



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**EPİTELYAL SODYUM KANALLARININ (ENaC)
İNSAN SPERM KAPASİTASYONU VE AKROZOM
REAKSİYONU İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

AYŞE ÇAKIR GÜNDOĞDU

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KASIM 2019



**EPİTELYAL SODYUM KANALLARININ (ENaC) İNSAN SPERM
KAPASİTASYONU VE AKROZOM REAKSİYONU İLE İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KASIM 2019

Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU tarafından hazırlanan “Epitelyal Sodyum Kanallarının (ENAC) İnsan Sperm Kapasitasyonu ve Akrozom Reaksiyonu ile İlişkisinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Başkan : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Doç. Dr. Şevin GÜNEY

Fizyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

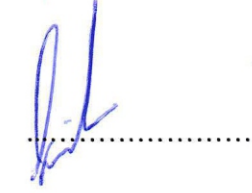
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Doç. Dr. İsmail GÜLER

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Ayten TÜRKKANI

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Doç. Dr. Esra ERDOĞAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 07/11/2019


Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendim ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bilendirir, si bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabul ettiğimi beyan ederim.


Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU
07/11/2019

EPİTELYAL SODYUM KANALLARININ (ENAC) İNSAN SPERM KAPASİTASYONU VE AKROZOM REAKSİYONU İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kasım 2019

ÖZET

Kapasitasyon, spermelerin dişi üreme kanallarında fertilizasyon yeteneği kazandıkları bir süreçtir. Kapasitasyon sırasında iyon geçirgenliği azalmasına bağlı olarak sperm plazma membranı hiperpolarize olur. Epitelyal Na^+ kanalları (ENaC) birçok organın fizyolojisinde önemli role sahip iyon kanallarıdır. Spermelerde de bulunan ENaC'lar kapasitasyon sırasında cAMP bağımlı yollarla inhibe olarak plazma membranının hiperpolarize olmasını sağlarlar. Vücutta enerji homeostazisini düzenleyen 5'-AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), aynı zamanda somatik hücrelerde ve oositlerde plazma membranındaki ENaC- β ekspresyonunu azaltarak Na^+ transportunun düzenlenmesinde görev alan bir kinazdır. Ancak spermelerde AMPK aktivasyonunun ENaC inhibisyonu ile ilişkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada, immunositokimyasal, sperktrofotometrik ve flow sitometrik yöntemler kullanılarak, non-kapasitatif medyum (NCM), AMPK aktivatörü AICAR eklenmiş NCM medyum (NCM-A), kapasitatif medyum (CM) ve AICAR eklenmiş CM medyumlarında (CM-A) inkübe edilmiş insan spermelerindeki fizyolojik ve fonksiyonel değişiklikler incelenmiştir. ELISA yöntemi ile kapasitasyon sırasında hücrelerdeki AMPK aktivitesinin arttığı ve ENaC- β konsantrasyonunun azaldığı; AICAR'ın non-kapasite ve kapasite spermelerde AMPK aktivitesini artırarak ENaC- β proteinin miktarını azalttığı bulunmuştur. Flow sitometrik analizlerle AMPK aktivasyonunun hücre içi Na^+ konsantrasyonunda azalmaya ve hiperpolarizasyonda artışa neden olduğu, bu değişikliklerin kapasitasyonu arttırdığı ancak sperm canlılığına ve akrozom reaksiyonuna etki etmediği belirlenmiştir. Makler sayım kamarası ile yapılan değerlendirmeler, AMPK aktivasyonunun sperm ileri hareketliliğini arttırdığını göstermiştir. İmmunofloresan incelemelerde, ENaC- β 'nin sperm kuyruğunun esas parçasında lokalize olduğu, AMPK aktivasyonu ile membrandaki ENaC- β miktarının azaldığı, spontan akrozom reaksiyonuna giren sperm sayısında ise değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar, insan spermelerinin kapasitasyonu sırasında gerçekleşen AMPK aktivitesindeki artışın, plazma membranının hiperpolarizasyonu için ENaC'ları inhibe ettiğini ve hiperpolarizasyonun kapasitasyon ve ileri hareketlilik artışını indüklediğini göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde ENaC'lar ve AMPK'nın depolarizasyon kaynaklı azalmış in vitro fertilizasyon (IVF) başarısının artırılmasında yeni birer farmakolojik hedef olabilecekleri düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : ENaC, AMPK, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu

Sayfa Adedi : 128

Danışman : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

INVESTIGATION OF EPITHELIAL SODIUM CHANNEL (ENaC) INVOLVEMENT IN HUMAN SPERM CAPACITATION AND ACROSOME REACTION

(Ph. D. Thesis)

Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

November 2019

ABSTRACT

Capacitation is a process that sperm cells gain fertilizing ability in the female reproductive tract. Decrease of ion permeability during capacitation results in a sperm hyperpolarization. Epithelial Na⁺ channels (ENaC) are ion channels that play an important role in the physiology of many organs. ENaCs, which are also present in sperms, are inhibited by cAMP-dependent pathways and lead to hyperpolarization of the plasma membrane. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), which regulates energy homeostasis in the body, is a kinase also involved in regulating Na⁺ transport by reducing ENaC-β expression in the plasma membranes of somatic cells and oocytes. However, the relationship between AMPK activation and ENaC inhibition in sperm cells is not known. In this study, physiological and functional changes in human sperms incubated in non-capacitating medium (NCM), AMPK activator AICAR added NCM medium (NCM-A), capacitating medium (CM) and AICAR added CM medium (CM-A) were examined by using immunocytochemical, spectrophotometric and flow cytometric methods. It was found by ELISA method that the AMPK activity is increased and the concentration of ENaC-β decreased in the cells during capacitation; AICAR reduced the amount of ENaC-β protein by increasing AMPK activity in non-capacitated and capacitated sperms. Flow cytometric analysis revealed that AMPK activation caused a decrease in intracellular Na⁺ concentration and an increase in hyperpolarization; these changes increased capacitation but did not affect sperm viability and acrosome reaction. Evaluations with Makler counting chamber showed that AMPK activation increased sperm progressive motility. Immunofluorescence studies indicated that ENaC-β was localized in the principal piece of the flagellum and the amount of ENaC-β on the membrane decreased and the number of sperms undergoing spontaneous acrosome reaction did not change with AMPK activation. These results indicate that the increases in AMPK activity occurring during capacitation of human sperm inhibit ENaCs to produce hyperpolarization of the plasma membrane and that the hyperpolarization induces the increases in capacitation and progressive motility. It is suggested that due to these properties, ENaCs and AMPK may be new pharmacological targets to improve in vitro fertilization (IVF) success which is decreased due to depolarization.

Science Code : 1033

Key Words : ENaC, AMPK, capacitation, acrosome reaction

Page Number : 128

Advisor : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim ve tez çalışmalarım süresince gerek bilgisi ve deneyimi gerekse manevi desteği ile her zaman yanımda olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na ve eğitimime olan önemli katkıları ve hayata dair bana öğrettiklerinden dolayı Anabilim Dalımızın saygıdeğer hocaları Prof. Dr. Çigdem ELMAS'a ve Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Doktora tezimin tamamlanmasında büyük katkıları bulunan, kendisini tanımaktan ve birlikte çalışmaktan son derece mutlu olduğum Sağlık Bilimleri Üniversitesi'nde görev yapan Sema ÖREN'e teşekkür ediyorum. İş ortamının aile ortamına dönüşmesini sağlayan, en güzel ve en zor zamanları birlikte paylaştığım, aynı zamanda bilimsel donanımına büyük saygı duyduğum, çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen sevgili dostum, değerli bilim insanı Dr. Cemile Merve SEYMEN'e teşekkür ediyorum.

Eğitim hayatım boyunca yaşamın yükünü omuzlarımdan alan, başarılarımı kendi isteklerinin önünde tutan, özverisi, sabrı ve hoşgörüsüyle her koşulda en büyük destekçim, sevgili eşim Güven Çağdaş GÜNDOĞDU'ya sonsuz minnetlerimi sunuyorum. Son olarak, kendisiyle geçirebileceğim zamandan çalarak hazırlamak zorunda kaldığım bu Doktora tezimi, en karanlık dönemimde hayatıma girerek güneşim olan, bitmeyen coşkusuyla enerjimi her daim yüksek ve sevgisiyle beni ayakta tutan, başarmayı en çok onun gelecekteki başarılarına destek olmak için istediğim, minik oğlum Sarp GÜNDOĞDU'ya ithaf ediyorum.

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 01/2019-06).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Primordiyal Germ Hücrelerinin Göçü ve Testis Gelişimi.....	5
2.2. Testislerin Yapısı	6
2.2.1. Sertoli hücreleri	7
2.2.2. Spermatogenik hücreler ve spermatogenez.....	8
2.2.3. Seminifer epitel siklusu.....	12
2.3. Olgun Spermin Yapısı.....	13
2.3.1. Sperm başı.....	14
2.3.2. Sperm kuyruğu	15
2.4. Spermlerin Taşınması.....	17
2.5. Kapasitasyon	18
2.5.1. cAMP'ye bağlı fosforilasyon yolaklarının uyarılması.....	19
2.5.2. Plazma membranının yeniden düzenlenmesi	20
2.5.3. Plazma membranının hiperpolarizasyonu	22
2.5.4. İyon geçirgenliğinin düzenlenmesi	24
2.6. Epitelyal Sodyum Kanalları (ENaC).....	28

	Sayfa
2.6.1. ENaC aktivitesinin düzenlenmesi	30
2.6.2. ENaC trafiği	32
2.6.3. ENaC aktivitesinin düzenlenmesinde görev yapan kinazlar	33
2.6.4. Erkek fertilitesinde ENaC'ların rolü	38
2.7. AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz (AMPK)	39
2.7.1. Erkek fertilitesinde AMPK'nın rolü	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Deneyde Kullanılan Medyumlar	45
3.2. Semen Örneklerinin Toplanması.....	45
3.3. Spermilerin Saflaştırılması	46
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması	46
3.5. Sperm Motilitesinin Değerlendirilmesi.....	46
3.6. ELISA Yöntemi ile AMPK Aktivitesi ve ENaC-β Miktarının Belirlenmesi.....	47
3.7. Flow Sitometri Yöntemi ile Sperm Analizi	47
3.7.1. Sperm canlılığının ve hücre içi sodyum miktarının ölçülmesi	47
3.7.2. Plazma membran potansiyelinin ölçülmesi.....	48
3.7.3. Kapasitasyonun ölçülmesi.....	48
3.7.4. Akrozom reaksiyonunun ölçülmesi	49
3.8. İmmunofloresan Yöntemi ile ENaC-β ve CD46 Ekspresyonunun Belirlenmesi	49
3.9. İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR	51
4.1. ELISA Bulguları	51
4.1.1. AMPK aktivitesi bulguları	51
4.1.2. ENaC-β miktarı bulguları.....	52
4.2. Motilite Bulguları.....	53

	Sayfa
4.3. Flow Sitometri Bulguları.....	54
4.3.1. Sperm canlılığı bulguları.....	54
4.3.2. Hücre içi Na ⁺ konsantrasyonu bulguları	55
4.3.3. Plazma membran potansiyeli bulguları	58
4.3.4. Kapasitasyon bulguları.....	61
4.3.5. Akrozom reaksiyonu bulguları.....	64
4.4. İmmunofloresan bulguları	67
4.4.1. Normal morfoloji gösteren spermeler.....	67
4.4.2. Anomali gösteren spermeler	78
5. TARTIŞMA.....	89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	101
KAYNAKLAR	103
EKLER.....	123
EK-1. Etik Kurul Onayı	124
ÖZGEÇMİŞ.....	127

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. p-AMPK α -1/2 konsantrasyonlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	51
Çizelge 4.2. ENaC- β konsantrasyonlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	52
Çizelge 4.3. İleri hareketli sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler....	53
Çizelge 4.4. Sperm canlılığına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	54
Çizelge 4.5. CoroNa yeşil floresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	57
Çizelge 4.6. DISC3(5) floresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	60
Çizelge 4.7. PY20 floresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	63
Çizelge 4.8. CD46 floresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	66
Çizelge 4.9. ENaC- β immunofloresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler	77
Çizelge 4.10. Akrozom reaksiyonu geçirmiş sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler.....	77
Çizelge 4.11. Tüm deneylere ilişkin ortalama değerler	87

