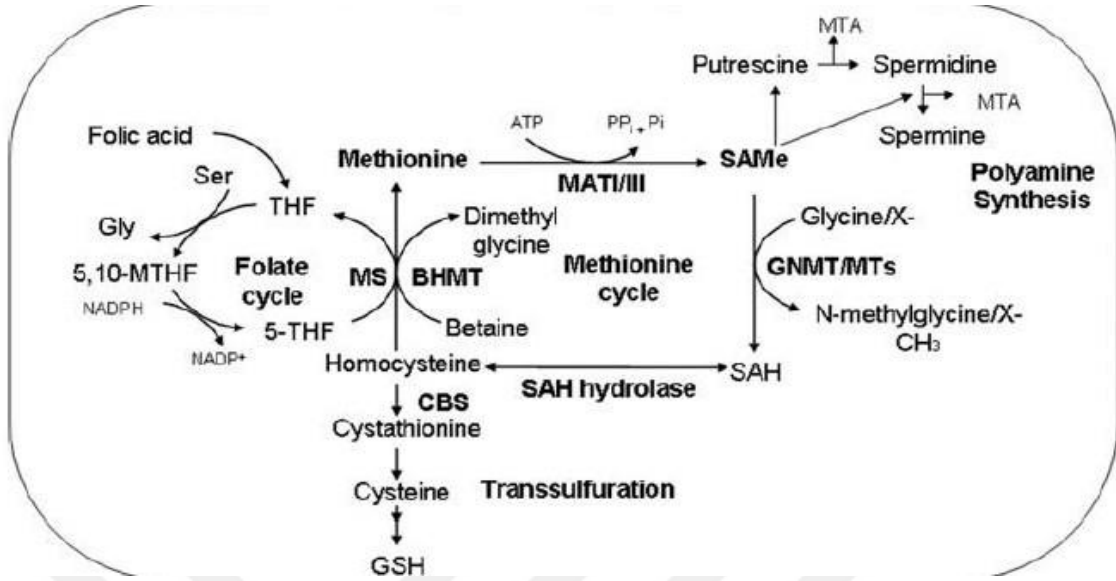
- Glutatyon sentezlenmesinde öncül moleküldür.
- Ana metil grubu vericisi olarak nükleik asit, fosfolipit, histon, poliamin ve proteinlerin yapısına katılır.
- Transmetilasyon, transsülfürasyon ve aminopropilasyon yollarında görev alır.
- Metiyonin döngüsünde rol oynar [35].

SAM'dan elde edilem metil grubu karnitin, asetil-L-karnitin, fosfokreatin, epinefrin ve adrenalin, fosfotidilkolin ve melatonin sentezinde gereklidir. [35]. Ayrıca nükleer DNA'da CpG adacıkları üzerinde bulunan sitozin baz kalıntılarının epigenetik metilasyonu için SAM'dan elde edilen metil grubu kullanılır (Şekil 2-16) [60].



Şekil 2-16: DNA metilasyonu reaksiyonu

SAM'dan metil grubunun ayrılması ile oluşan S-adenozilhomosistein (SAH), transsülfasyon döngüsünü başlatır. SAH'ın hidrolizi ile homosistein oluşur. Homosistein oluşması ile Şekil 2-17'de gösterildiği gibi glutatyon (GSH) oluşumu için transsülfasyon reaksiyonları devam eder. GSH, antioksidan ve detoksifikasyon molekülü olarak görev yapar [35].



Şekil 2-17:Transsülfasyon ve poliamin reaksiyonları [55]

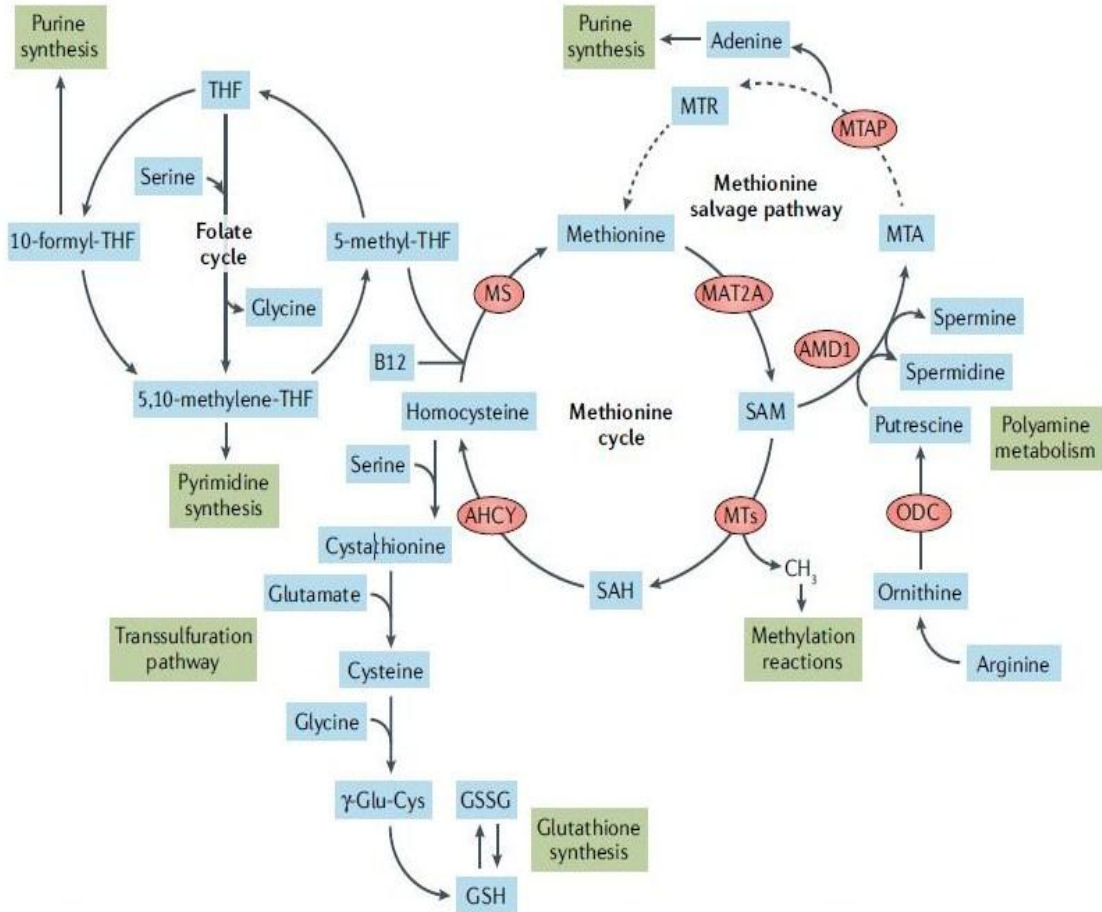
Aminopropilasyon, SAM'ın dekarboksilasyonu ile başlar. Dekarboksile SAM, spermidin ve spermin oluşması için putresine bağlanır. Spermidin ve spermin ise hücre büyümesi, hücre farklılaşması, DNA ve RNA stabilizasyonu için gereklidir [35].

Protein, fosfolipid ve nükleik asitlere metil grubu tek karbon metabolizması denilen bir yolak ile sağlanır. Tek karbon metabolizması, folat ve metiyonin döngüsünden oluşur (Şekil 2-18).

Tek karbon metabolizmasında;

- Betain, kolin, folat, B₂, B₆, B₁₂ vitaminleri koenzim olarak görev yapar.
- Folat, tetrahidrofolata (THF) dönüştürülür.
- B₆ koenzimi içeren serin hidroksimetiltransferaz, serin aminoasitinden bir karbonu tetrahidrofolata (THF) aktarır. Glisin ve 5,10 metilen THF oluşur.
- Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), 5,10-metilen THF'yi 5-metil THF'ye (5-MTHF) dönüştürür. Bu reaksiyon sonucu homosisteinden metiyonine dönüşüm için gerekli olan metil grubu açığa çıkar.
- Açığa çıkan metil grubu homosisteine katılır.
- B₁₂ koenzimi içeren metiyonin sentaz, metilkobalamin ara ürünü oluşturarak homosisteini metiyonine çevirir.
- Metiyoninden ATP aracılığı ile SAM üretilir.

- SAM'dan metiltransferazlar ile metil grubu serbest bırakılır.
- SAM'dan metil grubunun serbest kalması sonucu oluşan S-adenozil homosistein (SAH), metil gruplarının transferi için gerekli olan metil transferazları inhibe eder [92].



Şekil 1-18: Tek karbon metabolizması ve ilişkili yollar [71]

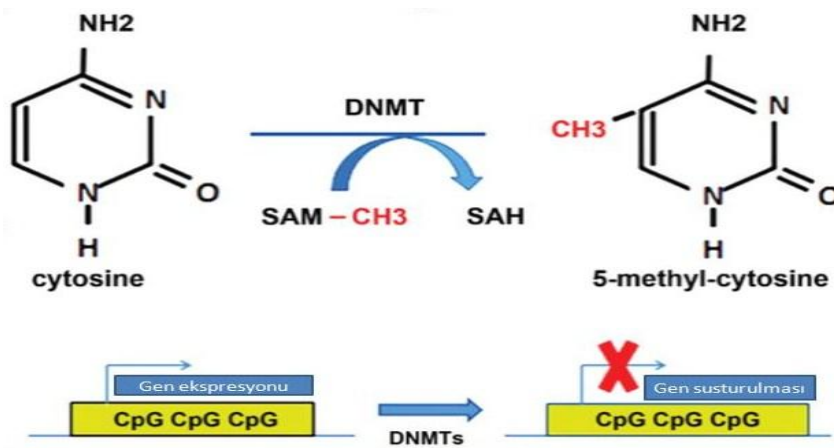
SAM düzeyindeki eksiklik nedeniyle nükleer metilasyonda meydana gelen azalma veya bozukluklar doğum hasarları, kardiyovasküler hastalıkları, kanser, karaciğer hastalıkları, depresyon, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [60].

2.10 Global DNA Metilasyonu

Nükleotid diziliminde değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunu değiştiren modifikasyonlar epigenetik olarak adlandırılır. Epigenetik değişiklikler mitotik veya

mayotik kalıtsal değişimler olup kromatin yeniden düzenlemesi, non-coding RNA regülasyonu, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu epigenetik düzenlemelerdir. [2, 75]. Bu mekanizmalar içinde DNA metilasyonu histon deasetilasyonu, kromatin kondensasyonu ve gen susturulması modifikasyonları ile gametogenez, erken embriyonik dönem, endojen retrotranspozonların ve tümör supresor genlerin baskılanması gibi süreçleri etkileyerek gen ekspresyonunu değiştiren bir mekanizmadır. [22]. DNA metilasyonu değişimlerinde fertilizasyon bozuklukları, embriyogenesisde fonksiyonel bozukluk, doğum öncesi ölüm, konjenital anomaliler, erken doğum veya düşük doğum kilosu tespit edilmiştir [22].

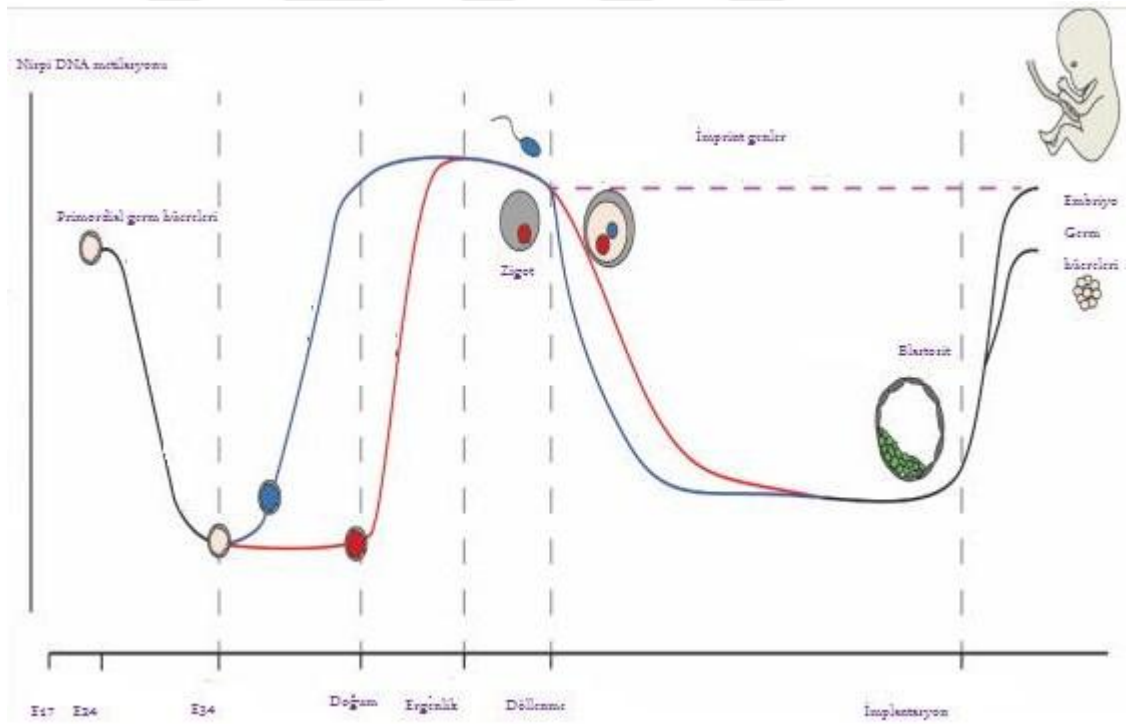
DNA metilasyonunun kontrolü ile embriyogenesis, genomik imprinting, gen susturulması ve X kromozomu inaktivasyonu düzenlenir [54]. DNA metilasyonu prokaryotlarda adenozin bazının 6. pozisyonunda (6mA), ökaryotlarda sitozin bazının 5. pozisyonunda (5mC) gerçekleşir [73]. DNA metilasyonu, genomdaki CpG (sitozin fosfat guanozin) adalarında bulunan sitozin bazlarının 5. pozisyonuna SAM'dan elde edilen metil grubunun (-CH₃) DNA metiltransferaz (DNMT) vasıtasıyla aktarılmasıyla gerçekleşir. CpG adaları, 500 baz çiftinden oluşan ve %55'inin C+G olduğu genom bölgeleridir. DNA metilasyonu sinyali, transkripsiyon faktörleri ve transkripsiyonda görevli diğer moleküller için fiziksel olarak engel oluşturur. Bu nedenle, transkripsiyon için pozitif regülatörler açısından da fiziksel bariyer oluşturur (Şekil 2-19) [54].



Şekil 2-19: DNA metilasyonu ile gen susturulması [22]

DNA metilasyonu profili, her bireyde her bir alel için değişiklik gösterir. DNA metilasyonu, implantasyon ve spermatogenesis sırasında gerçekleşir (Şekil 2-23).

Primordial germ hücreleri, olgun oosit ve blastula hücre genomları kısmen metiledir. Fertilizasyon sırasında paternal DNA demetile olur (Şekil 2-24). Fertilizasyondan kısa bir süre sonra zigotta ve PGC'de DNA metilasyonu gerçekleşir. Cinsiyete özgü epigenetik metilasyon modifikasyonları ile erkek germ hücre genomlarının *de novo* metilasyonu gerçekleşir. Prenatal dönemin 17. gününde erkek germ hücrelerini oluşturan PGC görülmeye başlar. Embriyonik dönemin 24. gününde PGC tamamen özelleşmiş ve 37. günde genital çıkıntıya doğru göç etmiş olurlar. PGC genomlarının genital çıkıntıya göçü sırasında *de novo* metilasyonu DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L enzimleri aracılığı sağlanır [47].



Şekil 2-20: İnsanda gelişim sürecinde DNA metilasyonunun evreleri [22]

Erkek germ hücreleri doğumdan önce yeniden metile olur. Doğum sonrasında ise DNA üzerinde global demetilasyon gerçekleşir. Erişkin bir bireyde spermatogenesis sürecinde pakiten safhasından sonra germ hücrelerinin genomlarında ökromatin kısımları hipermetile iken juxtasentromerik heterokromatin bölgeler ile gelişimsel

genlerin promotorları hipometiledir [22]. Genomik DNA metilasyonu spermatogenik hücre tiplerinde gen ekspresyonu kontrolü sağlamazken kromatin düzenlemesi için gereklidir [69].

Montjean ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yüksek sperm DNA hipermetilasyon düzeylerinin spermatogenesis için gerekli olduğu belirtilmiştir [56]. Fertilizasyondan hemen önce DNA üzerindeki metilasyonun silinmemesi infertilite problemleri, düşükler, konjenital sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Sitozin bazında metilasyon birikimi ile infertil erkeklerde gen ekspresyonu seviyesi arasında yakın korelasyon olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [50].

Sperm mtDNA 4977 delesyonunun hasarlı sperm üretimi ve erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu [49]; sperm mitokondri aktivitesi ile hücrede oksidatif stres artışı ile DNA hasarları oluşuğu [1]; oksidatif hasar nedeniyle azalan SAM düzeyinin DNA hipometilasyonuna yol açarak sperm hareket bozukluklarına neden olduğu [84] yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada sperm mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM ve global DNA metilasyon düzeyleri ölçülerek aralarında bağlantı olup olmadığı belirlenmek istenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Protein Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan materyaller, 2017 Ağustos- 2018 Mart ayları arasında toplanmış ve aşağıda belirtilen şekilde çalışılmıştır.

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji anabilim Dalı Androloji Polikliniğine başvuran yetişkin gönüllü bireylerden elde edilen semen örnekleri kullanılmıştır. Tez çalışması projesine dahil edilen hasta olguları ve kontrol gruplarının seçimi amacıyla belirlenen kriterle aşağıda belirtilmiştir.

3.1 Kullanılan Örneklerin Tanımı

Çalışma kapsamında 15 adet hasta olgulu ve 21 adet kontrol olgulu iki örnek grubu oluşturuldu. Çalışmaya başlamadan önce etik kurul komitesinden onay alınarak hasta ve kontrol grubuna dahil edilen tüm gönüllülere çalışma öncesi proje amacı ile ilgili bilgi verilmiş, asgari bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutulup imzalatılmıştır. Hasta grubu, astenospermi teşhisi alan örneklerin toplanması ile oluşturulurken hastanın varikosel tanısı almamış, Hepatit B veya C olmayan, bulaşıcı diğer enfeksiyon hastalıklarına sahip olmayan, kemoterapi veya radyoterapi almamış hastalardan oluşturuldu.

Hasta grubu, spermiyogram sonucu progresif ve nonprogresif sperm hareketlerinin toplamı %20'nin altında olan astenospermi tanısı koyulmuş, hiç çocuk sahibi olmayan olgulardan oluşturulmuştur.

Kontrol grubu, infertiliteye dair herhangi bir tanı almamış, spermiyogram sonucu progresif ve nonprogresif sperm hareketlerinin toplamı %20 ve üzerinde olan, en az bir çocuk sahibi olgulardan oluşturulmuştur.

3.2 Semen Örneklerinden Sperm Elde Etme

Semen örneğinden 1 ml alınıp 1000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Pelletin üzerine 1,5 ml PBS tamponu eklenip 1000xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelletin üzerine 50 mM 50 µl Tris-HCl (pH:6,8, 4-8 °C) eklenip +4 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 1000xg ve +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine 500 µl lisis tamponu ve 10 µl Proteinaz K (20 µg/ml) eklenip 56 °C'de 30

dakika çalkalamalı su banyosuna koyuldu. Ardından 1000xg ve +4°C’de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 750 µl PBS eklenerek 1000xg ve +4°C’de 5 dakika olmak üzere üçer kere yıkandı.

PBS tamponu: 0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄, 0,0018 M KH₂PO₄.

Lisis tamponu: 1 M Tris, 1 M NaCl, 1 M EDTA, %2’lik SDS.

3.3 DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen sperm hücreleri üzerine 500 µl patlatma tamponu (1 M tris, 3 M NaCl, 0,5 M EDTA, % 20 SDS), 2,5 µl Triton X-100, 21 µl DTT ve 40µl Proteinaz K eklenip 50 °C’de bir gece çalkalamalı su banyosuna konuldu. Ardından oda sıcaklığında 15500xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Patlatılan sperm hücrelerinden DNA izolasyonu, “High Pure FFPE DNA Isolation Kit” (Roche) kullanılarak üretici firmanın belirttiği yöntem takip edilip aşağıdaki şekilde yapıldı.

DNA izolasyon protokolü:

1. 1,5 ml’lik santrifüj tüplerine 200 µl sperm hücre homojenatı, 130 µl “Tissue Lysis Buffer”, 40 µl Proteinaz K eklendi. Tüpler pipetaj yapıldıktan sonra 1 saat 55 °C’de inkübe edildi.

2. inkübasyondan sonra tüplere 200 µl “Binding Buffer” eklenip vortkslendi. Ardından 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi.

3. İnkübasyon sonrası santrifüj tüplerine 100 µl izopropanol eklenip vortekslendi.

4. Kit içeriğinde bulun filtreli toplama tüpleri üzerine santrifüj tüplerinde bulunan karışım eklenerek 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi.

5. Filtreli tüplerin altında kalan toplama tüpleri değiştirildi. Filtre üzerine 500 µl Inhibitor “Removal Buffer” eklenerek 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonrasında toplama tüpleri değiştirilip filtre üzerine 500 µl “Wash Buffer” eklendi. 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi.

7. Toplama tüplerindeki sıvı dökülüp filtreye 200 µl “Wash Buffer” eklendi. 8000xg’de 1 dakika santrifüj edildi.

8. Santrifüj bitince tüpler çıkarılmaksızın hemen ardından 10000xg'e 10 saniye daha santrifüj edildi.

9. Filtreli tüpler 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 70 °C'de ısıtılmış "Elution Buffer"dan tüplere 100 µl eklenip 8000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kere yapıldı.

10. İzole edilen DNA'ların saflık ve miktar ölçümleri yapıldı. Daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.4 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR)

Gerçek zamanlı PZR, bir ya da daha fazla PCR döngüsünden elde edilen ışımaya sinyalinin değerlendirilmesi ile başlangıçtaki ürün miktarının belirlenmesini sağlayan bir tekniktir. Çalışmamızda DNA örneklerinden sinyal elde etme amacıyla LC480 hibridizasyon problemleri kullanılmıştır. Bu problemler iki adet olup tek iplikli, DNA üzerinde belirli bölgeye bağlanabilen özel dizayn edilmiş oligonükleotitlerdir. Bu problemlerden birisi 3' ucundan "fluorescein" ile, diğer problem ise 5' ucundan "LightCycler red fluorophore" ile etiketlenmiştir. Bu problemler hedef dizi üzerinde birbirlerine yakın bağlandıklarında fluoresans rezonans enerji transferine (FRET) yol açarak fluoresans ışımaya yaparlar. Her bir PZR döngüsünden sonra fluoresans boyanın ışımaya değeri ölçülerek çoğalan DNA'nın görüntülenmesi sağlanır. Bu problemler "mastermix" içerisinde bulunmaktadır.

3.4.1 Gerçek Zamanlı PZR Standart Değerlerinin Oluşturulması

Mitokondriyal DNA üzerinde mutasyona kapalı olarak kabul edilen, 8-hidroksi-2'-deoksiganizin (8-OHdG) oluşumuna duyarlı bölgelerin dışında kalan, 5'-CCAT-3' tekrar dizileri ile ve 4977 baz çiftlik delesyonun (~5Kb) hiçbir dizisini içermeyen bölgelerin dışında kalan D-loop bölgesi baz alınarak, mtDNA genomunu temsil edecek dizi (GenBank Accession No NC001807 and the MITOMAP Database) veri tabanı yardımıyla 249 baz çiftlik primerler tasarlandı (Tablo 3-1). mtDNA 4977 delesyonunu temsil edecek dizi ise 270 baz olarak tasarlandı (Tablo 3-1). mtDNA halkasal yapıda olması nedeniyle mutasyona uğradıktan sonra tekrar halkasal formuna dönebilmektedir. Bu nedenle primerlerin bağlanması delesyon varlığında gerçekleşebilmektedir. mtDNA üzerinde mutasyon gerçekleşmediğinde ise PZR sonunda mutant bölge çoğalması gerçekleşmeyecektir.