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Olgun sperm yapısı.....	13
Şekil 2.2. Sperm başı ve perinükleer tekanın yapısı.....	15
Şekil 2.3. İnsan sperm kapasitasyonunda görev alan iyon kanalları ve bunları düzenleyen sinyal yolları	28
Şekil 2.4. Erkek gonadlarda ve olgun sperm üretiminde AMPK'nın işlevleri.....	43
Şekil 4.1. Deney grupları arasında AMPK aktivitesinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.2. Deney grupları arasında ENaC-β konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.3. Deney grupları arasında ileri hareketli sperm yüzdelerinin karşılaştırılması .	54
Şekil 4.4. Deney grupları arasında sperm canlılık oranlarının karşılaştırılması	55
Şekil 4.5. CoroNa yeşil boyamaya ait örnek flow sitometri analizleri	56
Şekil 4.6. CoroNa yeşil floresan yoğunluklarını gösteren birleştirilmiş histogramlar.....	57
Şekil 4.7. Deney grupları arasında CoroNa yeşil floresan yoğunluklarının karşılaştırılması	58
Şekil 4.8. DISC3(5) boyamaya ait örnek flow sitometri analizleri.....	59
Şekil 4.9. DISC3(5) floresan yoğunluklarını gösteren birleştirilmiş histogramlar.....	60
Şekil 4.10. Deney grupları arasında DISC ₃ (5) floresan yoğunluklarının karşılaştırılması	61
Şekil 4.11. PY20 ile işaretlemeye ait örnek flow sitometri analizleri	62
Şekil 4.12. PY20 floresan yoğunluklarını gösteren birleştirilmiş histogramlar.....	63
Şekil 4.13. Deney grupları arasında PY20 floresan yoğunluklarının karşılaştırılması...	64
Şekil 4.14. CD46 ile işaretlemeye ait örnek flow sitometri analizleri.....	65
Şekil 4.15. CD46 floresan yoğunluklarını gösteren birleştirilmiş histogramlar	66
Şekil 4.16. Deney grupları arasında CD46 floresan yoğunluklarının karşılaştırılması	67

Şekil	Sayfa
Şekil 4.17. Deney grupları arasında ENaC- β immunofloresan yoğunluklarının karşılaştırılması	77
Şekil 4.18. Deney grupları arasında akrozom reaksiyonu geçirmiş sperm yüzdelerinin karşılaştırılması	78



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. NCM grubuna ait immünofloresan incelemeler	69
Resim 4.2. NCM grubuna ait immünofloresan incelemeler	70
Resim 4.3. NCM-A grubuna ait immünofloresan incelemeler	71
Resim 4.4. NCM-A grubuna ait immünofloresan incelemeler	72
Resim 4.5. CM grubuna ait immünofloresan incelemeler	73
Resim 4.6. CM grubuna ait immünofloresan incelemeler	74
Resim 4.7. CM-A grubuna ait immünofloresan incelemeler	75
Resim 4.8. CM-A grubuna ait immünofloresan incelemeler	76
Resim 4.9. Baş anomalisine sahip spermilere ait immunofloresan incelemeler	79
Resim 4.10. Baş anomalisine sahip spermilere ait immunofloresan incelemeler	80
Resim 4.11. Boyun anomalisine sahip spermilere ait immunofloresan incelemeler	81
Resim 4.12. Orta parça anomalisine sahip spermilere ait immunofloresan incelemeler	82
Resim 4.13. Kuyruk anomalisine sahip spermilere ait immunofloresan incelemeler	83
Resim 4.14. Kuyruk anomalisine sahip spermilere ait immunofloresan incelemeler	84
Resim 4.15. Kuyruk anomalisine sahip spermilere ait immunofloresan incelemeler	85
Resim 4.16. Kuyruk anomalisine sahip spermilere ait immunofloresan incelemeler	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
Ba^{+2}	Baryum
Ca^{+2}	Kalsiyum
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
Cl^-	Klor
cm	Santimetre
dk	Dakika
HCO_3^-	Bikarbonat
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit
K^+	Potasyum
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Monopotasyum fosfat
mg	Miligram
Mg^{+2}	Magnezyum
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum sülfat heptahidrat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
Na^+	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
ng	Nanogram

nM	Nanomolar
PO₃⁻⁴	Fosfat
Zn⁺²	Çinko

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside
AMPK	5'-AMP ile aktive olan protein kinaz
APC	Allophycocyanin (Allofitosiyenin)
ASDN	Aldosterone sensitive distal nephron (Aldosterona duyarlı distal nefron)
BSA	Bovine serum albumin
BWW	Biggers–WhittenWhittingham
CA	Carbonic anhydrase (Karbonik anhidraz)
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate (Siklik adenozin monofosfat)
CDKI	Cyclin dependent kinase inhibitor (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü)
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (Kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici)
CK	Casein kinase (Kazein kinaz)
CM	Capacitating medium (Kapasitatif medyum)
CM-A	Capacitating medium-AICAR (Kapasitatif medyum-AICAR)
DER	Düz endoplazmik retikulum
DISC₃(5)	3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine iodide (3,3'-Dipropiltiadikarbosiyanin iyodid)
EGF	Epidermal growth factor (Epidermal büyüme faktörü)
EIPA	Etil-izopropil amilorid

ENaC	Epithelial sodium (Na ⁺) channel (Epitelyal sodyum (Na ⁺) kanalı)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Floresan izotiyosiyanat)
IGF1	Insulin like growth factor 1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü 1)
IVF	In vitro fertilizasyon
K/FL	Kolesterol/fosfolipid
MAPK	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
NCM	Non-capacitating medium (Non-kapasitatif medyum)
NCM-A	Non-capacitating medium-AICAR (Non-kapasitatif medyum-AICAR)
NHE	Na ⁺ /H ⁺ exchanger (Na ⁺ /H ⁺ değiştiricileri)
OD	Optik dansite
PAS	Periyodik asit-Shiff
PBS	Phosphate buffered saline (Fosfat buffer salin)
PE	Phycoerythrin (Fikoeritrin)
PGH	Primordiyal germ hücresi
PI	Propidyum iyodür
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (Fosfoinositid-3-kinaz)
PKA	Protein kinaz A
PT	Perinükleer teka
SS	Standart sapma
SGK	Serum glukokortikoid kinaz
TORC2	Target of rapamycin complex 2 (Rapamisin sinyal kompleksi 2)
ZP	Zona pellusida

1. GİRİŞ

Spermiler ejaküle olduklarında henüz oositi fertilize etme yeteneğine sahip değildirler. Fertilizasyon yetkinliğine ulaşmak için kapasitasyona uğramaları gerekir. Spermilerin dişi üreme yollarından geçişleri sırasında gerçekleşen bu olgunlaşma süreci plazma membranından kolesterolün uzaklaştırılması, iyon geçirgenliğinin düzenlenmesi, plazma membranının hiperpolarizasyonu ve cAMP-bağımlı fosforilasyon yollarının uyarılması gibi fizyolojik değişiklikleri içerir [1]. Bu olaylar, sperm motilitesinin hiperaktivasyonunu ve akrozom reaksiyonu geçirmesini sağlar [2].

Kapasitasyon, sperm ve dişi üreme sistemi arasında yakın bir etkileşimin varlığına bağlıdır. Günümüzde plazma membranından iyon aktarımının sperm sinyalleşmesinde önemli bir adım olduğu ve sperm ile dişi üreme sistemi arasında bilgi transferini düzenlediği kabul edilmektedir. Sperm plazma membranı, sitoplazmada Ca^{+2} , K^{+} ve H^{+} iyonlarının değişikliklerini başlatan spesifik iyon kanalları ve taşıyıcılarını içerir [3]. Spermelerde ayrıca voltaj kapılı Na^{+} kanallarının [4] ve epitelyal Na^{+} kanallarının [5] bulunduğu rapor edilmiş ancak Na^{+} akışının sperm fonksiyonlarının düzenlenmesindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.

Epitelyal sodyum kanalları (ENaC'lar), yüksek dirençli epitel boyunca Na^{+} iyonlarının akışını düzenleyerek vücudun tuz ve su homeostazının korunmasını sağlayan iyon kanallarıdır [6]. α , β , γ ve δ alt birimlerinden oluşan ENaC'lar, böbrekteki nefronların distalindeki tübül ve kanallarda, mesanede, akciğer hava yollarında, distal kolonda ve ter bezlerinin ve tükürük bezlerinin kanallarında bulunan epitelyal hücrelerin plazma membranlarında eksprese edilirler [7]. Bu kanallar, Na^{+} -seçicidir, amiloride duyarlıdır ve Na^{+} 'nın denge potansiyeline doğru yer değiştirmesini sağlayarak hücrelerde istirahat halindeki membran potansiyelinin korunmasına katkıda bulunurlar [16].

Fare spermelerinde ENaC α ve δ alt birimlerinin eksprese olduğu gösterilmiştir. Kapasite olmamış fare spermeleri amiloride etkin bırakıldığında, hücre içi Na^{+} konsantrasyonunun azaldığı gözlenmiştir [5]. Bu sonuçlar, ENaC inhibisyonunun kapasitasyon ile ilişkili hiperpolarizasyona aracılık ediyor olabileceğini işaret etmiştir. Rat spermelerinde ENaC- α 'nın akrozomda ve kuyruğun esas parçasında lokalize olduğu gözlenmiştir [8]. Bu

lokalizasyonlar, ENaC'ların akrozom reaksiyonu ve sperm motilitesinde olası bir rol oynayabileceğini göstermektedir. İnsan spermalarında kuyruğun orta parçasında ENaC- α proteininin eksprese edildiği ve ENaC inhibitörü etil-izopropil amiloridin (EIPA) sperm motilitesini arttırdığı gösterilmiştir [9]. Bir diğer inhibitör olan amiloridin insan sperm kapasitasyonu sırasında plazma membran potansiyelini düzenlediği bildirilmiştir [10].

ENaC aracılı Na^+ transportunun azaltılması için ENaC'ların kapatılarak inaktive edilmesi ya da aktif kanalların plazma membranından uzaklaştırılması gerekir [17]. Kanal açıklığındaki değişiklikler, hücre yüzeyindeki kanal yoğunluğunda bir değişiklik olmadan Na^+ transportunun azalmasına neden olur. Membrandaki ENaC miktarı ise, kanalların klatrin aracılı endositozla membrandan alınmasıyla azaltılır [25].

ENaC aktivitesi PKA, PKC, SGK, PI3K ve MAPK-ERK gibi çeşitli kinazlar tarafından kontrol edilir. Kinazlar, kanal alt birimlerini direkt olarak fosforile edebildiği gibi epitelyal membrandaki ENaC protein alt birimlerinin miktarını düzenleyen ubiquitin ligaz Nedd4-2'yi de fosforile edebilirler [11]. Bu ligaz, ENaC alt birimlerine direkt olarak bağlanarak ENaC ubiquitinasyonunu ve devamında kanalların plazma membranından internalizasyonunu ve hücre içinde degradasyonunu sağlar. Böylece membrandaki kanal miktarının azalmasına neden olur [7].

5'-AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), hem hücresel hem sistemik düzeyde enerji homeostazının korunmasını sağlayan bir kinazdır. Enerji sensörü olmasının yanı sıra apoptoz, hücre gelişimi, gen transkripsiyonu ve protein sentezinde de görev alır [12]. Domuz, fare ve insanlarda yapılan çalışmalarda AMPK'nın germ hücrelerinde de bulunduğu, spermelerde özellikle akrozomal bölgede olmak üzere baş ve kuyruk orta parçasında lokalize olduğu gösterilmiştir [13]. Spermdeki bu dağılım profili, AMPK'nın hücrenin enerji düzeyine bağlı olan motilite ve akrozom reaksiyonunda görev alıyor olabileceğini göstermiştir. AMPK aktivasyonunun, sperm bu fonksiyonlarını desteklediği, aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyeli, sperm plazma membran akışkanlığı ve akrozomal membran bütünlüğünün düzenlenmesinde görev aldığı belirlenmiştir [14].

AMPK α -negatif farelerin böbrek, akciğer ve kolonlarında ENaC- β ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir [15]. Farmakolojik ajanlarla AMPK aktivasyonunun akciğer ve böbrek

epitelyal hücrelerinde ve oositlerde, plazma membranından ENaC alt birimlerinin uzaklaştırılmasını sağlayarak Na⁺ transportunu azalttığı gösterilmiştir [16, 17]. Bu bulgular, AMPK'nın, ENaC aracılı Na⁺ absorpsiyonunun önemli bir fizyolojik regülatörü olduğunu ve hücrelerdeki Na⁺ transportunun kontrolü için yeni bir farmakolojik hedef olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, AMPK aktivasyonuna bağlı ENaC inhibisyonu ve bu inhibisyonun sperm fonksiyonları ile ilişkisi araştırılmıştır. AMPK aktivatörü 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside'nin (AICAR) ENaC-β konsantrasyonuna ve sperm canlılığı, ileri hareketliliği, hücre içi Na⁺ miktarı, plazma membran potansiyeli, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonuna olan etkileri immunositokimyasal, spektrofotometrik ve flow sitometrik analizlerle incelenmiştir. Elde edilen bulgular, literatür verileriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Primordiyal Germ Hücrelerinin Göçü ve Testis Gelişimi

Gametler, gelişimin ikinci haftası boyunca epiblastın içinde oluşan primordiyal germ hücrelerinden (PGH) köken alırlar. PGH'ler primitif çizgi boyunca göç ederek üçüncü haftada vitellüs kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. Dördüncü hafta boyunca ameboid hareketlerle vitellüs kesesinden son bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ilerleyerek, beşinci haftanın başında gelişmekte olan gonadlara ulaşırlar. Göç sırasında başlayan mitotik bölünmeler PGH'lerin sayıca artmasına neden olur. Mitoz bölünme, gonadlara ulaştıktan sonra da devam eder ve PGH'ler altıncı haftada genital sırtları işgal ederler [18].

PGH'lerin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce genital sırttaki epitelyal hücreler mitozla bölünmeye başlar. Bölünme, PGH işgalinden sonra da devam eder. Sayıları artan epitelyal hücreler altlarındaki mezenşimin içine gömülerek burada primitif cinsiyet kordonları adı verilen düzensiz kordonlar oluştururlar. Y kromozomu üzerinde bulunan ve testis belirleyici faktörü kodlayan SRY geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam ederek medullanın derinliklerine doğru ilerler ve burada testis kordonlarını meydana getirirler. Testis kordonları daha sonra küçük hücre sıraları halinde bir ağ oluşturacak şekilde bezin hilusuna doğru dağılırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde, testis kordonları tunika albuginea adı verilen yoğun fibröz bir bağ dokusu tabakası ile çevrelenerek yüzey epitelden ayrılırlar [18, 19].

Gelişimin dördüncü ayında, testis kordonları mediastinumdaki açık uçları rete testise bağlanan at nalı şeklinde halkalar oluşturur. Testis kordonları bu dönemde artık PGH'ler ve bezin yüzey epitelden gelişmiş olan Sertoli hücrelerinden meydana gelirler. Testis kordonlarının arasında, gonadal sırtın mezenşiminden köken alan ve kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlamış olan intersitisiyel Leydig hücreleri bulunur. Leydig hücreleri, gestasyonun sekizinci haftasında testosteron üretmeye başlar ve testosteron, ana genital kanalları oluşturacak olan mezonefrik kanalların büyümesini ve farklılaşmasını sağlar [19-21].

Testis kordonları puberteye kadar solid halde kalırlar. Puberteden hemen sonra, kordonların lümenleri açılarak seminifer tübüllere dönüşürler. Seminifer tübüller daha sonra rete testis tübülleri ile birleşir ve duktuli eferenteslere girerler. Duktuli eferentesler, rete testis ile mezonefrik kanalları birbirine bağlarlar. Mezonefrik kanallar duktuli eferenteslerin giriş yerinin hemen altından itibaren uzayıp, kıvrıntılı bir hal alarak duktus epididimisi meydana getirirler. Duktus epididimisin kuyruğundan seminal vezikül tomurcuğuna kadar ise kalın bir kas kılıfı ile çevrelenerek duktus deferens oluştururlar. Duktus deferensin seminal vezikülden sonraki parçasına ejakülatuar kanal adı verilir [19].

2.2. Testislerin Yapısı

Testisler, oldukça kalın sıkı bağ dokusu yapısındaki bir kapsül olan tunika albuginea ile çevrilidir. Kapsülün iç kısmında kan damarları içeren gevşek bağ dokusundan oluşan tunika vasküloza yer alır. Testisin posterior yüzeyi boyunca tunika albuginea kalınlaşır ve içeriye doğru mediastinum testis olarak uzanır. Mediastinum, kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanallarının testise girip çıktığı yerdir [19, 22].

Kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar, her bir testisi yaklaşık 250 lobüle böler. Her bir lobül, 1-4 adet seminifer tübülden ve Leydig hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stromadan oluşur. Seminifer tübüller, yaklaşık 50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadırlar. Tübülün bazal laminasının dışında, fibroblast içermeyen, 3-5 tabaka miyoid hücreden ve kollajen fibrillerden oluşan özel bir bağ dokusu yapısındaki tunika (lamina) propria yer alır.

Seminifer tübülün epiteli, Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere iki farklı hücre grubu içeren çok katlı bir epitelidir [19, 22]. PGH'lerden köken alan spermatogenik hücreler düzenli olarak çoğalırlar ve fertilizasyona hazırlanabilmek için spermatogenez sürecine girerler. Spermatogenez sırasındaki mayoz bölünmeler ile bu hücrelerin kromozom sayısı azalır ve sitodiferansiyasyon ile hücreler olgun spermelere farklılaşırlar. Sertoli hücreleri ise spermatogenik hücreleri çevreleyerek onlara destek olur ve beslenmelerini sağlar [18, 19].

2.2.1. Sertoli hücreleri

Destek hücreleri ya da sustentakuler hücreler olarak da bilinen Sertoli hücreleri, spermatogenik hücreleri çevreleyen ve aralarındaki boşlukları dolduran, yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücreleri, bazal lamina üzerinde yerleşmişlerdir ve seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca uzanarak tübüllere yapısal düzen verirler. Puberteden önce mitoz bölünme ile sayılarını arttıran bu hücreler, puberteden sonra çoğalmazlar [19, 21].

Germ hücreleri gelişmeleri sırasında yeterli miktarda enerji substratı almak zorundadırlar, aksi takdirde dejenere olarak apoptotik yolağa girerler. Bu hücreler adenozin trifosfat (ATP) üretimi için substrat olarak laktat kullanırlar [23]. Sertoli hücreleri, glukoz gibi çeşitli substratları metabolize ederek laktat üretirler. Böylece germ hücrelerine enerji desteği sağlarlar. Bunun yanında, amino asitler, karbonhidratlar, lipidler ve vitaminler gibi besinleri veya metabolik ara maddeleri de salgılayarak germ hücrelerinin beslenmesini sağlarlar. Sertoli hücreleri ayrıca spermiyogenezin son evresinde oluşan rezidüel cisimcikleri ve farklılaşmayı başaramayan spermatogenik hücreleri fagosite ederler [24], aktin-aracılı kasılmalar yardımıyla olgun spermatidlerin seminifer tübül lümenine salınmasını kolaylaştırırlar ve seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgırlar [22].

Sertoli hücreleri, Sertoli-Sertoli bağlantı kompleksleri ile birbirlerine bağlanmışlardır. Bu kompleks, komşu membranlardaki 50'den fazla paralel kaynaşma çizgisi içeren zonula okludens ile karakterizedir. Her hücrenin bağlantı bölgesinde, plazma membranına paralel uzanan yassılaştırmış bir düz endoplazmik retikulum (DER) sisternası bulunur. DER sisternaları ile plazma membranı arasında hegzogonal olarak paketlenmiş aktin filamentleri demetleri yer alır [19].

Sertoli-Sertoli bağlantıları, seminifer epiteli bazal epitelyal kompartman ve luminal kompartman olmak üzere iki bölüme ayırır. Spermatogonyumlar ve primer spermatositler, bağlantılar ile bazal lamina arasında yer alan bazal kompartmanda bulunur. Daha olgun spermatositler ve spermatidler, luminal kompartmanda yer alır. B tipi spermatogonyumların mitoz bölünmesiyle üretilen erken spermatositler bağlantı kompleksinden geçerek bazal kompartmandan luminal kompartmana hareket ederler. Bu

hareket, yeni oluşan spermatositin altında, Sertoli hücrelerinin uzantıları arasında yeni bir bağlantı kompleksinin oluşmasıyla ve bunu takiben spermatositin üzerinde yer alan bağlantının yıkılmasıyla gerçekleşir. Böylece spermatogenik hücrelerin farklılaşmasında mayoz bölünme süreci ve spermiyogenez luminal kompartmanda gerçekleşir [19, 22].

Sertoli-Sertoli bağlantı kompleksleri, fiziksel kompartmanlaşmaya ek olarak, vücuttaki en sıkı kan-doku bariyerlerinden biri olan ve kan-testis bariyeri adı verilen bir geçirgenlik bariyerini de oluştururlar. Bu bariyer, seminifer epitelde iyon, amino asit, karbonhidrat ve protein içeriği bakımından fizyolojik bir kompartmanlaşma meydana getirir. Bariyer dolaşımdaki antikorları seminifer tübül lümeni dışında tutarak genetik olarak farklı olan haploid germ hücrelerini (sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiler) vücudun immün savunmasından izole eder. Böyle bir düzenleme, oldukça antijenik olan sperm yüzeyinin, sperm olgunlaşması, taşınması ve fertilizasyon sırasında işlevlerini engelleyebilecek antikorlarla kaplanmasını önler [19, 21].

2.2.2. Spermatogenik hücreler ve spermatogenez

Erkek germ hücrelerinin olgunlaşma süreci pubertede başlar ve yaşam boyunca devam eder. Öncül hücreler olan spermatogonyumlar, fetal hayatta testisin seminifer tübüllerinde inaktif olarak bulunurlar. Puberteden itibaren mitoz ve mayoz bölünmeler geçirmeye ve farklılaşmaya başlarlar. Spermatogonyumların olgun sperme dönüşmesi sırasında meydana gelen bu karmaşık olaylar dizisine spermatogenez adı verilir. Spermatogenez spermatogonyal evre, spermatosit evresi ve spermatid evresi olmak üzere üç evreden oluşur [19, 21].

Spermatogonyal evre

Spermatogonyumlar Sertoli hücreleri arasındaki tıkalı bağlantıların altında yer aldıkları için kan-testis bariyerinin dışında bulunan ve bazal lamina ile direkt olarak ilişkide olan diploid ($2n$) spermatogenik hücrelerdir. Spermatogonyumlar spermatogenik kök hücrelerden köken alırlar. Puberteden itibaren bu hücreler çok sayıda mitoz bölünme geçirerek rutin hematoksilen eozin preparatlarında farklı çekirdek görünümüne sahip olan spermatogonyal hücre soylarını meydana getirirler. Çekirdek özelliklerine göre 3 tip spermatogonyum tanımlanmıştır [18, 19]:

Tip A koyu spermatogonyumlar

Seminifer tübül epitelinin, diğer spermatogenik hücreleri oluşturan kök hücreleridir. İnce granüllü kromatine sahip, yoğun bazofilik boyanan, oval çekirdekli hücrelerdir. Bu hücreler mitoz bölünmeye uğrayarak yine tip A koyu spermatogonyumları, ya da Tip A açık spermatogonyumları meydana getirirler [18, 19].

Tip A açık spermatogonyumlar

İnce granüllü kromatinli, açık renk boyanan oval çekirdekleri ile Tip A koyu spermatogonyumlardan ayrılırlar. Bu hücreler de mitotik bölünmelerle sayılarını arttırlar ve birkaç bölünmeden sonra Tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar [18, 19].

Tip B spermatogonyumlar

Kromatini ekirdek kılıfı boyunca ve merkezdeki çekirdekçiğin çevresinde geniş kümeler oluşturacak şekilde yoğunlaşmış olan yuvarlak çekirdekli hücrelerdir. Tip B spermatogonyumların görülmesi, spermatogonyal evrenin son olaylarını temsil eder. Bu hücreler, primer spermatositlere farklılaşacak olan adanmış spermatogonyum popülasyonunu oluştururlar [18, 19].

Tip A koyu spermatogonyumların mitozla bölünmesiyle oluşan yavru hücreler ve sonraki hücreler birbirlerinden tam olarak ayrılmazlar. Sitokinezis henüz tamamlanmamış olduğundan ardışık hücre jenerasyonları birbirlerine ince sitoplazmik köprülerle bağlı kalırlar. Dolayısıyla germ hücreleri gelişimlerinin büyük bir kısmında bir sinsityum şeklinde bulunurlar ve sitoplazmik köprülerin oluşturduğu bağlantılar, hücre gelişiminin senkronize bir şekilde ilerlemesini sağlar. Sitoplazmik köprüler ışık mikroskobunda görülmez ancak elektron mikroskobunda gözlenebilirler. Spermatidler olgun spermelere dnştiklerinde bağlantılar ortadan kalkar ve hücreler birbirlerinden ayrılırlar [18, 19].