Tablo 3-1: mtDNA 4977 delesyonuna ilişkin primer dizileri

	Primer Dizisi	Ürün Boyu
mtDNA4977 primeri (Forward)	5'-TAT GGC CCA CCA TAA TTA CCC-3'	270 bç
mtDNA4977 primeri (Reverse)	5'-AAG CGA GGT TGA CCT GTT AGG-3'	270 bç
Total mtDNA primeri (Forward)	5'-AAC ATA CCC ATG GCC AAC-3'	249 bç
Total mtDNA primeri (Reverse)	5'-AAC ATA CCC ATG GCC AAC-3'	249 bç

3.4.2 Delesyonlu mtDNA'dan mtDNA4977 Primerlerini Kullanarak 270 bç Ürününün PZR Yöntemiyle Elde Edilmesi

270 bç'lik mutasyonu temsil eden ürünü elde etmek amacıyla Tablo 3-2'de verilen malzemeler kullanılmış ve Tablo 3-3'de verilen PZR protokolü gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-2: 270 bç ürünü için gerekli PZR malzemeleri

PZR İçeriği	Miktar
Taq DNA Polimeraz	0,15 µl
10X Buffer	2,5 µl
dNTP	2 µl
mtDNA4977 primeri (Forward)	1 µl
mtDNA4977 primeri (Reverse)	1 µl
DNA	3 µl
MgCl ₂	1,5 µl
H ₂ O	13,85 µl

Tablo 3-3: 270 bç ürünü için yapılan PZR protokolü

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	+ 95 °C	3 dk.	
Denatürasyon	+94 °C	20 s.	40 döngü
Primer bağlanması	+54 °C	1 s.	40 döngü
Zincir uzaması	+72 °C	15 s.	40 döngü
Son uzama	+72 °C	10 dk.	

PZR sonunda elde edilen ürünler, %2'lik Agaroz jelde “pUC mixmarker 8” ile yürütülüp PZR ürünlerinin istenen bant aralığında olup olmadığı translüminatör aracılığı ile kontrol edildi.

3.4.3 Agaroz Jelden Gene Özgü PZR Ürününün İzolasyonu

Agaroz jelde kontrol edilen PZR ürününün saf halde izole etmek amacıyla “High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)” kullanıldı.

İzolasyon protokolü:

1. Agaroz jel üzerindeki PZR ürünü, steril bistüri ile kesilip 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Agaroz üzerine 1:3 oranında bağlanma tamponu eklendi (100 mg agaroz: 300 µl bağlanma tamponu).
3. Mikrosantrifüj tüpü 15-30 saniye vortekslendi.
4. Ardından 56 °C'de 10 dakika inkübe edilip yeniden vortekslendi.
5. Mikrosantrifüj tüpündeki her 100 mg içerik için 150 µl izopropanol eklenip vortekslendi.
6. Kit içeriğinde bulunan filtreli kolon toplama tüplerine yerleştirildi. Filtrenin üzerine mikrosantrifüj tüpündeki örnek boşaltıldı.
7. Filtreli tüp 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta biriken sıvı atıldı.
8. Filtreli tüpe 500 µl "Wash Buffer" eklenip 8000xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.

9. Filtreli tüpler yeni 1,5 ml'lik santrifüj tûpüne aktarıldı. Üzerine 200 µl "Elution Buffer" eklenip 8000xg'de 1 dk. santrifüj edildi.

10. elde edilen supernatant -20 °C'de saklandı.

PZR ürünlerinin agaroz jelden saflaştırılması sonrası kontrol amaçlı tekrar agaroz jelde yürütölme yapıldı.

3.4.4 Total mtDNA'dan Total mtDNA Primerlerini Kullanarak 249 bç Ürününün PZR Yöntemiyle Elde Edilmesi

249 bç'lik mutasyonu temsil eden ürünü elde etmek amacıyla Tablo 3-4'de verilen malzemeler kullanılmış ve Tablo 3-5'de verilen PZR protokolü gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-4: 249 bç ürünü için gerekli PZR malzemeleri

PZR İçeriği	Miktar
Taq DNA Polimeraz	0,15 µl
10X Buffer	2,5 µl
dNTP	2 µl
Total mtDNA primeri (Forward)	1 µl
Total mtDNA primeri (Reverse)	1 µl
DNA	3 µl
MgCl ₂	1,5 µl
H ₂ O	13,85 µl

Tablo 3-5: 249 bç ürünü için yapılan PZR protokolü

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	+ 95 °C	3 dk.	
Denatürasyon	+94 °C	20 s.	40 döngü
Primer bağlanması	+54 °C	1 s.	40 döngü
Zincir uzaması	+72 °C	15 s.	40 döngü
Son uzama	+72 °C	10 dk.	

PZR sonunda elde edilen ürünler, %2'lik Agaroz jelde “pUC mixmarker” ile yürütülüp PZR ürünlerinin istenen bant aralığında olup olmadığı translüminatör aracılığı ile kontrol edildi

3.4.5 Agaroz Jelden Gene Özgü PZR Ürününün İzolasyonu

Agaroz jelde kontrol edilen PZR ürününün saf halde izole etmek amacıyla “High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)” kullanıldı.

İzolasyon protokolü:

1. Agaroz jel üzerindeki PZR ürünü, steril bistüri ile kesilip 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Agaroz üzerine 1:3 oranında bağlanma tamponu eklendi (100 mg agaroz: 300 µl bağlanma tamponu).
3. Mikrosantrifüj tüpü 15-30 saniye vortekslendi.
4. Ardından 56 °C'de 10 dakika inkübe edilip yeniden vortekslendi.
5. Mikrosantrifüj tüpündeki her 100 mg içerik için 150 µl izopropanol eklenip vortekslendi.
6. Kit içeriğinde bulunan filtreli kolon toplama tüplerine yerleştirildi. Filtrenin üzerine mikrosantrifüj tüpündeki örnek boşaltıldı.
7. Filtreli tüp 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta biriken sıvı atıldı.
8. Filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu eklenip 8000xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
9. Filtreli tüpler yeni 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 200 µl "Elution Buffer" eklenip 8000xg'de 1 dk. santrifüj edildi.
10. Elde edilen supernatant -20 °C'de saklandı.

3.4.6 Total mtDNA (249 bç) ve 4977 Delesyonlu mtDNA (270 bç) Dizilerinin Vektöre Aktarılması

PZR sonucu elde edilen 78 bç ve 190 bç'lik ürünler, “pGEM-T Easy Klonlama Kiti (Promega)” kullanılarak vektörlere aktarıldı. Klonlamanın yapılacağı gen bölgesi kontrol amacıyla önceden klonlanıp plazmid izolasyonundan sonra dizilenerek kontrol edilmiştir. Ligasyon işlemi 0,5 ml'lik tüplerde yapıldı. Ligasyon için kullanılan

malzemeler Tablo 3-6’da verilmiştir. Hazırlanan reaksiyonlar +4 °C’de, 24 saat bekletildi.

Tablo 3-6: Ligasyon işlemlerinde kullanılan malzemeler

2x ligasyon tamponu	5 µl
pGEM-T Easy vector	1 µl
T4 ligaz	1 µl
PCR ürünü	1 µl
H ₂ O	2 µl

3.4.7 Transformasyon: 249 bp’lik Vektör (Total mtDNA) ile 270 bp’lik Vektörün (4977 Delesyonlu mtDNA) Bakteriye Transfer Edilmesi

1. Ligasyondan sonra yapılan kısa bir santrifüj sonrası her iki ligasyon reaksiyonundan 2 µl alınıp 15 ml’lik Steril polipropilen tüplere aktarıldı.
2. Kompetan "Stb3" (alıcı) hücreler -70 °C’den alınarak buz üzerinde çözdürüldü.
3. Her ligasyon reaksiyonuna 50 µl kompetan hücre eklendi.
4. Karışıma pipetaj yapıp buz üzerinde 20 dk. bekletildi.
5. Karışımlara 42 °C’de 45 s. ısı şoku uygulandıktan sonra 1 dk. buz üzerinde bekletildi.
6. Tüplere SOC medyumundan 950 µl eklenip 37 °C’de, 150rpm’de, 1,5 saat çalkalamalı inkübatörde şnkübe edildi.
7. Kültürlerden SOS medyumunu ile 1:1, 1:10, 1:50’lik dilüsyonlar yapıldı. Bu dilüsyonlardan 100 µl alınarak LB/Ampisilin/IPTC/X-Gal petrilere yayıldı.
8. Vektörler Stb3 kompetan hücrelerine transforme edildi. Üreyen beyaz renkli koloniler seçilerek sıvı besiyerine aktarıldı.

3.4.8 Plazmid DNA’nın Elde Edilmesi

Plazmid DNA’sını izole edebilmek amacıyla "Qiagen QIAprep Miniprep Kit" kullanılmıştır. İzolasyon protokolü kitte belirtilen protokole uygun olarak aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1. 5 ml'lik LB/Ampisilin içeren sıvı besiyerinden bir koloni 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı. Çalkalamalı inkübatör üzerinde 220 rpm'de gece boyu inkübe edildi.
2. Tüpler 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
3. Çöken hücreler 250 µl'lik "P1 (Rnase)" tamponu ile karıştırıldı.
4. Üzerine 250 µl "P2 (lisis)" tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı.
5. Karışım üzerine 350 µl "N3 (SDS)" tamponu eklenip solüsyon beyaz renk alana kadar karıştırıldı.
6. Karışım 13000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Süpernatant spin kolonlara aktarılıp 13000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
8. Karışıma 750 µl "PE" yıkama tamponu eklenip 13000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Karışımdaki etanolü uzaklaştırmak için ayrıca 1 dk. daha santrifüj edildi.
10. Filtreli kolon 1,5 ml'lik tüplere yerleştirilerek üzerlerine karışım boşaltıldı.
11. Filtreli kolon üzerine 50 µl "EB" tamponu (10 mM Tris-Cl, pH:8,5) eklenip 1 dk. bekletildi.
12. 1 dk. bekledikten sonra 1 dk. santrifüj edilip supernatant alındı.

Plazmidleri kontrol etme amacıyla şartları Tablo 3-4 ve Tablo 3-5'de verilen PZR tekrarlandı. 249 bç ve 270 bç'lik plazmidlerin PZR sonrası görüntüleri Şekil 3-1'de verilmiştir.

3.4.9 %2 Agaroz Jel Çözeltisi Hazırlanması

1. 0,5X TEB tamponu hazırlandı: 54 g Tris, 27,5 g borik asit, 3,72 g EDTA; pH:7,4. Karışım distile su ile 1 litreye tamamlandı.
2. 0,6 g agaroz, 30 ml 0,5X TEB tamponu içinde manyetik karıştırıcı üzerinde kaynatıldı.
3. Bu karışıma 1 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi.

3.5 Gerçek Zamanlı PZR Ürünlerinin Elde Edilmesi

Çalışmamızda mtDNA 4977 delesyon oranını ölçmek için kullanılan gerçek zamanlı PZR yönteminde kontrol olarak protokolleri 3.4'te verilen plazmidler

kullanıldı. Klonlanmış 249 bç ve 270 bç'lik bölgelerden 1000 fentogram dilüsyondan başlanmak üzere 10'ar kat azalan 4 dilüsyon serisi hazırlanıp standart olarak kullanıldı. Her iki klonlanmış bölgenin kendi standart hesaplaması yapıldı.

3.5.1 mtDNA4977 Delesyonunun Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi ile Tespiti

Mitokondri genomunun büyük delesyonlarından biri olan 4977 baz çifti delesyonu, Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla mitokondriyal DNA genomunun mutasyona kapalı olduğu kabul edilen bir bölgesi olan D-loop bölgesi seçildi. Bu bölge kırılmanın gerçekleştiği 5'-CCAT-3' tekrar dizileri ile 8-hidroksi-2'-deoksiganizin (8-OHdG) oluşumuna duyarlı bölgelerin dışında kalan, 4977 baz çiftlik delesyonun hiçbir dizisini içermeyen bölgelerden biri olup mtDNA genomunu temsil edecek bölge olarak belirlendi. Mitokondri genomu halkasal yapıda olduğundan delesyona uğradıktan sonra yeniden eski haline dönebilmektedir.

mtkF1/mtkR1 mtDNA genomunu temsil eden bölge primerlerini, mtkF2/mtkR2 ise delesyonu temsil eden bölge primerlerini içermektedir. Delesyona uğrayan mtDNA'ya, delesyon için hazırlanmış primerler bağlanabilirken delesyon içermeyen genomlara ise bu primerler bağlanamaz. Bu primerler Tablo 3-7'de verilmiştir.

Tablo 13-7: mtDNA 4977 delesyonunu belirlemede kullanılan primerler

mtk-F1 (249 bç)	5'-AAC ATA CCC ATG GCC AAC-3'
mtk-R1 (249 bç)	5'-AAC ATA CCC ATG GCC AAC-3'
mtk-F2 (270 bç)	5'-TAT GGC CCA CCA TAA TTA CCC-3'
mtk-R2 (270 bç)	5'-AAG CGA GGT TGA CCT GTT AGG-3'

Eş zamanlı PZR yönteminde mtDNA, primerleri (Tablo 3-7), "mastermiks" (Roche) ve su kullanılmıştır. Kullanılan malzemeler Tablo 3-8'de verilmiştir. Örnekler, çalışılma amacıyla 96 kuyucuğa sahip bir plate üzerine yüklenmiş "BioRad CFX Connect" cihazında çalışılmıştır. Çalışmanın protokolü ise Tablo 3-9'da verilmiştir.