Spermatosit evresi (mayoz)

Tip B spermatogonyumların mitoz bölünme geçirerek çoğalması ile primer spermatositler oluşur. Primer spermatositler birinci mayoz bölünme (indirgenme bölünmesi) başlamadan

önce DNA'larını replike ederler $4n$ kromozoma ve $4d$ DNA miktarına sahip olurlar. Primer spermatozoidlerde birinci mayoz bölünmenin profaz evresi yaklaşık 22 gün sürer. Bu evrede kromatinler yoğunlaşarak kromozomları oluştururlar. Profazın sonunda her biri iki kromatin ipliğine (kromatid) sahip 46 kromozom fark edilebilir. Bu şekilde gözlenen çekirdekleri ve seminifer tübül içindeki en geniş sitoplazmaya sahip germ hücreleri olmaları sayesinde primer spermatozoidler ışık mikroskopunda kolayca tanınabilirler [19, 22].

Birinci mayoz bölünmenin sonunda, kromozom sayısı ve DNA miktarı yarıya iner (sırasıyla $2n$ ve $2d$). Böylece primer spermatozoidin yarısı büyüklüğündeki iki adet sekonder spermatozoid oluşur. Sekonder spermatozoidler çok hızlı bir şekilde, interfaz evresi ve belirgin bir DNA sentezi olmayan (sadece DNA tamiri meydana gelir) ikinci mayoz bölünmeye (eşitlenme bölünmesi) giderler. Bu bölünme ile meydana gelen iki adet spermatid, 23 haploid kromozoma ($1n$) ve tek bir kromatide ($1d$) sahiptir. Spermatidler, sekonder spermatozoidlerin yarısı büyüklüğündedir [19, 22].

İkinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde homolog kromozomlar metafaz hattında dizilerek birbirleriyle eşleşirler. Homolog kromozom çiftleri arasında, crossing-over denilen ve genetik çeşitliliği sağlayan genetik materyal değişimi gerçekleşir. Bu sayede, her bir sekonder spermatozoidten oluşan 4 spermatid genetik olarak birbirinden farklı olur. Crossing-over'ın tamamlanmasının ardından homolog kromozom çiftleri birbirinden ayrılır ve maternal ya da paternal kaynaklı olmalarına bakılmaksızın rasgele bir şekilde mitoz mekiğinin zıt kutuplarına doğru hareket ederler. Bu rasgele ayrılma da spermin genetik çeşitliliğine katkı sağlar [19, 22].

Birinci mayoz bölünme uzun bir süreç (günlerce sürer) olduğundan ve ikinci mayoz bölünme çok kısa (dakikalarca sürer) sürdüğünden, primer spermatozoidler seminifer tübüllerde en bol, sekonder spermatozoidler ise en az gözlenen hücrelerdir [19, 22].

Spermatid evresi (spermiyogenez)

İkinci mayoz bölünme sonucunda oluşan haploid spermatidler, seminifer tübülün adluminal kompartmanında yerleşmişlerdir ve Sertoli hücrelerinin sitoplazmik uzantıları arasında gömülmüşlerdir. Bu hücreler daha fazla bölünmezler. Farklılaşma sürecine geçirecek

dört adet haploid olgun sperm meydana getirirler. Spermatidlerin spermelere dönüşmesiyle sonuçlanan değişimlerin tümüne spermiyogenez adı verilir. Bu yeniden şekillenme, spermatogenezin son aşamasıdır. Spermiyogenez, dört ardışık evreden oluşur [19, 22]:

Golgi evresi

Bu evrede, spermatid sitoplazmasında yer alan çok sayıdaki Golgi kompleksi, kümelenmiş haldeki periyodik asit-Shiff (PAS) pozitif granüller ile ayırt edilir. Glikoproteinden zengin bu proakrozomal granüller birleşerek, çekirdek zarına komşu, membranla çevrili bir vezikül olan akrozomal vezikülü oluştururlar. Zamanla genişleyen ve içeriği artan akrozomal vezikül, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Bu evrede aynı zamanda çekirdek yakınında yerleşmiş olan sentriyoller de spermatidin arka kutbuna yani akrozomal vezikülün zıt kutbuna göç ederler. Burada olgun sentriyol plazma membranına dik açı ile hizalanır ve sperm kuyruğundaki aksonem yapısını oluşturacak olan mikrotübül bileşenlerinin bir araya gelmesini başlatır [19, 22].

Kep evresi

Bu evrede akrozomal vezikül, çekirdeğin ön yarısının üzerinde yayılarak akrozomal kepi oluşturur. Akrozomal kepin altında yer alan çekirdek zarı bölgesi porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Aynı zamanda somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirir, nükleozomlar kaybolur ve kromatin lifler yan yana dizilir. Bu olaylar sonucunda çekirdek içeriğinde yoğunlaşma meydana gelir ve böylece sperm genomik DNA'sı stabilize edilerek korunur [19, 22].

Akrozomal evre

Bu evrede spermatid kendini yeniden hizalar. Baş, Sertoli hücrelerinin içerisine iyice gömülerek bazal laminaya doğru yönelirken, gelişmekte olan kuyruk seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Çekirdek yassılaşır, uzar ve kendisini çevreleyen akrozom ile birlikte plazma membranının ön kısmına doğru taşınır. Bu sırada sitoplazma posteriora doğru yer değiştirir. Sitoplazmadaki mikrotübüller, manşeti oluşturmak için yeniden hizalanırlar. Manşet, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanan silindirik bir kılıftır [19, 22].

Sentriyoller çekirdeğin arka bölgesine taşınır. Olgun olmayan sentriyol çekirdek yüzeyindeki sığ bir oluğa tutunur. Sentriyoller dokuz kalın fibril oluşturur ve bunlar aksonemin mikrotübüllerinin periferinde yer alan dış yoğun fiberler olarak kuyruğun içine doğru uzanırlar. Dış yoğun fiberler çekirdeği kuyruk ile birleştirdikleri için bu bölgeye bağlantı parçası (boyun) adı verilir [19, 22].

Plazma membranı, uzamakta olan kuyruğu çevrelemek üzere posteriora doğru hareket eder. Bu sırada manşet kaybolur. Mitokondriyonlar sitoplazmadan göç ederek boyun bölgesindeki yoğun fiberlerin etrafında ve boyun bölgesinin posterior uzantısında sarmal bir kılıf oluştururlar. Bu bölge, spermin kuyruğunun orta parçasıdır. Orta parçanın distalinde, esas parçanın dokuz fiberini saran ve kuyruğun ucuna doğru uzanan fibröz kılıf, uzunlamasına iki sütundan ve çok sayıda bağlantı kuşağından oluşur. Fibröz kılıfın distalinde kalan kısa kuyruk segmentine son parça adı verilir [19, 22].

Olgunlaşma Evresi: Spermatidin yeniden şekillenmesinin bu son evresinde kuyruğun etrafındaki fazla sitoplazma azaltılır ve olgun sperm oluşur. Rezidüel cisimcik denilen bu fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Gelişmekte olan gametleri karakterize eden interselüler köprüler de rezidüel cisimlerde kaldığından spermatidler artık birbirlerine bağlı değildirler [19, 22].

Spermatogenezin olgunlaşma evresinin sonuna doğru özelleşmiş Sertoli-spermatid bağlantı birimleri ortadan kaldırılır ve spermatidler Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübülün lümenine salınırlar. Bu sürece spermiasyon adı verilir. Testisteki spermiasyon hızı ejakülattaki sperm hücrelerinin sayısını belirler [19].

2.2.3. Seminifer epitel siklusu

Farklılaşmakta olan spermatogonik hücreler, seminifer epitelden belirli bir düzen içerisinde yerleşim gösterirler. Spesifik hücre tipleri bir arada gruplanmışlardır. Bu gruplaşmanın nedeni, her Tip A açık spermatogonyum çiftinin soyları arasında interselüler köprüler bulunması ve hücrelerin olgunlaşmanın her evresinde o evreye özgü zaman geçirmeleridir. Seminifer tübülün herhangi bir bölümünde farklılaşmanın tüm evreleri ardışık olarak

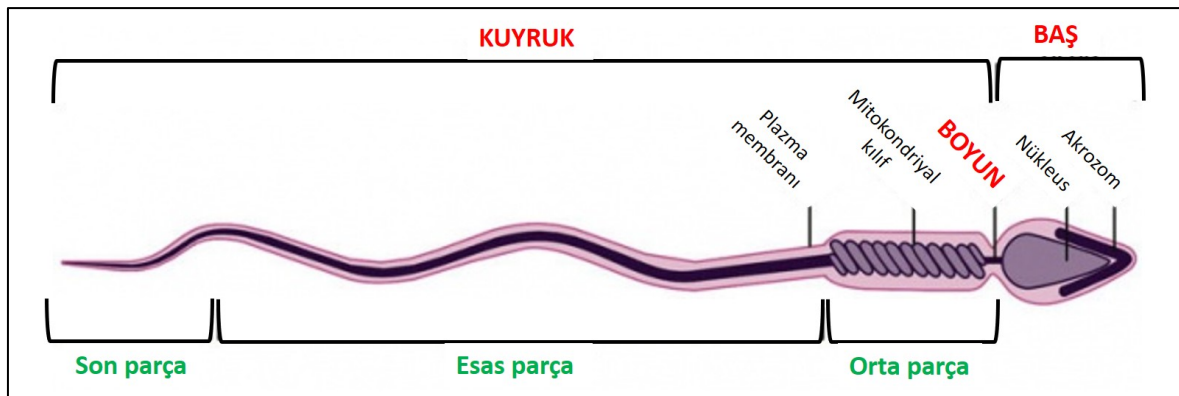
oluşur ve kök hücrelerin soyları sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı kalarak mitoz ve mayoz bölünmelere ve olgunlaşmaya uğrarlar [19].

Seminifer tübüldeki her hücre birliği, bir evre olarak adlandırılır. Tübülün herhangi bir bölgesinde aynı hücre birliği örüntüsünün ardışık iki ortaya çıkışı arasındaki evreler serisi, seminifer epitelin bir siklusunu oluşturur. Seminifer epitel siklusunu en detaylı olarak ratlarda çalışılmıştır ve tübül boyunca doğrusal olarak dizilen 14 ardışık evre ortaya konmuştur. İnsanlarda ise seminifer epitel siklusunda altı evre tanımlanmıştır. Ancak, insanlarda hücre birliktelikleri mozaik bir örüntüde, düzensiz yamalar halinde ortaya çıktığı için bu evreler kemirgenlerdeki kadar açık izlenmez [19].

Seminifer epitel siklusunun süresi sabittir ve insanlarda yaklaşık 16 gün sürer. İnsanlarda bir kök hücrenin spermatogenez sürecini tamamlaması için, her biri 16 gün süren yaklaşık 4-6 siklus ya da 74 güne ihtiyaç duyulur. Daha sonra spermin epididimisten geçmesi için de yaklaşık 12 güne ihtiyaç vardır. İnsan testisinde günde yaklaşık 300 milyon sperm üretilir. Siklus uzunluğu ve spermatogenez süresi sabit olduğundan, herhangi bir farmakolojik müdahalede spermatogenezin ilk fazlarını etkileyen bir ilaç verildiğinde, o bileşiğin sperm üretimine etkisini görmek için yaklaşık 86 gün geçmesi beklenmelidir [19].

2.3. Olgun Spermin Yapısı

Olgun sperm, yaklaşık 60 µm uzunluğundadır. Baş ve kuyruk (flagellum) olmak üzere iki kısımdan oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Olgun spermin yapısı

2.3.1. Sperm başı

Sperm başı, 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığında yassı ve sivri bir yapıdır. Başta yer alan haploid çekirdek yassı ve yoğun bir yapıya sahiptir. Çekirdeğin anterior üçte ikilik bölümünü akrozom örter (Şekil 2.2). Akrozomda oositin zona pellusidasının (ZP) delinmesi için gerekli olan hyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozinin gibi tripsin benzeri proteazlar bulunur. Bu hidrolitik enzimler lizozomlarda da bulunduğu için akrozom, özel bir tip lizozom olarak kabul edilir. Sperm ovuma temas ettiğinde akrozomal enzimlerin salınması akrozom reaksiyonunun ilk basamağıdır. Akrozom reaksiyonu spermin penetrasyonunu ve fertilizasyonu kolaylaştırır ve ovuma başka spermelerin girmesine engel olur [19, 22].

Sperm çekirdeği, perinükleolar matris olarak da adlandırılan perinükleolar teka (PT) ile korunur. PT, disülfid bağları ile bağlanmış yapısal proteinler ve diğer protein molekülleri tarafından oluşturulan sert bir kabuk yapısındadır. PT'yi oluşturan proteinlerden bazıları fertilizasyon sırasında, PT oosit sitoplazmasına salındıktan sonra hücre sinyalleşmesinde görev alırlar [25]. PT, sperm başının üç ana bölümünü yansıtan ve fertilizasyon sırasında çeşitli fonksiyonlar gösteren üç bölüme ayrılabilir (Şekil 2.2).

Subakrozomal katman

Sperm başının akrozomal bölgesinin altında yer alır ve akrozoma tutunur. Bu katmanda, sperm başının zona pellusida ile etkileşimi için gerekli olan proteazlar ve reseptörler bulunur. İç ve dış akrozomal membranlar, ZP'deki fertilizasyon yarığının sindirilmesi için gerekli olan proteazları içeren yoğun bir akrozomal matrisin içinde tutulur [26]. Subakrozomal PT, iç akrozomal membran ile kaynaşır ve sperm başının akrozomal ekzositozdan sonra ZP'ye sekonder bağlanması için gerekli olan reseptör moleküllerini iç akrozomal membrana sabitler. Akrozomal ekzositoz sırasında dış akrozomal membran vezikülasyonla kaybedilirken iç akrozomal membran varlığını sürdürür [21].

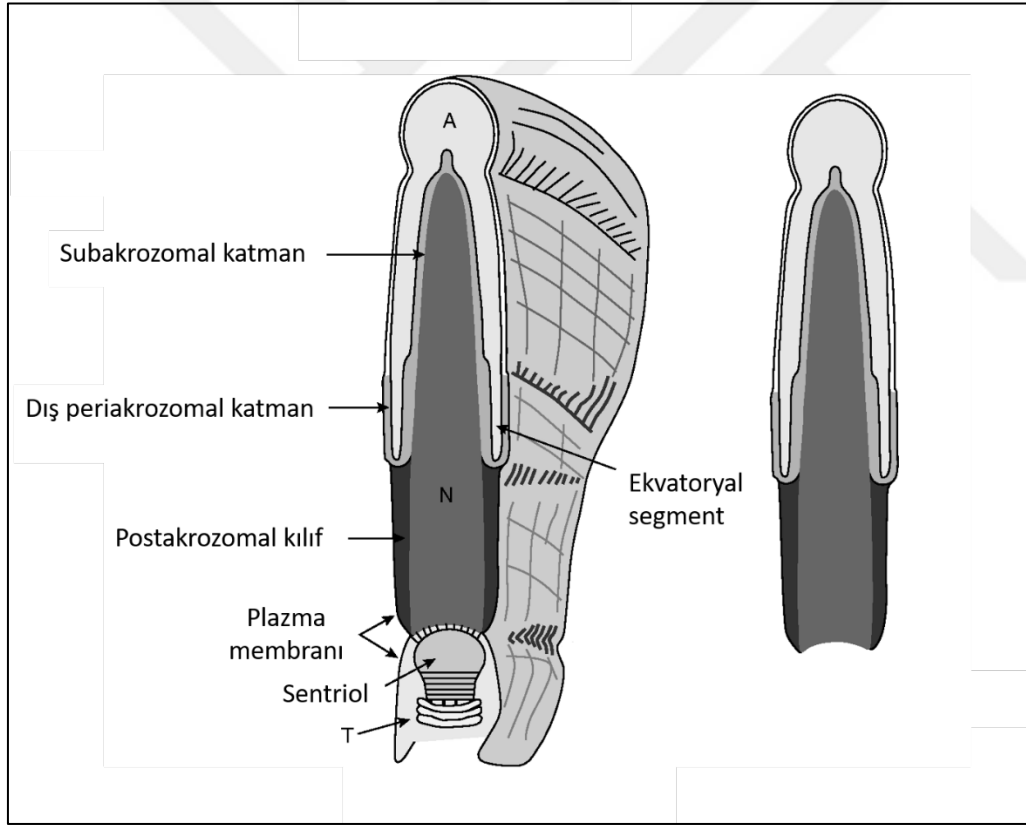
Ekvatoryal segment

İç ve dış akrozomal membranların birbirleri üzerine katlanmasıyla oluşan yapıdır. PT'nin bu bölgesi, sperm ZP'yi geçip perivitellin aralığa ulaştığında, sperm başının oosit plazma

membranına (oolemma) ilk bağlanmasında rol oynayan reseptör moleküllerini taşır. Ekvatorin/MN9 gibi sperm-oolemma bağlanmasında rol oynayan reseptör molekülleri bu bölgede bulunur [27].

Postakrozomal kılıf

PT'nin bu bölgesi, 'sperm kaynaklı, oosit aktive edici faktörler' olarak adlandırılan bir sinyal proteinleri kompleksi içerir [28]. Sperm başının oolemma ile füzyonundan sonra, bu proteinlerin bazıları ooplazmaya dağılarak oositin aktivasyonuna ve zigot gelişiminin başlamasına yol açan sinyal yollarını tetikler. Postakrozomal kılıftan salınan diğer moleküller, sperm çekirdeğine bağlı kalarak erkek pronükleusuna aktarılabilir [21].



Şekil 2 2. Sperm başı ve perinüklear tekanın yapısı (A, akrozom; N, nükleus)

2.3.2. Sperm kuyruğu

Sperm kuyruğu veya flagellum, sperm için hareket kuvveti sağlar. 9+2 mikrotübül düzenlemesine sahip sperm flagellar aksonemini içerir. Aksonem, simetrik olarak dizilmiş

ve dinein kolları ile birbirine bağlanmış dokuz periferik mikrotübül çifti ve bu mikrotübüllere radyal çubuklar ile bağlanmış bir merkezi mikrotübül çiftinden oluşur. Periferik mikrotübüller, aksonemin dışında yer alan ve flagellar hareket sırasında esnek fakat sağlam bir destek sağlayan dokuz dış yoğun fibere paralel olarak yerleşmiştir. Sperm kuyruğu topolojik olarak, aksonem ve dış yoğun fiberlerden oluşan en iç yapı bakımından ortak özelliklere sahip olan fakat dış yapılarında farklılıklar gösteren dört ana bölümden oluşur. Proksimalden distal uca doğru bu bölümler, bağlantı parçası (boyun), orta parça, esas parça ve son parçadır [19, 21, 22].

Bağlantı parçası

Oldukça kısa olan bağlantı parçası, kuyruğun diğer bölümlerindeki dış yoğun fiberlerin devamı olan dokuz adet parçalı kolondan oluşur. Bu dokuz kolonun içinde, erken haploid spermatogenik hücrelerdeki iki sentriyol içeren sentrozomun bir kalıntısı olan proksimal sentriyol bulunur [19, 21, 22].

Orta parça

Orta parça yaklaşık 7 µm uzunluğundadır. Bu bölgedeki dış yoğun fiberler ve aksonemal kompleks, flagellar hareket için gerekli olan enerjiyi (ATP) üreten, sarmal olarak dizilmiş yaklaşık 75-100 adet mitokondriyonun oluşturduğu bir mitokondriyal kılıf ile çevrilidir. Paternal mitokondriyal DNA'yı içeren bu mitokondriyonlar, spermin olgunlaşma ve fertilizasyon sırasında karşılaştığı mutajenik oksidatif stres ile ilgili nedenlerden dolayı fertilize olmuş ovum içerisinde proteoliz ile ortadan kaldırılır [19, 21, 22].

Esas parça

Yaklaşık 40 µm uzunluğunda olan esas parça, orta parçadan mitokondriyal kılıfın distalinde bulunan annulus (Jensen halkası) ile ayrılır. Annulus, bu iki flagellar bölge arasında plazma membran proteinlerinin difüzyonunu önleyen halka şeklinde bir septin yapısıdır. Esas parçadaki dış yoğun fiberler ve aksonemal kompleks, koruyucu bir fibröz kılıf ile çevrilidir. Fibröz kılıf, üçüncü ve sekizinci dış yoğun fiberlere paralel olarak yerleşmiş ve her iki tarafa bir dizi çapraz iskelet ile bağlanmış iki uzunlamasına kolondan oluşur. Dış yoğun fiberler ve fibröz kılıf, spermin ileri hareketi sırasında mikrotübüller

kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan keratinleri içerir. Esas parçadaki membran proteinlerinin çoğu, alttaki fibröz kılıfa bağlanmıştır. Fibröz kılıf, sperm olgunlaşmasını, motiliteyi, kapasitasyonu, hiperaktivasyonu ve/veya akrozom reaksiyonunu düzenleyen sinyal yollarında görev alan proteinler için bir iskelet işlevi görür. Ayrıca motilite için ATP sağlayan sperm spesifik glikolitik yolağın enzimlerini de sabitler [19, 21, 22].

Son parça

Son parça, dış yoğun fiberler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı, yalnızca aksonemal kompleksi içeren kuyruğun son 5µm'lik parçasıdır [22].

2.4. Spermilerin Taşınması

Yeni salınmış hareketsiz spermiler, Sertoli hücreleri tarafından salgılanan bir sıvının içerisinde, lamina propriyanın peritübüler kontraktıl hücrelerinin peristaltik kasılmalarının da yardımıyla seminifer tübüllerden pasif olarak taşınarak seminifer tübülün kısa bir segmenti olan düz tübüllere girerler. Buradan sırasıyla rete testise, duktuli efferentesin ekstratestiküler kısmına ve duktus epididimisin proksimal bölgesine geçerler. Duktus epididimisin kıvrımlı kanalının 4-5 metresi boyunca hareket ederlerken, hücreler hareket yeteneği kazanırlar ve birtakım olgunlaşma değişimlerine uğrarlar [19, 20]:

- DNA'nın yoğunlaşması ile sperm başının boyutu azalır.
- Sitoplazmanın azalması sonucu spermiler daha ince hale gelirler.
- Plazma membranının lipidleri ve proteinlerinde değişiklikler olur ve glikozilasyon meydana gelir.
- Yüzey-ilişkili dekapasitasyon faktörünü içeren epididimal sıvı glikokonjugatlarının eklenmesiyle sperm başı modifiye edilir ve böylece sperm in oositi fertilize etme yeteneği geri dönüşümlü olarak inhibe edilir.

Spermiler depo edildikleri yer olan epididimisin kuyruk kısmından, duktus (vaz) deferensin kalın kas kılıfının persistaltik kasılmalarıyla hızla üretraya atılırlar. Duktus deferens ve

üretir ve taşıyan sıvı içerisinde, yardımcı cinsiyet bezlerinin (vezikula seminalis, prostat ve bulbuüretal bez) salgıları da katılır [20].

Ejakülasyon ya da semenin (yardımcı cinsiyet bezleri salgıları+sperm) hacmi ortalama 3,5 ml kadardır (2-6 ml arasında). Spermeler 2-3 mm/dakika hızında hareket edebilir, ancak ortamın pH'sına bağlı olarak bu hız değişir. Spermeler epididimiste depolandıkları dönemde hareketsizdir, ejakülasyon içinde ise hareketlidirler. Vajinanın asit ortamında yavaş, uterusun alkalik ortamında ise daha hızlı hareket ederler [20].

Cinsel ilişki sırasında, vajinanın forniksinde ve serviksın dış ağzı çevresinde 200-600 milyon kadar sperm birikir. Bu spermelerin ancak %1'i serviksten geçebilir. Vezikula seminalis tarafından üretilmiş olan vesikülaz enzimi semenin bir kısmını koagüle ederek, vajinal bir plak oluşturur. Bu plak semenin vajinaya doğru geri akmasını önler. Spermeler kendi hareketlerinin yanında uterus ve tüp duvarındaki kasılmaların yardımıyla serviksten tuba uterinaya ulaşırlar. Bu yolculuk 2 ile 7 saat sürer. İstiusa ulaştıklarında motiliteleri ve hızları yavaşlar. Ovulasyonla birlikte, oositi çevreleyen kümülüs hücreleri tarafından salgılanan kemotaktik maddelerin etkisiyle spermeler yeniden hareket kazanarak ampullaya doğru yüzmeye devam ederler. Fertilizasyon bölgesine 200 kadar sperm ulaşır. Bu spermelerin çoğu dejenerer olur ve dişi üreme sisteminde ortadan kaldırılırlar. Dişi üreme kanalları içine giren spermeler hareketli olmalarına rağmen oositi fertilize etme yeteneğinde değildirlar. Bunun için öncelikle, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu denilen değişimleri geçirmek zorundadırlar [18-20].

2.5. Kapasitasyon

Kapasitasyon, spermın dişi üreme kanallarında fertilizasyon için uygun hale getirilmesi ve aktive olması dönemidir. Kapasitasyon, sperm ve dişi üreme sistemi arasında yakın bir etkileşimin varlığına bağlıdır [29]. Yaklaşık 7 saat süren kapasitasyon, genellikle uterus ya da tuba uterina içinden geçerken buralardan salgılanan maddeler yardımıyla gerçekleşir. Kapasitasyon sırasında meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişimler spermın zona pellusida reseptörlerine bağlanma affinitesini artırır [19].