Tablo 3-8: : mtDNA kontrol ve mtDNA 4977 delesyonu tespiti için gerçek zamanlı PZR malzemeleri

Total mtDNA kontrol karışımı		mtDNA 4977 delesyon karışımı	
mtDNA	2 µl	mtDNA	2 µl
Primerler (mtk-F1+ mtk-R1)	0,6 µl	Primerler (mtk-F2+ mtk-R2)	0,6 µl
Mastermiks	10 µl	Mastermiks	10 µl
dH ₂ O	7,4 µl	dH ₂ O	7,4 µl

Tablo 3-9: Gerçek zamanlı PZR protokolü

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	+95 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	+95 °C	6 saniye	35
Primer bağlanması	+60 °C	10 saniye	35
Zincir uzaması	+72 °C	10 saniye	35

Gerçek zamanlı PZR’de eşik döngüsü (CT), floresans sinyalinin 3-15. döngüsü ile 10 standart sapma arasında ölçülen floresans sinyallerinin ortalaması olan döngüdür. Başlangıçtaki DNA miktarı ne kadar fazla olursa, PZR sürecinde oluşan ürün o kadar hızlı tespit edilir. Bu durumlarda CT değerleri o oranda daha düşük olur [85]. Karşılaştırmalı $\Delta\Delta Ct$ yöntemi, gen anlatımı düzeyini relatif (göreceli) hesaplayan matematiksel bir yöntemdir [50].

Ct: amplifikasyon eğrisinin eşik değeri geçtiği döngü sayısı olup;

$[\Delta][\Delta]Ct = \text{hedef gen } [\Delta]Ct - \text{referans gen } [\Delta]Ct$ şeklinde ifade edilir.

mtDNA 4977 delesyonu analizinde delesyon oranını hesaplayabilmek için

$[\Delta][\Delta]Ct = \text{Total mtDNA bölgesi (270 bç) } [\Delta]Ct - \text{mtDNA 4977 delesyon bölgesi (249 bç) } [\Delta]Ct$ değerleri kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile elde edilen değerlerden mtDNA 4977 delesyon oranını belirlemek için protokoller 3.4’te verilen plazmidler standart olarak kullanıldı. Klonlanmış 249 bç ve 270 bç’lik bölgelerden 1000 fentogram dilüsyondan başlanmak üzere 10’ar kat azalan 4 dilüsyon serisi hazırlanıp standart olarak kullanıldı. mtDNA

4977 delesyonu ve total mtDNA bölgelerinin klonlanmış plazmitlerde kendi standart hesaplaması yapıldı.

3.6 Global DNA Metilasyonu Analizi

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen DNA örneklerinde global DNA metilasyonu düzeyini belirlemek amacıyla “Zymo Research 5-mC DNA ELISA Kit (Cat Nos: D5325&D5326)” kullanıldı. Deney protokolü, üretici firmanın belirttiği yöntem takip edilerek gerçekleştirildi. ELISA okuması yapmak amacıyla “Thermo Scientific Multiscan Go Microplate Spectrophotometer” kullanıldı.

Global DNA metilasyonu deney protokolü aşağıdaki gibidir:

1. PCR tüplerine 100 ng DNA içermek şartıyla 50 µl DNA ile 50 µl “5-mC Coating Buffe” koyularak 98 °C’de 5 dakika inkübe edildi.
2. Tüpler 5 dakika sonra hemen buza koyulup 10 dakika inkübe edildi.
3. PCR tüplerindeki tüm hacimler 96 kuyucuklu plate üzerine aktarıldı. Plate üzeri aliminyum folyo ile kaplanarak 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
4. Plate içeriğindeki tampon uzaklaştırıldı. Her kuyucuk 3’er kez 200 µl “5-mC ELISA Buffer” ile yıkandı.
5. Yıkamalardan sonra her bir kuyucuğa 200 µl “5mC ELISA Buffer” eklenip üzeri aliminyum folyo ile kaplandı. 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
6. 30 dakikalık inkübasyon sırasında hazırlanan “Anti5-Methylcytosine“ ve “Secondary Antibody“ karışımından her kuyucuğa 100 µl koyuldu. Plate aliminyum folyo ile kaplanarak 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
7. Antikor karışımı kuyucuklardan temizlendikten sonra her kuyucuk 3’er kez kez 200 µl “5-mC ELISA Buffer” ile yıkandı.
8. Kuyucuklara 100 µl “HRP Developer” eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
9. Kuyucuklarda renk değişimi başladığında örnekler 450 nm’de okundu.

3.6 SAM Analizi

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen sperm örneklerine 1 ml PBS tamponu eklenerek 20 saniye sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Patlatılan hücrelerin SAM

düzeyini belirlemek amacıyla “Cell Biolabs SAM and SAH ELISA Combo Kit (Catalog Number: STA-671-C)” kullanıldı. Deney protokolü, üretici firmanın belirttiği yöntem takip edilerek gerçekleştirildi. ELISA okuması yapmak amacıyla “Thermo Scientific Multiscan Go Microplate Spectrophotometer” kullanıldı.

SAM deney protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Deneyde kullanılacak plate kuyucuklarına PBS ile 1:100 oranında dilüe edilen SAM Conjugate solüsyonundan 100 µl koyuldu. 2 saat 37 °C’de inkübe edildi.

2. Kuyucuklardan solüsyon temizlendikten sonra kuyucuklar 3’er kez 200 µl PBS ile yıkandı.

3. Kuyucuklara 200 µl “Assay Diluent” eklenip oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kullanılana kadar +4 °C’de saklandı.

4. +4 °C’de bekletilen plate içerisindeki solüsyon temizlendikten sonra kuyucuklara 50 µl örnek koyuldu. Yatay çalkalayıcı üzerinde 10 dakika inkübe edildi.

5. 1:500 oranında dilüe edilen “Anti-SAM Antibody” solüsyonundan kuyucuklara 50 µl eklenip oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

6. İnkübasyondan sonra kuyucuklar, 3’er kez 250 µl “Wash Buffer” ile yıkandı.

7. 1:1000 oranında dilüe edilen “Secondary Antibody-HRP Conjugate” solüsyonundan kuyucuklara 100 µl eklenip yatay çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.

8. İnkübasyondan sonra kuyucuklar, 3’er kez 250 µl “Wash Buffer” ile yıkandı.

9. Kuyucuklara 100 µl “Substrate Solution” eklenerek yatay çalkalayıcı üzerinde 30 dakikaya kadar inkübe edildi.

10. Renk değişimi başladığı andan itibaren kuyucuklara 100 µl “Stop Solution” eklendi ve hemen 450 nm’de okuma yapıldı.

3.7 ATP Düzeylerinin Belirlenmesi (Bioluminesans)

Hasta ve kontrol grubundan elde edilen sperm örneklerine 1 ml PBS tamponu eklenerek 20 saniye sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Örneklerin içerdiği protein konsantrasyonunu belirlemek için spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm’de ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerden faydalanarak $(1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$ formülü

kullanılarak ml/mg cinsinden protein konsantrasyonları hesaplandı. Patlatılan hücrelerin ATP düzeylerini belirlemek amacıyla “CLS II (ATP Bioluminescence Assay Kit CLC II) (Roche)” kullanıldı. Örneklerdeki ATP miktarları, 1 pM’den 1 mM’a kadar artan ATP konsantrasyonlarından elde edilen standart eğri yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar pmol/mg protein olarak hesaplandı.

ATP düzeyi belirleme deney protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Kör ölçümü ATP yokluğunda yapıldı.
2. Luminesans tüplerine 250 µl örnek ile 250 µl tampon eklendi.

Tampon çözelti: 0,25 M sucroz, 5 mM HEPES, 1 mM EDTA; pH: 7,2.

3. Tüplere 250 µl “luciferase” eklenip 2 dakika bekletildikten sonra kemiluminesans ölçümü yapıldı.

Örneklerin sahip oldukları ATP miktarları, 1 pM’den 1 nM’a kadar artan ATP konsantrasyonlarından elde edilen standart eğri yardımı ile pmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.9 İstatiksel Analiz

Deney sonuçlarının istatiksel analizleri için GraphPad Prism 8.0 programı kullanıldı. Astenospermi hasta grubundan elde edilen deney sonuçları ile kontrol grubundan elde edilen deney sonuçlarının aralarındaki ilişkiyi belirlemek için Mann-Whitney testi uygulandı. Astenospermi hasta ve kontrol gruplarının her biri için mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. Verilerin açıklanmasında ortalama değer \pm standart sapma kullanıldı. Elde edilen sonuçların dağılımının yaygın olup olmadığını belirlemek amacıyla değişim katsayısı kullanıldı. Değişim katsayısı (CV), dağılımdaki standart sapmanın ortalamaya göre yüzdesidir.

3.10 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Benmari su banyosu (Kotterman labortecnic tip 3047)
- BioRad CFX Connect
- Buzdolabı (Arçelik)
- Çeker Ocak

- Derin Dondurucu (-20) (Arçelik)
- Derin Dondurucu (-80) (Sanyo)
- Distile Su Cihazı (Nüve)
- Etüv (Memmert)
- Hassas Terazi (Shimadzu)
- Isı Döngü Cihazları (Techne)
- Karıştırıcı (Janke&Kunkel IKA labor tecnic IKO)
- Kemiluminometre (Labsystems Luminoskan TL)
- Kültür tüpleri (Falcon)
- Luminometri (Labsystems)
- Manyetik Karıştırıcı (Janke&Kunkel)
- Mikro Santrifüj Tüpü (0,5 ml)
- Mikro Santrifüj Tüpü (1,5 ml)
- Muhtelif Cam Eşya
- NanoDrop (ND 1000 Spectrophotometer)
- Otoklav (Hirayama)
- Otomatik Mikropipetler (Eppendorf)
- pH metre (Mettler-Toledo)
- pH Metre (Microprocessor pH meter pH537WTW tip 50)
- Pipet seti (1-1000 mikro litre)
- Santrifüj (Hettich)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich)
- Sonikatör (MSE)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
- Su Banyosu (Kottermann Labortechnik)

- Sukroz (Merck)
- Termal Döngü Cihazı (PCR) (Techne)
- Translüminatör (Vilber Lourmat)
- Vortex (Velp Scientifica)

3.11 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Agar agar (Sigma)
- dNTP (Roche)
- DTT (Ditiotreitol) (Sigma)
- EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Sigma)
- Etidyum Bromid (Sigma)
- HEPES
- İzopropil alkol (Merck)
- KH_2PO_4 .
- Luminol (Sigma)
- Na_2HPO_4 (Sigma)
- NaCl (Sodyum klorür) (Merck)
- NaH_2PO_4 (Sigma)
- Proteinaz K (Thermo Fisher Scientific)
- SDS (Merck)
- Tris (Merck)
- Tris-HCl (Merck)
- Triton-X 100 (Merck)

4. BULGULAR

Çalışma gruplarının demografik özellikleri aşağıda özetlenmiştir (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri

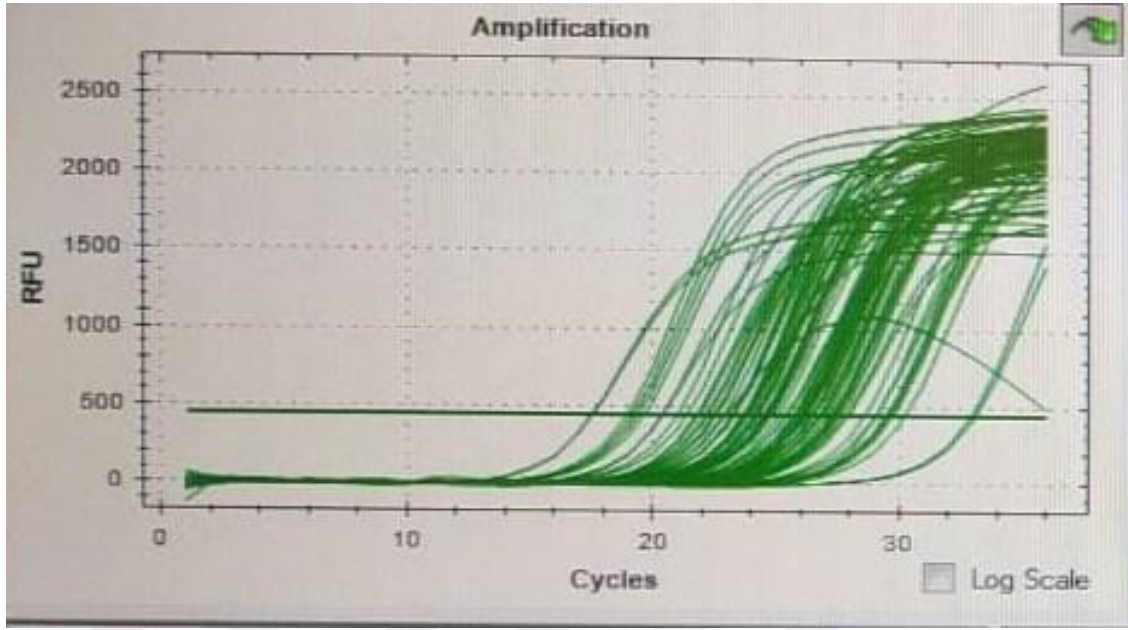
	Hasta	Kontrol	P
Ortalama yaş (yıl)	33,6±5,7	30,6±5,3	>0,05
Ortalama sperm hareketi (%)	6,9±5,4	54,4±12,3	<0,05

4.1 mtDNA 4977 Mutasyonu ve Total mtDNA Miktarlarının Gerçek Zamanlı PZR Analizi

Uygun koşullar belirlenip deney koşulları sağlandıktan sonra, hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin sperm örneklerinden elde edilen DNA örnekleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR deneyleri yapıldı.