Spermeler, kapasitasyon sırasında hiperaktivasyon adı verilen bir hareket değişikliğine uğrarlar [30] ve akrozom reaksiyonu (akrozomal ekzositoz) olarak bilinen fizyolojik bir

salgılama olayını gerçekleştirmeye yetkin hale gelirler. Hiperaktivasyon, daha fazla asimetrik (kırbaç benzeri) hareket ve daha güçlü yüzme kuvveti ile sonuçlanan, flagellar bükülme açısındaki bir artış olarak tanımlanır [29]. Hiperaktivasyon, sperm kuyruğunun plazma membranındaki CatSper (sperm katyon kanalları) adı verilen transmembran Ca^{+2} kanal proteinlerinden ani Ca^{+2} girişi sayesinde meydana gelir. Bu sayede, spermelerin tuba uterinadaki visköz ortamda daha hızlı hareket etmeleri ve oositi çevreleyen kümülüs ooforus ve ZP katmanlarına penetre olmaları kolaylaşır [31]. Yalnızca kapasite olmuş spermeler, oosit yakınındaki progesteron gradyanlarını kullanarak kemotaktik yüzme yapabilirler [32]. Spermelerin ZP'ye penetre olabilmeleri için ayrıca akrozom reaksiyonu geçirmeleri gerekir [33].

Kapasitasyon sırasında spermde (1) cAMP'ye bağlı fosforilasyon yollarının uyarılması, (2) plazma membranının yeniden düzenlenmesi, (3) plazma membranının hiperpolarizasyonu ve (4) iyon geçirgenliğinin düzenlenmesi olmak üzere dört temel biyokimyasal değişim meydana gelir.

2.5.1. cAMP'ye bağlı fosforilasyon yollarının uyarılması

İnsan spermde kapasitasyon, elektrolitler (Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} , HCO_3^{-} , Mg^{+2} , Ca^{+2} ve PO_3^{-4}), enerji substratları (glukoz, piruvat ve laktat) ve kolesterol alıcısı (genellikle serum albümin) içeren bir medyumda *in vitro* olarak taklit edilebilir [1]. Hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu, kapasitasyon medyumunda bulunan bu kimyasalların varlığına bağlıdır.

Spermeler, seminal plazmada veya dişi üreme kanalında yüksek konsantrasyonda bikarbonat (HCO_3^{-}) ile karşılaşılır [34]. Sperme ilk HCO_3^{-} girişi, elektrojenik Na^{+}/HCO_3^{-} birlikte taşıyıcıları (NBC) yoluyla gerçekleşir [35, 36]. Kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici kanal (CFTR) da HCO_3^{-} girişine bağlı olayları etkiler [37].

HCO_3^{-} , spermelerdeki çözünebilir bir adenilil siklaz tipi olan ADCY10'u uyarır [38]. ADCY10 aktivasyonu, siklik adenosin monofosfat (cAMP) sentezinin artmasına neden olur [39]. ADCY10 nakavt fareler, spermeleri aktif olarak hareket edemediği ve hiperaktive olamadığı için sterildirler. Bu spermelerin, zona pellusida ile indüklenen bir akrozom reaksiyonuna girme yeteneklerinde bir problemleri yoktur, bu da akrozom reaksiyonunun

moleküler düzeyde diğer kapasitasyon ile ilişkili olaylardan ayrılabilceğini göstermektedir [40].

cAMP'nin ana hedeflerinden biri, sperm biyolojisinin temelini oluşturan olan protein kinaz A'dır (PKA) [41]. HCO_3^- 'ün etkisiyle PKA bir dakika içerisinde maksimum aktiviteye ulaşır [42]. Kapasitasyon sırasında, cAMP/PKA'ya bağlı bir yolağın etkisiyle bazı sperm proteinlerinde tirozin fosforilasyonu (PY) zamana bağlı olarak artar [42, 43]. PKA'nın PY'yi aktive ettiği mekanizmaya prolin bakımından zengin tirozin kinaz 2 aracılık eder [43].

Memeli spermelerinde PY'nin gerçekleştiği bilinen proteinler, AKAP4, valozin içeren protein, AKAP3, CABYR [44-46], sperm spesifik aldolaz ve piruvat hidrojenaz'dır [47, 48]. Bu fosforilasyonların rolü henüz açıklanmamıştır; ancak, PY'nin, bu enzimlerin aktivitesini veya konumunu düzenleyebileceği düşünülmektedir. PY değişikliklerinden sorumlu olan diğer enzimler tirozin kinazlardır. Fare ve insan spermünde bulunan cSrc PY düzenlenmesinde önemli rol oynar [49]. cSrc inhibitörleri kapasitasyonla ilişkili PY artışını ve PKA fosforilasyonunu engeller, sperm motilite parametrelerini ve IVF başarısını azaltır [50].

cAMP/PKA yolağının düzenlenmesi ile PY artışı arasındaki ilişki tam olarak bilinmekle birlikte, spermde başka protein kinazlar da bulunur ve kapasitasyonun düzenlenmesinde bu kinazlar da rol oynayabilir. Memeli spermelerinde farklı PKC izoformları tanımlanmıştır. Forbol esterleri bu kinazları uyarır ve sperm motilitesini [51], akrozom reaksiyonunu [52] ve cAMP seviyelerini [53] değiştirir. Spermelerde tespit edilen diğer ser/thr protein kinazlar, Erkl/2 [54], GSK3 [55], CaMKIV [55] ve kazein kinaz II'dir [56].

cAMP, PKA'dan başka cAMP ile doğrudan aktive edilen değişim proteini (EPAC) gibi diğer hedeflere de bağlanabilir. EPAC1 ve EPAC2, insan spermelerinde baş bölgesinde eksprese edilir ve akrozom reaksiyonunda önemli bir rol oynarlar [57, 58].

2.5.2. Plazma membranının yeniden düzenlenmesi

Sperm plazma membranı, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu etkileyen aktif bir yapıdır [59]. Kapasitasyon sırasında sperm plazma membranında bazı değişiklikler

meydana gelir; membran akışkanlığı artar ve kolesterol plazma membranından uzaklaştırılır [60].

Hücre membranlarının iki katmanlı yapısındaki fosfolipidler membranda asimetric olarak dağıtılmıştır [61]. Normal şartlar altında, plazma membranının iç ve dış yaprakları arasındaki lipid dağılımı, çeşitli fosfolipid transferazların aktivitesi ile korunur. Flippaz, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamini dış yapraktan iç yaprağa taşır [62], floppaz, fosfolipidleri iç yapraktan dış yaprağa taşır [63] ve skramblaz, fosfolipidleri membranın her iki yaprağına doğru taşır [64]. Belirli koşullar altında, hücrenin yaşamı boyunca korunan normal fosfolipid asimetrisi, dış yaprakta fosfatidilserin ve fosfatidiletanolaminin ortaya çıkmasıyla bozulur. Bu bozulma “karışma” olarak da bilinir ve lenfosit aktivasyonu, eritrosit yaşlanması ve apoptozis sırasında görülür [65].

Spermlerde karışma, erken bir kapasitasyon olayı olarak gözlemlenir. Bu hücrelerde fosfolipid asimetrisinin bozulması, sperm skramblaz aktivitesinin artmasından kaynaklanır. Fosfolipid dağılımındaki değişiklik HCO_3^- tarafından uyarılır, cAMP/PKA yoluyla düzenlenir ve protein fosfataz inhibitörleri tarafından artırılır [66]. Karışma, apoptozisin iyi bilinen bir özelliği olsa da spermde görülen HCO_3^- ile indüklenen karışma apoptoz ile ilişkili değildir [67]. Fosfolipid karışması, albümin aracılı kolesterol ekstraksiyonunu kolaylaştırdığı [66] için kapasitasyonun gerçekleşmesi için oldukça önemlidir.

Sperm plazma membranındaki ana sterol kolesteroldür (~90%) [68]. Membrandaki kolesterol/fosfolipid (K/FL) oranı, kapasitasyonun tamamlanması için gerekli olan süreyi etkiler: K/FL oranı ne kadar yüksekse, kapasitasyonun gerçekleşmesi için gereken inkübasyon süresi o kadar uzundur [69]. Açıklanamayan infertilite hastalarının spermlerinde, düşük fosfolipid içeriği nedeniyle K/FL oranının daha yüksek olduğu (Sugraroek ve diğerleri, 1991) ve *in vitro* fertilizasyonda (IVF) başarısızlığa uğramış normozoospermik hastalarda, atipik olarak kolesterol içeriğinin yüksek olduğu veya *in vitro* inkübasyon sırasında kolesterol akışının yavaş olduğu bildirilmiştir [70]. Bu nedenle, *in vitro* kapasitasyon sırasında kolesterolün plazma zarından uzaklaştırılması gerekir [71]. *In vitro* deneylerde en çok kullanılan kolesterol alıcısı, tuba uterinada da bol miktarda bulunan albumindir [72]. *In vitro* kapasitasyonu indüklemek için serum albumin yerine yüksek yoğunluklu lipoproteinler ve β -siklodekstrinler gibi kolesterol bağlayıcı bileşikler de kullanılabilir [71]. Serum albümin, kapasitasyon sırasında Ca^{+2} akışını artırma [73] gibi

başka rollere sahip olsa da kolesterol akışını kolaylaştırma özelliği bakımından kapasitasyon için gereklidir. Kapasitasyon, medyuma kolesterol ve/veya kolesterol analoglarının eklenmesiyle bloke edilebilir [71].

2.5.3. Plazma membranının hiperpolarizasyonu

Spermlerde, vücuttaki diğer çoğu hücrede olduğu gibi, hücre içi iyon konsantrasyonları hücre dışı ortamdakilerden belirgin şekilde farklıdır. Bu farklılıklar, plazma membranının hücre içindeki ve dışındaki iyonlara karşı seçici geçirgen olmasından kaynaklanır. Dinlenme halinde, bu geçirgenliklerin dengesi, istirahat membran potansiyeli (E_m) olarak bilinen bir elektrik potansiyeli ile sonuçlanır [74].

Spermler, testisten dışı üreme kanalındaki fertilizasyon bölgesine yolculukları boyunca farklı hücre dışı K^+ , Na^+ , Cl^- ve HCO_3^- konsantrasyonlarıyla karşılaşır. İnsanlarda duktus deferensteki iyon konsantrasyonları [K^+ (~110 mM), Na^+ (~30 mM), Cl^- (~100 mM) (Hinton et al., 1981) ve HCO_3^- (~2-4 mM)] [34], seminal plazmadakinden [K^+ (~12-63 mM), Na^+ (~102-143 mM), Cl^- (~37-45 mM) ve HCO_3^- (~25 mM)] [75, 76] ve tubal sıvıdakinden [K^+ (~4.5-21 mM), Na^+ (~130-149 mM), Cl^- (~118-132 mM) ve HCO_3^- (~20-60 mM)] [77] farklıdır. Seminal plazma ve dışı üreme yollarında Na^+ ve HCO_3^- duktus deferenstekinden daha yüksek olmasına rağmen, K^+ daha azdır ve Cl^- değişken olup, tubal sıvıda maksimum konsantrasyona ulaşır. Bu iyonik değişiklikler hem E_m 'de hem de hücre içi pH'da çeşitliliğe neden olur [1].

Hücre içindeki net negatif yük konsantrasyonu arttığında E_m hiperpolarize olur. Fare, sığır, at ve insan spermlerinde kapasitasyon sırasında plazma membranının hiperpolarize olduğu bulunmuştur [2, 78-81]. Fare spermindeki deneyler, hiperpolarizasyonun hücrelerin akrozom reaksiyonuna hazırlanmaları için gerekli ve yeterli olduğunu göstermiştir [2].

İnsan spermindeki E_m değişiklikleri, fertilité ile ilişkilidir [73, 82]. İdiyopatik ve astenozoospermik infertil erkekler, fertil erkeklerden daha depolarize E_m 'ye sahiptirler [83] ve E_m depolarizasyonu, subfertil erkeklerdeki düşük IVF başarı oranı ile ilişkilidir [84].

Kapasitasyon sırasında gerçekleşen hiperpolarizasyon, cAMP yüksekliğinden kaynaklanır [37, 85, 86]. İnsan spermelerinde K^+ geçirgenliğinin artması ve/veya Na^+ geçirgenliğinin azalması sonucunda hiperpolarizasyonun meydana gelebileceği tahmin edilmektedir [87].

K^+ kanalları

Memeli spermelerinde, hücre içersine doğru K^+ akışını önleyen Ba^{+2} ve K^+ kanallarını inhibe eden sülfonilüreler (tolbutamid ve glibenklamid) kullanıldığında, kapasitasyon ile ilişkili hiperpolarizasyonun engellendiğinin bulunmasıyla [88, 89], K^+ kanallarının polarizasyon değişikliğine katıldıkları ortaya konmuştur. Fare spermelerinde kapasitasyon sırasında indüklenen fizyolojik hiperpolarizasyonun, Na^+ geçirgenliğinin azalmasına değil, K^+ geçirgenliğinin artmasına bağlı olduğu bildirilmiştir [90].