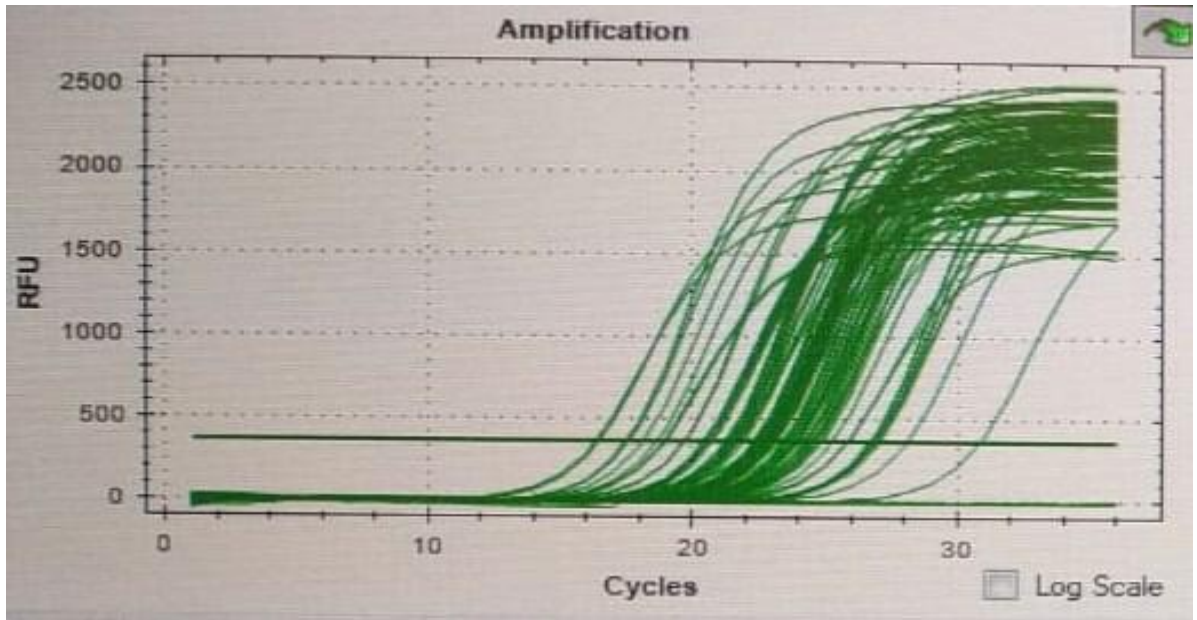
Deneylerin sonucunda yapılan analizlerde hasta ve kontrol grubu örneklerinin total mtDNA (Şekil 4-1) ve mtDNA 4977 delesyonu (Şekil 4-2) varlığını gösteren floresans eğrileri oluşturduğu gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçlara göre, çalışılan tüm bireylerin sperm mtDNA'larında 4977 bç delesyonu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4-2). *

mtDNA 4977 delesyonu hasta grubunda ortalama %50,4±30,4, kontrol grubunda ise %24,1±27,9 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-3). Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin örnekleri mtDNA 4977 delesyonu analizi sonucu incelendiğinde, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($P<0,05$). Astenospermi hasta grubunun kontrol grubuna göre daha yüksek oranda delesyona sahip olduğu belirlenmiştir. Astenospermi hasta grubunda değişim katsayısı (CV) %60,4 iken kontrol grubunda ise %115,75 olarak hesaplanmıştır.



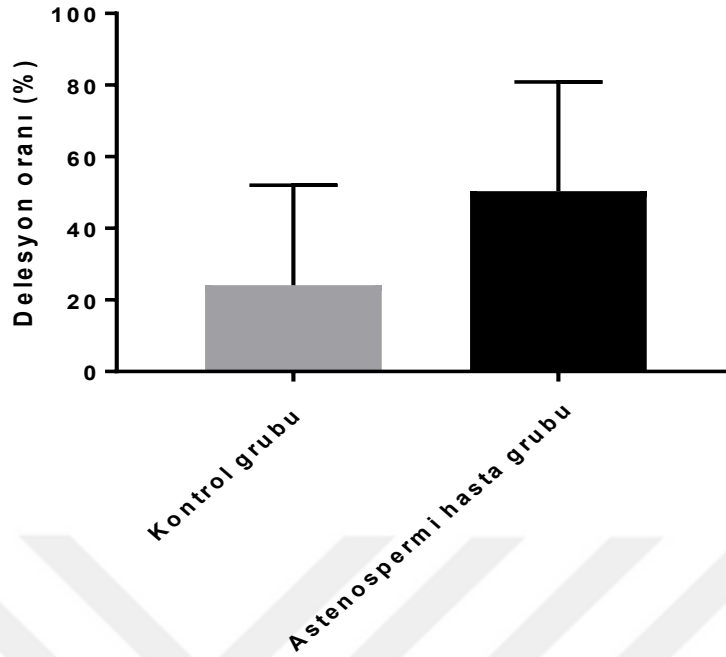
Şekil 4-1: Total mtDNA gerçek zamanlı PZR analiz sonucu

Astenospermik hasta ve kontrol grubu bireylerinin sperm hücrelerinden elde edilen DNA örnekleri ile yapılan, mtk1 primerleri kullanılarak total mtDNA elde edildiğini gösteren gerçek zamanlı PZR sonucu fluoresans eğrilerinin analiz sonucu.



Şekil 4-2: mtDNA 4977 delesyonu gerçek zamanlı PZR analiz sonucu

Astenospermik hasta ve kontrol grubu bireylerinin sperm hücrelerinden elde edilen DNA örnekleri ile yapılan, mtk2 primerleri kullanılarak mtDNA 4977delesyonunun elde edildiğini gösteren gerçek zamanlı PZR sonucu fluoresans eğrilerinin analiz sonucu.



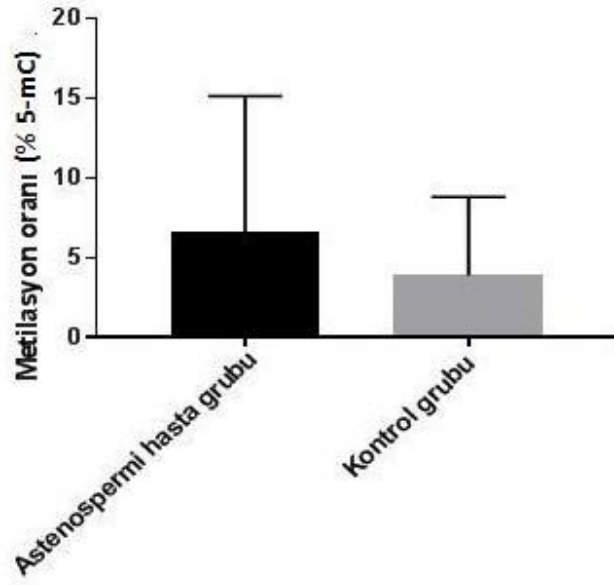
Şekil 4-3: mtDNA 4977 delesyonu analizi sonucu astenospermi hasta grubu ve kontrol grubunun ortalama ve standart sapma değerleri (P=0,0039)

4.2 Global DNA Metilasyonu Analizi

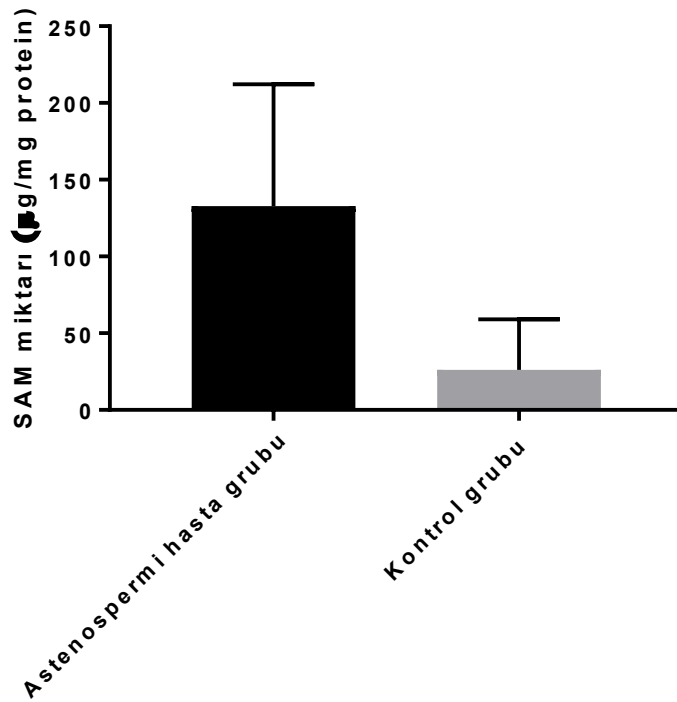
Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin sperm hücrelerinden izole edilen DNA örnekleri ELISA yöntemiyle çalışıldı. Global DNA metilasyon oranı hasta grubunda ortalama $6,65 \pm 8,51$ 5-mC iken kontrol grubunda $3,87 \pm 4,93$ 5-mC olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-4). Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin örnekleri global DNA metilasyonu analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($P > 0,05$).

4.3 SAM ELISA Analizi

Astenospermik hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden alınan sperm hücreleri sonikasyon yöntemi ile patlatılmıştır. Elde edilen hücre içeriğinden ELISA yöntemi kullanılarak SAM düzeyleri tespit edilmiştir. SAM düzeyleri hasta grubunda ortalama $132,80 \pm 79,47$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein, kontrol grubunda ise $26,08 \pm 33,03$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-5). Hasta ve kontrol grubu arasında SAM analizi sonucu istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($P < 0,05$). Astenospermi hasta grubunda CV %59,9 iken kontrol grubunda %126,6 olarak hesaplanmıştır.