K^+ kanallarının Slo ailesinin Slo1 ve Slo3 olmak üzere iki üyesi hiperpolarizasyonda rol oynar [87, 91]. Yalnızca spermatogenik hücrelerde ve olgun spermelerde eksprese edilen Slo3 kanallarının aktivasyonu, sperm fonksiyonları için oldukça önemlidir [87]. Fare testiküler spermelerindeki Slo3 kanalları, hücre içi alkalinizasyon, depolarizasyon ve cAMP ile aktive edilir [85]. Slo3 negatif farelerin spermeleri ileri doğru yüzemedikleri, hiperpolarize olamadıkları ve akrozom reaksiyonuna giremedikleri için bu fareler infertildir [87]. İnsan spermünde, K^+ kanallarının hiperpolarizasyon sürecine katılımı fare spermünde olduğu kadar iyi belirlenmemiştir [92]. İnsan spermelerindeki K^+ akımı (KSper), pH'ya daha az, $[Ca^{+2}]_i$ 'ye karşı daha fazla duyarlıdır [93] ve progesteron tarafından inhibe edilir [93, 94].

Na^+ kanalları

Fare spermünde istirahat Em'sinin düzenlenmesine Na^+ da katılır [5, 35]. Fare spermelerinde ENaC- α ve ENaC- δ alt birimleri bulunur [5]. İnsanlarda, testiste ENaC- δ alt ünitesi [95] ve sperm flagellumun orta parçasında ENaC- α [9] ve ENaC- β [36] eksprese edilir. ENaC inhibisyonu, sperm hareketliliğini artırır ve plazma membranının hiperpolarizasyonuna neden olur [9, 36].

Fare ve insan sperminde ENaC'ların yanında elektrojenik NBC'ler de hücre dışına Na^+ , hücre içerisine HCO_3^- taşınmasını sağlayarak membran hiperpolarizasyonuna neden olurlar [35, 36].

Na^+/K^+ ATPaz'lar

Na^+/K^+ pompası, ATP hidrolizinden kaynaklanan enerjiyi kullanarak Na^+ ve K^+ transportunu katalizleyen elektrojenik bir transmembran ATPaz'dır [96]. Na^+/K^+ ATPaz'ın düzgün bir şekilde çalışması her hücre için hayati öneme sahiptir çünkü bu pompalar plazma membranında Na^+ ve K^+ için elektrokimyasal bir gradyan oluştururlar [97]. Na^+/K^+ ATPaz, Na^+ , K^+ , ATP ve ouabain (pompanın bir inhibitörü) için bağlanma bölgeleri içeren bir katalitik α -alt birimi [98] ve α -alt birimini membrana yönlendirmek için gerekli olan β -alt birimi olmak üzere iki alt birimin oluşturduğu bir oligomerdir [99, 100]. 4 farklı α -alt biriminin (α_1 , α_2 , α_3 ve α_4) ve 3 farklı β -alt biriminin (β_1 , β_2 ve β_3) olması nedeniyle birkaç Na^+/K^+ ATPaz izoenzimi vardır [101]. Her kombinasyon hücreye ve dokuya özgüdür ve belirli bir ekspresyon şekli gösterir [102].

Na^+/K^+ ATPaz'ların α_4 -alt birimi [103, 104] rat ve fare germ hücrelerinde ve insanlardaki olgun spermelerde eksprese edilir [103, 105-107]. α_4 nakavt farelerde sperm motilitesi ve hiperaktivasyon engellendiği için bu hayvanlar tamamen sterildir [108]. α_4 nakavt fare spermleri, yüksek $[\text{Na}^+]_i$ nedeniyle depolarize bir Em göstermiştir. Ratlarda, kapasitasyon sırasında α_4 Na^+/K^+ ATPaz'ın aktivitesi yükselerek $[\text{K}^+]_i$ 'nin artmasına, hücre içindeki Na^+ 'nın azalmasına ve ATP tüketimine neden olmuştur [108]. Na^+/K^+ ATPaz α_1 ve α_4 'ü inhibe eden konsantrasyonlarda ouabain'e etkin bırakılan insan spermlerinde hücre içi Na^+ artmış ve buna bağlı olarak sperm motilitesi azalmıştır [105].

2.5.4. İyon geçirgenliğinin düzenlenmesi

Sperm hücre dışı pH'sı

Spermler epididimisten geçerken, seminal sıvıda ve dişi üreme yollarında karşılaşacaklarından çok farklı koşullara etkin kalırlar. Epididimis lümeni, diğer vücut sıvılarına kıyasla daha düşük miktarda Na^+ ve Cl^- , daha yüksek miktarda K^+ içerir. Ozmolarite, karnitin, fosfokolin ve gliserilfosforilkolin gibi organik anyonlarla dengelenir

[74]. Ayrıca, epitelden H^+ 'nin salınması ve HCO_3^- 'ün alınması ile epididimal sıvı düşük bir pH'da (~6.8) tutulur. Bu düşük pH, spermin işlevselliğini korumak için oldukça önemlidir [109]. İnsan semen pH'sı ise alkalidir (~7.2-8.4) [76].

Ejakülasyondan sonra, spermeler dişi üreme yollarına aktarıldığında ve buradaki yolculukları sırasında, yeniden farklı hücre dışı iyon konsantrasyonları ve ozmolarite ile karşılaşılırlar. Bu durumda, seminal sıvıdaki konsantrasyonlarına kıyasla hücre dışı K^+ azalırken, HCO_3^- ve Na^+ artar. Lactobacilli ve diğer vajinal flora nedeniyle dişi üreme sistemindeki en düşük pH vajinadadır (~pH 4.4). Seminal plazma geçici olarak vajinal pH'yı 7.2'ye kadar artırır, ortamı alkalize eder ve böylece spermelerin yüzmeye başlamasını sağlar [82]. pH, endoserviks ve uterusu doğru giderek yükselir (~pH 7) [110]. Bu yeni ortamda sperm, başka bir ekstratestiküler olgunlaşma değişikliğine yani kapasitasyona uğrar [74].

Sperm hücre içi pH'sının düzenlenmesi

Hücre içi pH'nın düzenlenmesi tüm hücrel işlemler için esastır. Memelilerde pH'nın homeostazisi HCO_3^- ve H^+ taşınması ile kontrol edilir. Spermelerin özellikle epididimden dişi üreme sistemindeki fertilizasyon bölgesine geçişleri sırasında etkin kaldıkları yüksek HCO_3^- konsantrasyonu, alkaline pH ve albümin, kapasitasyon sırasında gerçekleşen sitoplazmik alkalizasyona katkıda bulunur [111]. Sperm hücre içi pH'sının düzenlenmesi yalnızca kapasitasyon için değil, aynı zamanda motilite ve akrozom reaksiyonu için de temel oluşturur. pH'yı düzenleyen iyon taşıyıcıları H^+ taşıyıcıları ve HCO_3^- taşıyıcıları olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

H^+ taşıyıcıları

Voltaj-kapılı H^+ kanalları (Hv1)

Sperm kuyruğunun esas parçasında bulunan Hv1 kanalları [112], H^+ iyonlarının seçici bir şekilde hücre içine akışını düzenler [1]. Hv1 aktivitesi, kapasitasyon, anandamid, membran depolarizasyonu ve alkaline hücre dışı pH ile artar. Protein kinaz C (PKC), diğer hücre tiplerinde olduğu gibi spermelerde de Hv1 aktivitesini düzenler [74]. Bu kanallar, seminal plazmada yüksek konsantrasyonda bulunan Zn^{+2} tarafından inhibe edilir [112].

Hv1, insan sperminde ana proton ileticisidir ve pH kontrolünden sorumludur ancak bugüne kadar bu kanalın kapasitasyon sırasındaki hücre içi pH artışındaki rolüne ve Hv1 mutasyonlarının insan fertilitesine etkisine ilişkin herhangi bir kanıt bildirilmemiştir [1].

Na⁺/H⁺ değiştiricileri (NHE)

Memelilerde evrimsel olarak korunmuş 13 adet NHE bulunur. Rat, fare ve insan spermlerinde NHE1, NHE5 ve NHE10 olmak üzere üç NHE [113-115] ve sperme özgü NHE (sNHE) eksprese edilir [114, 115]. Kuyruğun esas parçasında lokalize olan sNHE, hücre içi pH'ı ve HCO₃⁻ konsantrasyonunu düzenler. Astenozoospermik hastaların spermlerinde sNHE ekspresyonu düşüktür [115]. EIPA ve amilorid, NHE aktivitesini inhibe ederek pH'yı ve sperm motilitesini etkiler [116, 117]. sNHE nakavt erkek fareler infertildir ve spermleri hareketsizdir [114]. sNHE elektronötral olduğundan, geleneksel elektrofizyolojik teknikler kullanılarak spermlerdeki rolünü incelemek zordur [91]. Ancak, HCO₃⁻'ün hücre dışı Na⁺ konsantrasyonuna bağlı bir şekilde spermleri hiperpolarize ediyor olması, kapasitasyon sürecine NHE'nin de dahil olabileceğini göstermektedir [74].

HCO₃⁻ taşıyıcıları

HCO₃⁻ zayıf bir baz olduğundan, hücre içi HCO₃⁻'deki değişiklikler hücre içi alkalizasyona neden olabilir. HCO₃⁻ taşıyıcıları, SLC4 ve SLC26 aileleri [118] ile CFTR'yi içerir [119]. Ayrıca karbonik anhidrazlar (CA) [120] ve albumin de hücre içi HCO₃⁻ konsantrasyonunun düzenlenmesine etki eder [121].

SLC4 ve SLC26

SLC4 ailesi üyeleri Na⁺ bağımlı ve Na⁺ bağımsız olmak üzere grup içerirler [118, 122]. Na⁺ bağımlı üyeler, elektronötral Cl⁻/HCO₃⁻ değişimine aracılık eden ve SLC4A1 (AE1), SLC4A2 (AE2) ve SLC4A3 (AE3) olarak adlandırılan üç anyon değiştiricidir [123, 124]. İnsan sperminde, ekvatoryal segmentte SLC4A1 ve SLC4A2'nin varlığı gösterilmiş olmasına rağmen [125] bu ailenin hücre içi pH düzenlemesine katılımı bilinmemektedir. Na⁺ bağımlı üyeler ayrıca NBC olarak adlandırılan beş adet Na⁺-eşlenik HCO₃⁻ taşıyıcısını

içerir. Fare ve insan spermelerinde NBC'ler kapasitasyon sırasındaki ilk HCO_3^- girişinden sorumludurlar ve pH'nın düzenlenmesinde rol oynarlar [1].

SLC26 ailesi üyelerinden SLC26A3, SLC26A6 ve SLC26A8, elektrojenik $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anyon değiştircileridir. Fare ve insan spermide, CFTR ile SLC26A3, SLC26A6 ve SLC26A8 değiştircileri arasındaki fiziksel etkileşim sayesinde hücre içi pH artışı gerçekleşir [37, 126-128].

CFTR

CFTR, Cl^- için seçici bir iyon kanalıdır ve ayrıca farklı geirgenliklere sahip olmakla birlikte diğer anyonları da iletir ($p\text{Br}^- \geq p\text{Cl}^- > p\text{I}^- > p\text{HCO}_3^-$). Bu ATP kapılı kanal, PKA tarafından düzenlenir [119]. Dolayısıyla PKA aktivitesi insan spermide hücre içi pH'nın düzenlenmesi için gereklidir [37].