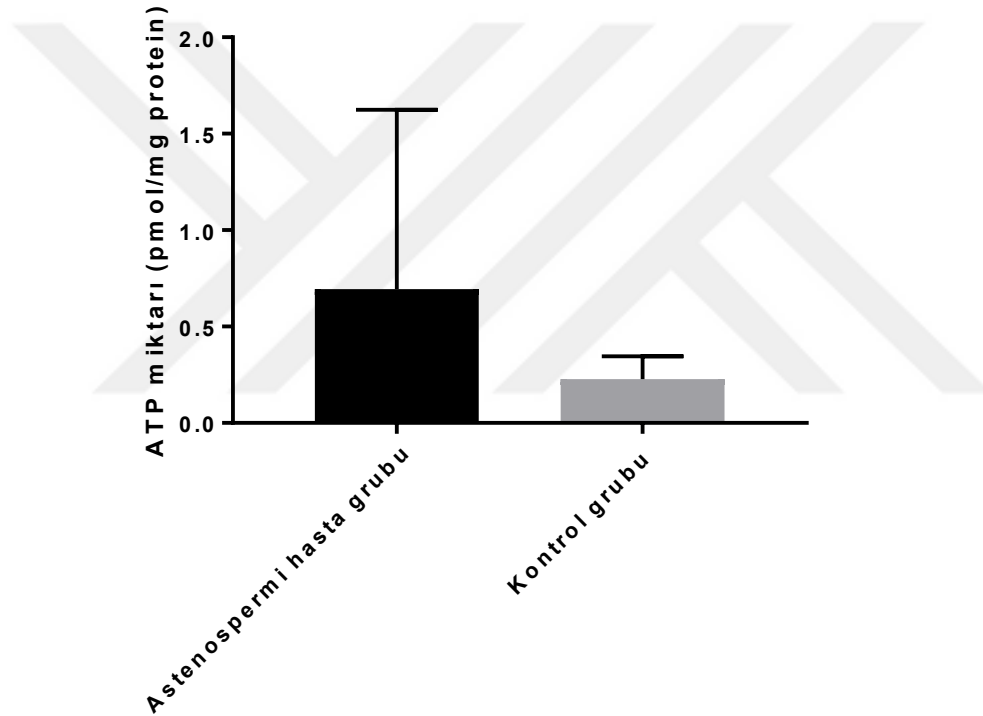
Şekil 4-4:Global DNA metilasyonu analizi sonucu astenospermi hasta grubu ve kontrol grubunun ortalama ve standart sapma değerleri (P=0,6821)



Şekil 4-5:SAM analizi sonucu astenospermik hasta grubu ve kontrol grubunun ortalama ve standart sapma değerleri (P<0,0001)

4.4 ATP Bioluminesans Analizi

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin sperm örneklerinde ATP düzeyleri luminometrik olarak ölçüldü. ATP düzeyleri hasta grubunda mg protein başına ortalama $0,69 \pm 0,93$ pmol, kontrol grubunda mg protein başına ortalama $0,23 \pm 0,12$ pmol olarak hesaplanmıştır (Şekil 4-6). Astenospermi hasta grubunda ATP düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($P < 0,005$). Astenospermi hasta grubunda CV değeri %134,11 iken kontrol grubunda ise %52,25 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-6: ATP bioluminesans analizi sonucu astenospermi hasta grubu ve kontrol grubunun ortalama ve standart sapma değerleri ($P = 0,0037$)

4.6 mtDNA 4977 Delesyonu ile ATP, SAM ve Global DNA Metilasyonu Arasındaki Korelasyon Analizi

mtDNA 4977 delesyonunun etkisinin hem hasta hem kontrol grubunda hangi düzeyde olduğu, Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Hasta grubunda mtDNA 4977 delesyonuyla ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır. Kontrol grubunda da mtDNA 4977 delesyonunun ATP,

SAM, global DNA metilasyonu arasında yapılan korelasyon analizi sonucu korelasyon bulunmamıştır (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasındaki Pearson korelasyon değerleri

	Astenospermi hasta grubu			Kontrol grubu		
	P	r	Hasta sayısı (n)	P	r	Hasta sayısı (n)
ATP	0,57	-0,18	18	0,82	0,05	22
SAM	0,46	-0,22	18	0,84	0,05	22
Global DNA metilasyonu	0,49	0,21	18	0,70	-0,09	22

5. TARTIŞMA

Astenospermi, spermiyogramda sperm hareket bozukluğu belirlenmesi ile tanısı koyulan, beraberinde varikosel, endokrinomaliler ve fonksiyonel bozukluklar gibi çeşitli mekanizmaları içeren, yaygın infertilite sebeplerinden biridir [57]. Spermiogenesis sürecinde hücre içeriğinin çoğunu kaybeden sperm hücrelerinde, hareketi sağlamak için ihtiyaç duyulan ATP enerjisini karşılamak üzere gerekli olan tek organel mitokondridir [80]. Sperm aktivitesi için mitokondri morfolojisi ve fonksiyonu önemli olduğundan, mitokondride oluşabilecek herhangi bir hasar sperm hareketlerinde soruna neden olabilmektedir. Mitokondriyal DNA'nın koruyucu proteinleri olmaması, reaktif oksijen türleri ile direk temas halinde olması, replikasyon sırasında meydana gelen yanlış baz eşleşmelerini tamir edecek mekanizması olmaması mutasyon oluşma olasılığını nüklear genoma göre 10-100 kat artırmaktadır [28]. Sperm hücrelerinde astenospermi oluşumuna neden olan hasarlardan biri mtDNA4977 delesyonudur. Delesyon sonucu mtDNA üzerinde yer alan ve oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezinde gerekli olan genlerden önemli bir kısmı kaybolur. Sperm hücresi için gerekli olan ATP'nin sentezlenememesi nedeniyle meydana gelen hareket bozukluklarının infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir [42, 78].

Biz de çalışmamızda, mtDNA 4977 delesyonu olan bireylerde ATP sentezinin bozularak üretiminin azalabileceği ve bu durumda DNA metilasyonunda önemli bir metil grubu vericisi olan SAM düzeylerinin de azalarak sonuçta DNA metilasyon oranının azalabileceği varsayımıyla yola çıktık. Bu durumdan en çok etkilenmesi olası hücrelerden birisi sperm hücreleridir. Bu nedenle, çalışmamızda çalışma grubu olarak düzenli ilişkiye rağmen henüz çocuk sahibi olamamış, varikosel olmayan astenospermik infertil bireyler ve en az bir çocuk sahibi olan sağlıklı bireylerden aldığımız semen örnekleri kullanıldı.

mtDNA4977 delesyonuna ilişkin yapılan gerçek zamanlı PZR yöntemi ile mtDNA 4977 delesyon bölgesini temsil eden 270 bp'lik bölge ve total mtDNA'yı temsil eden 249 bp'lik primerlerden faydalanılarak bu bölgeleri içeren "stb3" kompetan hücreleri üretilmiştir. "Stb3" kompetan hücrelerinden elde edilen vektörlerin seri dilüsyonu yapılmış ve vektörlerin çoğalma miktarlarını karşılaştırmak için Δ Ct yöntemi kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile hasta ve sağlıklı bireylerin sperm mtDNA 4977 delesyon değerleri ölçülmüş ve mtDNA 4977 delesyonu hasta grubunda

%50,4±30,4, kontrol grubunda ise %24,1±27,9 olarak hesaplanmıştır. Astenospermik hasta grubu ve kontrol grubu arasında mtDNA 4977 delesyon sonuçları ile yapılan istatistiksel analiz sonucu iki grup arasında istatistiksel anlamda anlamlılık bulunmuştur ($P<0,05$). Astenospermik hasta grubunda, kontrol grubuna göre delesyon oranının daha yüksek çıkması da daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir [8, 30, 58]. Fakat astenospermi hasta ve kontrol grubu sonuçlarında standart sapma fazla görülmüştür.

mtDNA 4977 delesyonu ile kayba uğrayan ATPaz 6/8, COXIII, ND3, ND4, ND4L ve ND5 gen bölgeleri dahil yirmi yapısal geni, ATP'nin oksidatif fosforilasyonu için gereklidir. Mitokondride meydana gelen mtDNA4977 delesyonunun oksidatif fosforilasyonu inhibe etmesi nedeniyle sperm hücrelerinde ATP düzeylerinin ölçülmesi gerekmektedir. Bioluminesans yöntemi ile sperm hücrelerindeki ATP miktar ölçümleri yapıldı. Hasta grubunda ATP miktarı 0,69±0,93 pmol/mg protein iken kontrol grubunda 0,22±0,11 pmol/mg protein olarak hesaplanmıştır. Astenospermik hasta grubu ve kontrol grubu arasında ATP miktarları ile yapılan istatistiksel analiz sonucu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($P<0,05$). Kontrol grubunun mtDNA 4977 delesyonu sonuçlarına göre ise, delesyon oranının astenospermi hasta grubuna göre düşük olması sperm hücresinin ATP sentezini delesyonlu olmayan mitokondrilerden sağladığını ve sentezlenen ATP'nin hücre için yeterli olduğunu varsayılabilir. Fakat astenospermik hasta grubunun kontrol grubuna göre oldukça yüksek ATP miktarına sahip olduğu bulunmuştur. Ancak Nascimento ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sperm motilitesi için gerekli olan ATP'nin mitokondriden sağlanmayıp; sperm aksoneminde glikolizle üretilen enerjiden sağlandığı belirtilmektedir [59]. Buna rağmen elde edilen ATP'nin sperm tarafından yeterince kullanılmadığını ve ATP birikimine yol açtığını düşündürmektedir.

ATP'nin katalizlediği bir reaksiyon sonucu oluşan SAM, hücre içinde metil grubu vericisi olarak ve bir antioksidan olan GSH oluşumunu sağlayarak görev yapar. SAM'ın dekarboksilasyonu ile başlayan aminopropilasyon ile hücre farklılaşması ve DNA-RNA stabilizasyonunun sağlanması gelişim için gereklidir [34]. mtDNA'da meydana gelen mutasyonların SAM düzeyi ile ilgili ilişkisini tespit edebilmek amacıyla ELISA yöntemi kullanıldı. Hasta grubunda SAM düzeyleri 132,8±79,47 µg/mg protein, kontrol grubunda ise 26,08±33,03 µg/mg protein olarak bulunmuştur. Astenospermik hasta grubu ve kontrol grubu arasında SAM miktarları ile yapılan istatistiksel analiz

sonucu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($P<0,05$). Astenospermik hasta grubunda kontrol grubuna göre SAM miktarının daha fazla olması astenospermik hasta grubunda gözlenen yüksek ATP miktarlarıyla ilişkili olabilir. Oksidatif stresin yüksek olması, DNA üzerinde kırıklara sebep olabilmektedir. mtDNA'nın nükleer genoma göre mutasyona daha yatkın olması nedeniyle geniş çaplı delesyonların gerçekleşme olasılığı artmaktadır [24]. Oksidatif stres oranını düşürmek amacıyla SAM düzeyinin artması beklenen bir yaklaşım olmasının yanı sıra, metil grubu vericisi olarak da görev yapması nedeniyle global metilasyon profilindeki rolü de önemlidir.

Erkek bireylerde global DNA metilasyonu, implantasyon ve spermiogenesis sürecinde gerçekleşir. Global DNA metilasyonu sperm gelişiminde kromatin düzenlenmesi için gereklidir. Yapılan çalışmalarda hipometile global DNA'nın infertilite ve düşükler gibi sorunlara yol açtığı belirtilmiştir. Astenospermik hasta ve kontrol grubundaki bireylerden elde edilen sperm örnekleri sonikasyon yöntemi ile patlatıldıktan sonra ELISA yöntemi ile global DNA metilasyonu ölçümleri yapıldı. Global DNA metilasyonu düzeyleri hasta grubunda $6,65\pm 8,511$ 5-mC iken kontrol grubunda $3,87\pm 4,93$ 5-mC olarak hesaplanmıştır. Astenospermi hasta grubunda standart sapmanın değişken olmasından dolayı kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($P>0,05$).

Çalışmamızda, astenospermi hasta grubunda hem global DNA metilasyon oranı hem de SAM miktarları yüksek bulunmuştur. Oksidatif stres nedeniyle sperm nükleer DNA'sında hipometilasyon olduğu literatürde mevcuttur. 8-OHdG'in metil-CpG bağlanma proteinine (MBP) bağlanması ile DNA metilasyon sürecinin engellendiği; ayrıca DNA metilasyonu ile seminal ROT (Reaktif oksijen türleri) arasında negatif korelasyon olmasına rağmen oksidatif hasarın DNA hipometilasyonuna sebep olduğu belirtilmiştir. [84]. Oligoastenospermik bireyler üzerinde yapılan bir çalışma da CpG adacıklarında metilasyon profilinin düşük olduğu belirtilmiştir [22]. Bir başka çalışma da MEST geni üzerinde hipometilasyonun sperm motilitesi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu belirtilmektedir [47]. Çalışmamız sonucunda astenospermi hasta grubunda yüksek global DNA metilasyonu belirlenmiştir. mtDNA'nın da metilasyon profiline sahip olması nedeniyle SAM'ın mtDNA için metil grubu verici etkisi bulunmaktadır. Diğer yandan SAM, GSH sentezindeki rolü nedeniyle mtDNA'nın oksidasyondan korunmasında yardımcı olmaktadır. Elde ettiğimiz bulgular vasıtasıyla, astenospermi

hasta grubunda yüksek SAM düzeylerinin yüksek global DNA metilasyonu ile ilişkili olabileceği görülmektedir.

Astenospermik hasta grubunun deney sonuçları kendi içinde analiz edildiğinde mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasında pozitif korelasyon kurulamamıştır. Kontrol grubuna göre astenospermik hasta grubunun mtDNA 4977 delesyonu oranının fazla olmasına rağmen ATP sentezi de yüksektir. ATP'nin sentezini katalizlediği SAM'ın astenospermik bireylerde kontrol grubuna göre yüksek oranda bulunması da, ATP sentezinin gerçekleştiği bulgusunu desteklemektedir. Korelasyon analizi sonucu mtDNA 4977 delesyonu ile SAM arasında pozitif korelasyon olmaması, bu görüşümüzü destekler niteliktedir. Yüksek DNA metilasyonu düzeylerinin spermatogenez sürecinde gerekli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [50, 56]. Çalışmamızda astenospermi hasta grubunun kontrol grubuna göre daha yüksek oranda metilasyon oranına sahip olmasına rağmen kontrol grubu ile aralarında anlamlılık olmadığı ve mtDNA 4977 delesyonu ile pozitif korelasyona sahip olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4-2). Hasta sayısının az olması ve metilasyon profilini etkileyen durumların (sigara kullanımı, beslenme koşulları vb.) anemnezde alınmamış olması nedeniyle global mtDNA 4977 delesyonu ile global DNA metilasyonu arasında bağlantı kurulamamıştır.

Kontrol grubunun deney sonuçları kendi içinde analiz edildiğinde; mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM, global DNA metilasyonu arasında korelasyon görülmemiştir. Hücre içi ATP düzeylerinin astenospermik gruba göre çok daha düşük olması, astenospermik grupta bilmediğimiz başka bir nedenden dolayı ATP'nin kullanılmadığını düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz sonuç ve bulguları astenospermi vakalarındaki mtDNA 4977 delesyonu ile ATP, SAM ve global DNA metilasyonu arasındaki ilişkileri açıklamakta yeterli değildir. Astenospermi hasta ve kontrol grubu deney sonuçlarının standart sapma değerleri fazla görülmüştür. Bunun sebepleri arasında; kişiler arasında genetik varyasyon [10, 16, 80], etnik grup farklılıkları, kullanılmış olabilecek ilaçlar ile beslenme koşullarının anemnezde alınmayarak çalışma kriterleri arasına dahil edilmemesi ve çalışmaya dahil edilebilen astenospermi hasta ve kontrol sayısının az olması sayılabilir. Örnek sayısının az olması nedeniyle, astenospermik hasta ve kontrol grubundan elde edilen örneklerin sahip olduğu mtDNA 4977 delesyon oranının ATP sentezinde etkili olup olmadığı örneklem sayısı artırılarak araştırılması gerekmektedir.

Aynı zamanda sperm hücrelerinin sahip olduğu glikoliz oranının ATP sentezindeki rolü de mtDNA4977 delesyonu ile karşılaştırılmamıştır. Astenospermik hasta grubunda SAM düzeylerinin kontrol grubuna göre çok daha yüksek olması bu grupta oksidatif stresin yüksek olduğunu düşündürmesine rağmen oksidatif stres düzeylerinin ölçülememiş olması mtDNA 4977 delesyonu ile ilişkisini açıklamakta yetersizdir. Ayrıca astenospermi hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki mitokondri kopya sayılarının ve heteroplazmi oranının analiz edilmesi de ATP sentezinde görevli mekanizmayı belirlemede yardımcı olabilir. Spermde hareketi sağlayan ve kuyruk yapısını oluşturan aksonemlerin ATP'den enerji sağlayamaması veya sağlanan enerjiyi kullanamaması nedeniyle astenospermi hasta grubundaki ATP miktarının kontrol grubuna göre çok daha fazla olması sperm motilite bozukluğuna neden olabilir. Astenospermi hasta grubunda kontrol grubuna göre göreceli daha fazla global DNA metilasyonuna sahip olması (Şekil 4-4) veya bu genlerde mutasyon oluşması, aksonem oluşumu için gerekli transkripsiyonun gerçekleşmemesine sebep olabilir. Astenospermik bireylerdeki aksonem yapısına katılan genlere yönelik yapılacak DNA metilasyonu veya mutasyon analizleri, düşük sperm motilitesiyle aksonem arasındaki ilişkiyi açıklamaya yardımcı olabilir.

Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda; örneklem sayısının artırılması bulgularımızda gözlenen bireysel farklılıklardan kaynaklanabilecek uç değerlerin normalizasyonuna ve standart sapmalarda gözlenen aşırı yüksekliklerin azalmasında yardımcı olabilir. Bunun yanısıra hasta grubunda bilgimiz dışındaki diğer fiziksel, hormonal ve kişisel etkenlerin de bulgularımız üzerinde etkilerinin olması muhtemeldir. Ayrıca, sperm hücrelerindeki ATP üretimi ve kullanımını etkileyen mekanizmaların anlaşılması ile astenospermik hastalarda aksonemdeki hareket bozukluğunun genetik veya metilasyona bağlı olup olmadığının anlaşılması ve bunların SAM mekanizmasıyla bağlantılarının araştırılması; diğer yandan hücre içinde oluşabilecek serbest radikal hasarı ve miktarının belirlenmesiyle ilgili parametrelerin de ileride yapılacak çalışmalarda göz önünde bulundurulması yerinde olacaktır. Bu şekilde daha fazla denek sayıları ile yapılacak geniş kapsamlı analizler ile elde edilecek sonuçların astenospermik infertil bireylerde sperm motilite bozukluğuna sebep olabilecek mekanizmayı açıklayabilmesini umuyoruz.

KAYNAKLAR

1. Abasalt H.C., Jorsaraci S.G., Maryam G.C. Lipid peroxidation and large-scale deletions of mitochondrial DNA in asthenoteratospermic patients. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 2013; Vol. 50, pp. 49-499.
2. Abou-Haila A, Tulsiani DR. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 2000; 379: 173-182.
3. Aktümsek A. *Anatomi ve Fizyoloji, İnsan Biyolojisi*; Ankara: Nobel Yayın Dağıtım; 2010.
4. Alkan V.E., Başar M.M. Sperm motilite bozuklukları: Terminoloji, etiyoloji ve tedavide yenilikler.. *Memorial Şişli Hastanesi, Üroloji Bölümü*.
5. Alston C. L., Rocha M. C., Lax N. Z., Turnbull D. M., Taylor R. W. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *Journal of Pathology* 2017; 241: 236–250.
6. Alves M.G., Martins A.D., Rato L, Moreira P.I., Socorro S, Oliveira P.F. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochimica Biophysica Acta* 2013; 1832(5):626-35.
7. Amaral A., Lourenço B., Marques M., Santos J. R. Mitochondria functionality and sperm quality. *Society Reproduction and Fertility* 2013; 146: 163- 174.
8. Ambulkar P.S., Waghmare J.E., Chaudhari A.R., Wankhede V.R., Tarnekar A.M., Shende M.R., Pal A.K. Large scale 7436 bp deletions in human sperm mitochondrial DNA with spermatozoa dysfunction and male infertility. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016; Vol. 10 (11): GC09- GC12.
9. Aydos K. Erkek İnfertilitesi. İçinde: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N (editörler). *Temel Üroloji*. 3. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2007: 967- 1011.
10. Baklouti-GarGouri S., Ghorbel M., Ben Mahmoud A., Mkaouar-Rehal E., Cherif M., Chakroun N., Sellami A., Fakhfakh F., Ammar-Keskes L. Mitochondrial DNA mutations and polymorphisms in asthenospermic infertile men. *Molecular Biology Reports* 2013; 40:4705-4712.
11. Bailey S. M., Robinson G., Pinner A., Chamlee L., Ulasova E., Pompillius M., Page G.P., Chhieng D., Jhala N., Landar A., Kharbanda K.K., Ballinger S., Usmar V.D. S-adenosylmethionine prevents chronic alcohol-induced

- mitochondrial dysfunction in the rat liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006 Nov; Vol. 291: G857- G867.
12. Beal M. A., Yauk C. L., Marchetti F.; From sperm to offspring: assessing the heritage genetic consequences of paternal smoking and potential public health impacts. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research Elsevier* 2017; 773 (2017):26-50.
 13. Beştepe N., Özdemir D., Çakır B. Klinefelter Sendromu ve Fertilité. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medicine* 2018; 3(1):1-11.
 14. Bonanno O., Romeo G., Asero P., Pezzino F.M., Castiglione R., Burrello N., Sidoti G., Frajese G. V., Vicari E., D'Agata R. Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations. *Reproduction* 2016; 152 695–704.
 15. Bora E. Mitokondrial Mutasyonların İnfertil Erkeklerin Semen Motilitesine Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Doktora Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, 2006.
 16. Bora E., Giray Bozkaya Ö., Ataman E., Çankaya T., Kefi A., Ülgenalp A., Özkınay F. Anormal sperm motilitesine bağlı erkek infertilitesinde mitokondriyal A3243G mutasyonunun rolü. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2015; Cilt 29, 3:89-94.
 17. Bush A., Chodhari R., Collins N., Copeland F., Hall P., Harcourt J., Hariri M., Hogg C., Lucas J., Mitchison H. M., O'Callaghan C., Phillips G.. Primary ciliary dyskinesia. *Archives Diseases Child* 2007; 92:1136–1140.
 18. Cassina A., Silveira P., Cantu L., Montes J.M., Radi R., Sapiro R. Defective human sperm cells are associated with mitochondrial dysfunction and oxidant production. *Biology of Reproduction* 2015; 93 (5): 119, 1- 10.
 19. Chemes H.E., Olmedo S.B., Carrere C., Oses R., Carizza C., Leisner M., Blaquier J. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Human Reproduction*, Volume 13, Issue 9 1998; 2521-2526.
 20. Chemes H.E., Brugo S, Zanchetti C, Carrere C and Lavieri J.C. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertil Steril* 1987; 48,664–669.

21. Chinnery P. F., Hudson G. Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin* 2013; 106: 135–159.
22. Cui X., Jing X., Wu X., Yan M., Li Q., Shen Y., Wang Z. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2016; 12:1973-1979.
23. Çayan S. Erkek İnfertilitesi Değerlendirme, Medikal ve Cerrahi Tedaviler. Üroloji Anabilim Dalı, Mersin Üniversitesi.
http://www.uroturk.org.tr/urolojiData/Uploads/files/Selahittin_cayan-Erkek_infertilitesi_degerlendirme_Medikal_ve_Cerrahi_Tedaviler_sertifikasyon.pdf
24. Çayan S., Özdemir A., Orhan İ., Altay B., Kadioğlu A. Oksidatif stresin fertiliteye etkisi ve infertil erkeklerde anti-oksidan tedavinin yeri. *Androloji Bülteni* 2015; 17(61): 118-124.
25. Dada R., Kumar M., Jesudasan R., Fernández J. L., Gosálvez J., Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2012; 29: 213- 223.
26. De Kretser D. Molecular Reproduction. In: Knobil CE, Neal J. (Editörler). *Physiology of Reproduction*, New York, Raven Press; 1994: 302-459.
27. Drake, R.I., Vogl, W. & Mitchell, A.W.M. *Grays Anatomi*, (Çev:Yıldırım, M.), Ankara, Güneş Kitabevleri; 2007.
28. Eddy E.M., Toshimori K., O'Brien D.A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* 2003; 61:103-15.
29. Erimşah S., Seçkin İ., Uludağ S., İrez T.; Sperm morfolojisi ve kromatin kondensasyon defektleri arasındaki korelasyon. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2008; 39(4): 128-135.
30. Gashti N.G., Salehi Z., Madani A.H., Dalivandan S.T. 4977 bp mtDNA deletion in infertile patients with varicocele. *Andrologia* 2014; 46, 258- 262.
31. Görüş S., Bilgi N. Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda cinsel fonksiyon bozukluğu ve hemşirelik bakımı. *Nefroloji Hemşireliği Dergisi* 2015.
32. Gözükara K.H., Görür S. Ürogenital enfeksiyonlar ve erkek infertilitesi. *Androloji Bülteni* 2015; 17(60):43-48.
33. Güzel Ö., Atan A., Aslan Y. Hiperprolaktinemi ve erektil disfonksiyon. *Androloji Bülteni* 2018; 20:90–94.

34. Hakovirta H, Yan W, Kaleva M, Zhang F, Vanttinen K, Morris PL, Söder M, Parvinen M, Toppari J. Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology*, 1999; 140: 1492-1498.
35. Hao X., Huang Y., Qiu M., Yin C., Ren H., Gan H., Li H., Zhou Y., Xia J., Li W., Guo L., Angres I.A. Immunoassay of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine: the methylation index as a biomarker for disease and health status. *BMC Research Notes* 2016; 9:498.
36. Hellstrom WJ, Overstreet JW, Sikka SC, Denne J, Ahuja S, Hoover AM, Sides GD, Cordell, WH, Harrison M, Whitaker JS. Semen and sperm reference ranges for men 45 years of age and older. *Journal of Andrology* 2006; 27: 421-428.
37. Hendry V.F., Sommerville O.F., Retal H.R. Investigation and treatment of the subfertile male. *British Journal of Urology* 1999; 45: 684-692.
38. Henkel R., Bittner J., Weber R., Hither F., Miska W. Relevance of zinc in human sperm flagella and relation to motility. *Fertil Steril* 1999; 71:1138-43.
39. Heyting C. Synaptonemal complexes: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* 1996; 8: 389-396.
40. Hoskins D.D., Brandt H., Acoff T.S. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Federation Proceedings* 1978; 37: 2534.
41. Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı <http://www.nefroloji.org.tr/icerik.php?gid=27>
42. Ieremiadou F, Rodakis GC. Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction. *BMC Research Notes* 2009; 2:18.
43. Jain G.C., Jangir R.N. Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal. *Pharmacogn Rev.* 2014
44. Kadioğlu A., Çayan S., Semerci B., Orhan İ., Aşçı R., Yaman M.Ö., Usta M.F., Kendirci M. 2004. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri.
45. Kadioğlu A., çeviri editörü. *WHO Laboratuar El Kitabı: İnsan Semeninin İncelenmesi ve İşlemlerden Geçirilmesi*. Beşinci Basım. 2010. İstanbul: Türk Üroloji Derneği.

46. Kierszenbaum A.L. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*. 2006. Ankara; Palme Yayıncılık.
47. Kläver R., Tüttelmann F., Bleiziffer A., Haaf T., Kliesch S. DNA methylation in spermatozoa as a prospective marker in andrology. *American Society of Andrology and European Academy of Andrology* 2013; 1:731-740.
48. Koşar P. A., Özçelik N. Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme. *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 14(3)/ 48-51.
49. Kumar, D. P., Sangeetha, N. Mitochondrial DNA mutations and male infertility. *Indian Journal of Human Genetics* 2009; 15: 93–97.
50. Laqqan M., Hammadeh M.E. Alterations in DNA methylation patterns and gene expression in spermatozoa of subfertile males. *Andrologia* 2017.
51. Lehti M. S., Sironen A.; Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. *Society for Reproduction and Fertility* 2016; 151: R43-R54.
52. Liu O.Y., Jennings M.G., Saker H.W.G. Correlation between defective motility (asthenospermia) and atp reactivation of demembranated human spermatozoa. *Journal of Andrology* 1987; 18: 349.
53. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 22DDCT method. *METHODS* 2001; 25:402–408.
54. Long M.D., Smiraglia D.J., Campbell M.J. The genomic impact of DNA CpG methylation on gene expression; relationships in prostate cancer. *Biomolecules* 2017; 7,15.
55. Martí'nez-Lo'pez N., Varela-Rey M., Ariz U., Embade N., Vazquez-Chantada M., Fernandez-Ramos D., Gomez-Santos L., Lu S.C., Mato J.M., Martinez-Chantar M.L. S-Adenosylmethionine and proliferation: new pathways, new targets. *Biochemical Society Transactions* 2008; 36:848-852.
56. Montjean D., Zini A., Ravel C., Belloc S., Dalleac A., Copin H., Boyer P., McElreavey K., Benkhalifa M. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *American Society of Andrology and European Academy of Andrology* 2015; 3:235-240.
57. Morelli M.A, Cohen P.E. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 2005, 130: 761-781.

58. Namaghi I.B., Vaziri H. Sperm Mitochondrial DNA deletion in Iranian infertiles with asthenozoospermia. *Andrologia* 2016; 49:e12627.
59. Nascimento J.M., Shi L.Z., Tam J., Chandsaangbhuana C., Durrant B., Botvinick E.L., Berns M.W. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *Journal of Cellular Biology* 2008; 217(3):745-751.
60. Naviaux R.K. Mitochondrial control of epigenetics. *Cancer Biology and Therapy* 2008; 7:1191-1193.
61. O'Donnel L., Nicholls P.K., O'Bryan M.K., McLachlan R.I., Stanton P.G. Spermiation, the process of sperm release. *Landes Bioscience*, 2011; 1:14-35.
62. Okan D. Sıçanlarda Streptozotosin Diyabet ve Eksojen C Vitamini (Askorbikasıit) Uygulamasına Timus Lenfositlerinin Cevabı. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 2010.
63. Özdemir O., Sarı M. E., Akmut E., Özcanlı G., Atalay C. R. Komplet androjen duyarısızlık sendromlu üç kız kardeş: Olgu sunumu. *Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology Society* 2014; 2:139-41.
64. Özpak L., Pazarbaşı A. Erkek infertilitesinin sitogenetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2011; 20:230.
65. Piomboni P. Focarelli R., Stendardi A., Ferramosca A., Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility plants. *Pharmacogn Rev* 2014; 8(16):113-21.
66. Piomboni P., Focarelli R., Stendardi A., Ferramosca A., Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International Journal of Andrology* 2012; 35, 109–124.
67. Polat S. *Ürogenital Sistem İçinde Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. 8. Baskı. Dalçık H, Yıldırım M, editörler. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009:243-283.
68. Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal* 2009; 50 (4): 336.
69. Rajender S., Avery K., Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research* 2011; 62-71.
70. Sadler T.W. *Langman's Medical Embryology*, 9th ed. Montana, 2005:321-363.

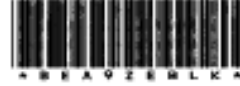
71. Sanderson S.M., Gao X., Dai Z., Locasale J.W. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Diet and Systemic Metabolism* 2019; 625-637.
72. Seçkin İ., Editör. *Embriyoloji Ders Kitabı*, 1. Baskı, İstanbul, İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayın Evi, 2008: 215-260.
73. Setchell B.P., Maddocks S. The Male Reproductive System. *Knobil and Neill's The Physiology of Reproduction*. Raven Pres, Ltd. New York; 1994:1063-1175.
74. Shaughnessy D.T., McAllister K., Worth L., Haugen A., Meyer J.N., Domann F.E., Houten B.V., Mostoslavsky R., Bultman S.J., Baccarelli A.A., Begley T.J., Sobol R.W., Hirschey M.D., Ideker T., Santos J.H., Copeland W.C., Tice R.R., Balshaw D.M., Tyson F.L. Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. *Environmental Health Perspectives* 2014; 122: 1271- 1278.
75. Shaughnessy D.T., McAllister K., Worth L., Haugen A.C., Meyer J.N., Domann F.E., Van Houten B., Mostoslavsky R., Bultman S.J., Baccarelli A.A., Begley T.J., Sobol R.W., Hirschey M.D., Ideker T., Santos J.H., Copeland W.C., Tice R.R., Balshaw D.M., Tyson F.L., Carrell D.T., Ph.D., H.C.L.D. Epigenetics of the male gamete. *Fertility and Sterility* 2015; 97:267-274.
76. Su X, Wellen K.E., Rabinowitz J.D. Metabolic control of methylation and acetylation. *Current Opinion in Chemical Biology* 2016; 30:52-60.
77. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Ortak Alanlar, Üreme Sistemi; 720S00032. Ankara, 2012.
78. Talebi E., Karimian M., Nikzad H. Association of sperm mitochondrial DNA deletions with male infertility in an Iranian population. *Mitochondrial DNA Part A* 2017; 23-33.
79. Tajima Y, Sawada K, Morimoto T, Nishimune Y. Switching of Mouse spermatogonial proliferation from the c-kit receptor-independent type to the receptor-dependent type during differentiation. *Journal of Reproduction & Infertility*, 1994; 102: 117-122.
80. Terzioğlu F., Yücel Ç., Karatay G. 2008. "Sigara ve İnfertilite" in: Bilir N (Ed) Tütünle Mücadele Bilgi Serisi. Klasmat Matbaacılık, Ankara, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 735, 61-73.

81. Thangaraj K., Joshi M.B., Reddy A.G., Rasalkar A.A., Singh L. Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility. *Journal of Andrology* 2003; 24: 388- 392.
82. Tian M., Bao H., Martin F.L., Zhang J., Liu L., Huang Q., Shen H. Association of DNA methylation and mitochondrial DNA copy number with human semen quality. *Biology of Reproduction* 2014; 91 (4): 101, 1-8.
83. Trasler J.M. Epigenetics in spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 33-36.
84. Tunc O., Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2009; 26:537- 544.
85. Tur-Kaspa I., Maor Y., Levran D., Yonish M., Mashiach S., Dor J. How often should infertile men have intercourse to achieve conception? *Fertil Steril* 1994; 62:370-75.
86. Turner R.M. Teles from the tail: What Do We Really Know About Sperm Motility?. *Journal of Andrology* 2003; Vol. 24, No.6.
87. Türk Androloji Bülteni
<http://www.androloji.org.tr/6/hastalar-icin/26/infertilitede-kisirlik-erkegin-rolu>
88. van Pelt A.M., van Dissel-Emiliani F.M., Gaemers I.C., van der Burg M.J., Tanke H.J., de Rooij D.G.. Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis. *Biology of Reproduction*, 1995; 53: 570-578.
89. Weighardt F. Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri. Bölüm 10: GDO'ların saptanması için Nicel PCR. *JRC European Commission* 1999.
90. Yang Y., Huang W., Huang J.T., Shen F., Xiong J., Yuan E-F., Qin S.S., Zhang M., Feng Y.Q., Yuan B.F., Liu S.M. Increased N⁶- methyladenosine in human sperm RNA as a risk factor for asthenozoospermia. *Nature* 2016; 6: 24345.
91. Yiğın A.K., Gökçe A. Y kromozomu mikrodelsyonları ve erkek infertilitesi. *Androloji Bülteni* 2016; 18(65): 126–129.
92. Yiğit A., Güneş V.E. Epigenetik ve Tek Karbon Metabolizması: Folat ve B12 Vitamininin Rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medicine* 2018; 3(3):95-101.

93. Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T, Nishikawa S. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development*, 1991; 113: 689-699.
94. Yuan H.F., Zhao K., Zang Y., Liu, Y., Hu Z.Y., Wei J.J., Zhou T., Li Y., Zhang H.P. Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of *Esr1*, *Cav1*, and *Elavl1*, and its influence on spermatogenesis. *Oncotarget* 2017; 8:24130-24141.
95. Zhang J., Zheng Y.G. SAM/SAH Analogs as versatile tools for sam-dependent methyltransferases. *ACS Chemical Biology* 2016; 11(3):583-597.
96. Zülfikaroğlu G., Özgür H., Polat S.; Kapasitasyonun moleküler temelleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2010; 19:12.
97. https://www.researchgate.net/figure/The-map-of-human-mitochondrial-DNA-OH-and-OL-Origins-of-heavy-and-light-strand_fig2_269721733

ETİK KURUL ONAYI

İÜC Tarih ve Sayı: 07/02/2018-52087



T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Yüksek Lisans Öğr.Ezgi
TERZİ'nin etik kurul kararı A-40

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :22.01.2018 tarihli, 66018902-050.99-29605 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi Doç.Dr. Ahmet ÖZAYDIN'ın danışmanlığında Yüksek Lisans Öğr.Ezgi TERZİ'nin yürütücülüğünde Prof.Dr. Hamdi ÖZKARAA'nın yardımcılığında "Sperm mtDNA 4977 Delesyonu ile ATP ve SAM Düzeylerinin Sperm Motilitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 06 Şubat 2018 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
Bölüm Başkanı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

[Doğrulamak için:http://194.27.128.66/envisyon.SorgulaBelgeDogrulama.aspx?V=BEA0ZEBLK](http://194.27.128.66/envisyon SorgulaBelgeDogrulama.aspx?V=BEA0ZEBLK)

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Gökür SOYDANER, Dabli : 22500
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 60 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SPERM mtDNA 4977 DELESYONU İLE ATP VE SAM DÜZEYLERİNİN SPERM MOTİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 6	% 2	% 8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
3	www.dopplerultrason.com İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Bitlis Eren Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Batman University Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ezgi	Soyadı	Terzi
Doğ. Yeri	Şişli- İstanbul	Doğ. Tar.	26.06.1989
Uyruğu	TC	Tel	534 595 3294
Email	ezgiterzi8991@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Old. Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora		
Yük. Lis.		
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2013
Lise	Kasımpaşa Çok Programlı Lisesi	2006

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Biyoloji Öğretmeni	Beyoğlu Fındıklı Anadolu Sağlık Meslek Lisesi	2015-2016
Biyoloji Öğretmeni	Beyoğlu Güner Akın Anadolu İmam Hatip Lisesi	2015-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Zayıf	Orta		75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf, - olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71,28096	72,55562	72,67281
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Bacerisi
Microsoft Office	Orta