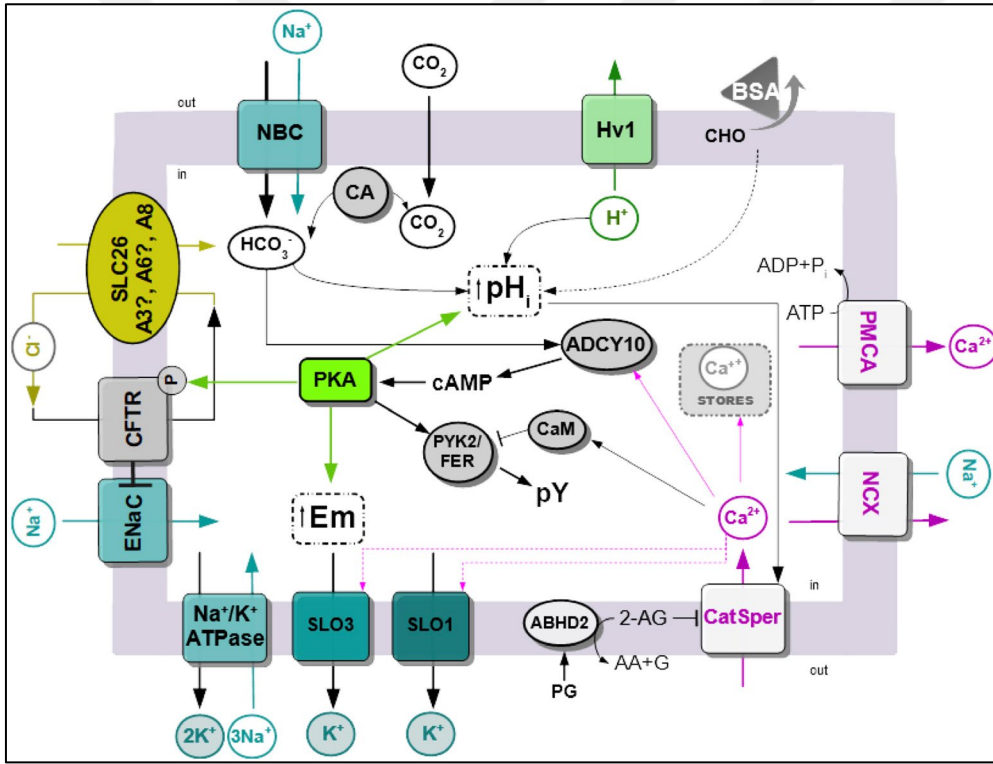
İnsan ve fare olgun spermelerinde CFTR proteini kuyruğun orta parçası ve [79] ve başın ekvatorial segmenti [128] ile sınırlıdır. İnsanlarda, CFTR genindeki mutasyonlar, kistik fibrozis hastalığına neden olur. Kistik fibrozisli hem kadın hem erkek hastalarda fertilitte bozukluğu ortaya çıkar. İnsan spermeleri CFTR inhibitörüne etkin bırakıldıklarında, akrozom reaksiyonu geçiren sperm yüzdesi, hiperaktivasyon ve oosite penetrasyonu azalır [129].

Karbonik anhidrazlar (CA)

Karbonik anhidrazlar (CA), CO_2 'nin HCO_3^- 'e ($\text{OH}^- + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen metaloenzimlerdir. İnsan spermelerinde CAI ve CAII post-akrozomal bölgede [120] ve kuyrukta [130, 131], CAXIII ise yalnızca kuyrukta eksprese edilir [131]. CA'ların işlevi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte bu enzimlere karşı genel inhibitörlerin kullanımı motiliteyi etkiler ve kapasite olmuş insan spermide akrozom reaksiyonunu arttırır [131, 132].

Albumin

İnsan spermde kapasitasyon sırasında gerçekleşen sitoplazmik alkalinizasyon, albumin tarafından kolesterolün uzaklaştırılmasına da bağlıdır [133]. Kolesterol eritrositlerde NHE ve $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ değiştiricilerinin aktivitesini değiştirir [121] ancak bu düzenlemenin insan spermdeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Albumin yalnızca bir kolesterol alıcısı değildir, aynı zamanda Zn^{+2} 'yı şelatlar [134]. Bu nedenle, hücre içi pH üzerindeki etkisi, kolesterol akışına ve/veya Zn^{+2} şelasyonuna bağlı olabilir. İnsan spermnin kapasitasyonu sırasında hücre içi pH'nın düzenlenmesi ve plazma membranının hiperpolarizasyonunda görev alan iyon kanalları ve bunlarla ilişkili sinyal yolakları Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.3. İnsan sperm kapasitasyonunda görev alan iyon kanalları ve bunları düzenleyen sinyal yolakları [18]

2.6. Epitelyal Sodyum Kanalları (ENaC)

Çoğunlukla epitel hücrelerinde olmak üzere birçok omurgalı hücre tipinde eksprese edilen epitelyal sodyum kanalları (ENaC'lar), fizyolojide ve patofizyolojide önemli rol oynayan iyon kanallarıdır. ENaC'lar, katyon seçici kanalların ENaC/dejenerin üst ailesinin üyeleridirler. Sırasıyla scnn1a, scnn1b, scnn1g ve scnn1d genleri tarafından kodlanan α , β ,

γ ve δ alt birimlerinden oluşurlar. Alt birimlerin her biri, iki transmembran bölgeye, bir büyük hücre dışı bölgeye ve kısa sitoplazmik C- ve N-terminal bölgelerine sahiptir. ENaC'lar Na^+ -seçicidirler ve μM altı konsantrasyonlardaki diüretik amiloride duyarlıdırlar. Bu nedenle amiloride duyarlı sodyum kanalları olarak da adlandırılırlar [135]. Bu kanallar, Na^+ 'nın denge potansiyeline doğru yer değiştirmesini sağlayarak hücrelerde istirahat halindeki membran potansiyelinin devamlılığına katkıda bulunurlar [6].

ENaC'lar, tipik olarak transepitelyal Na^+ transportu yapan çeşitli epitel hücrelerinin apikal membranlarında eksprese edilerek vücudun tuz ve su homeostazisinin korunmasında görev alırlar [136]. Bu kanallar, böbrekteki aldosterona duyarlı distal nefronunun (ASDN) esas hücreleri, mesanenin, akciğer solunum yollarının ve distal kolonun epitel hücreleri ile ter bezlerinin ve tükürük bezlerinin kanallarındaki epitel hücreleri gibi vücuttaki birçok epitel dokusunun apikal plazma membranında bulunurlar [7]. ENaC, ASDN'de vücudun toplam Na^+ içeriğini, hücre dışı sıvı hacmini ve kan basıncını düzenleyen Na^+ taşıyıcılarından biridir [137]. Merkezi sinir sisteminin belirli bölgelerinde kan basıncının düzenlenmesinde rol oynar [138]. Vasküler endotelial hücrelerde ve düz kas hücrelerinde, vasküler tonusun ve basınca bağlı miyojenik yanıtın düzenlenmesine katkı sağlar [139]. Lingual epitelde, tuz tad alma duyusuna katılır ve Na^+ alımını etkiler [140]. Silyalı hücrelerde ENaC silyada bulunur ve epitelial yüzey sıvısının hacminin düzenlenmesine yardımcı olarak, solunum yollarında mukusun ve üreme kanallarında gametlerin taşınmasında görev alır [135]. ENaC aktivitesinin bozulması, Na^+ -duyarlı ve kalıtsal hipertansiyon (Liddle sendromu), tip I psödohipoaldosteronizm, kistik fibrozis, yenidoğan respiratuvar distres sendromu ve hipoksik pulmoner ödem gibi hastalıklara neden olur [7].

Böbrek, akciğer, kolon, ter bezleri ve tükürük bezlerinde bulunan ENaC'lar, α -, β - ve γ -ENaC olmak üzere yapısal olarak ilişkili üç homolog alt birimden oluşurlar. Bu kanallar en yaygın ve en çok çalışılan kanallardır. δ alt birimleri ise kendi başlarına veya β ve γ alt üniteleri ile birlikte katyonik kanallar meydana getirebilirler (2-6). Primatlara özgü (insan ve şempanze) olan δ ENaC mRNA'sının en yüksek miktarda eksprese edildiği organlar beyin, kalp, testis, ovaryum ve pankreasır. Bu da δ alt biriminin primer fonksiyonunun epitelial dokuyu içermediğini göstermektedir [141].

2.6.1. ENaC aktivitesinin düzenlenmesi

ENaC fonksiyonu, çeşitli hücre dışı ve hücre içi faktörler tarafından düzenlenir. ENaC aktivitesinin kontrolünde görev alan yolaklar, kanal alt birimlerinin ekspresyonu/sentezi, hücre içi kanal trafiği ve kanalın açılması gibi fonksiyonel kanal düzenlenme şekillerini etkiler [7].

Hücre dışı faktörler

Hormonlar

Aldosteron, anjiyotensin II, arjinin vasopressin, atriyal natriüretik peptid, insülin ve endotelin gibi hacim düzenleyici hormonlar epitelyal Na^+ transportunu etkiler. ENaC'ın hormonal düzenlenmesi, çeşitli kinazları içeren hücre içi sinyal yolaklarının aktivitesi aracılığıyla meydana gelir [7].

Proteazlar

ENaC eksprese eden hücrelerde, hem proteolitik olarak işlenmiş (aktif) hem de işlenmemiş (inaktif) ENaC alt birimleri bulunur Hücre yüzeyindeki inaktif kanallar, proteazlarla aktive edilebilen bir kanal havuzu görevi görürler [7]. Furin, prostatin, kallikrein, pankreatik elastazlar, transmembran proteaz serin 4, matriptaz ve bakteri kaynaklı proteazlar gibi hücre dışı proteazlar, α ve γ alt birimlerinin proteolizine neden olarak kanalı aktive ederler [136].

Hücre dışı Na^+ konsantrasyonu

Hücre dışı Na^+ konsantrasyonundaki değişikliklere yanıt olarak ENaC aktivitesinin saniyeler içinde değişmesi, “ Na^+ ’nın kendi kendini inhibisyonu” olarak adlandırılır. Bu inhibisyon, ASDN’de üriner Na^+ dalgalanmalarına göre Na^+ akış hızının hızla ayarlanmasına olanak sağlar. Böylece, üriner Na^+ yüksek olduğunda böbrek tübüllerindeki Na^+ emilimi azaltılırken, Na^+ düşük olduğunda inhibisyonun engellenmesiyle emilim artırılarak üriner Na^+ kaybı en aza indirilir [136].

Mekanik etki

Hidrostatik basınç veya hücre şişmesinden kaynaklanan membran gerilmesiyle hücrelerdeki laminar makaslama stresi artar. Bu hücrelerde bulunan ENaC alt birimlerinin hücre dışı bölgeleri, makaslama stresinin algılanmasını sağlar ve strese yanıt olarak kanal aktive olur [142].

Hücre içi faktörler

Asidik fosfolipidler

Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2) ve -trisfosfat (PIP3) gibi anyonik fosfolipidler, ENaC alt birimlerindeki sitoplazmik katyonik sekanslara bağlanarak yapısal değişikliğe neden olur ve kanal açıklığını artırırlar [143].

Sistein-Palmitoilasyonu

ENaC- β ve γ alt birimlerinin sistein palmitoilasyonu yoluyla posttranslasyonel modifikasyonu kanalların aktive olmasını sağlar. Palmitoilasyonunun engellenmesi hem kanal açıklığını azaltır hem de Na^+ 'nın kendi kendini inhibisyon yanıtını artırır [144].

Feedback inhibisyonu

Na^+ alımının artması, hücre içi Na^+ 'yı artırarak dolaylı olarak ENaC aktivitesini azaltır. Hücre dışı Na^+ değişikliklerine yanıt olarak gerçekleşen Na^+ kendi kendini inhibisyonu hızına göre daha yavaş bir şekilde (saatler sürer) meydana gelen bu olay, feedback inhibisyonu olarak adlandırılır [7].

Metabolik substratlar ve pH

Metabolik substratların azalması ve hipoksi nedeniyle hücrel metabolizmanın inhibe olması, membrandaki ENaC aktivitesini inhibe eder. Hücre içindeki ATP miktarı azaldığında AMPK tarafından membrandaki ENaC miktarı azaltılır. Hücre içi

asidifikasyon α -ENaC'ı inhibe ederken, hücre içi alkalinizasyon, kanal açıklığını arttırarak ENaC aktivitesini uyarır [7].

2.6.2. ENaC trafiği

ENaC alt birimleri, biyosentetik yolak boyunca sentezlenip modifiye edildikten sonra apikal plazma membranına gönderilirler [145]. Alt birimler daha sonra klatrin kaplı veziküller içinde plazma membranından alınarak lizozomlarda parçalanır veya plazma membranına geri dönüştürülürler [141].

Epitelyal hücrelerin apikal plazma membranındaki ENaC alt birimlerinin sayısı hücre içindeki toplam alt birim sayısına göre daha azdır. Subapikal kompartmanda yer alan, yeni sentezlenmiş alt birimlerin bulunduğu havuzdan ya da daha önce membrandan alınarak geri dönüşüme uğramış alt birimlerin bulunduğu havuzdan plazma membranına eklenen kanallar sayesinde hücre yüzeyindeki işlevsel ENaC miktarı çok kısa bir sürede arttırılabilir [7]. cAMP ve ısı şoku proteinleri ile aldosteron ve vazopressin gibi hormonlar membrana kanal eklenmesini arttırarak ve kanalların geri dönüşüm oranını azaltarak apikal membrandaki fonksiyonel ENaC miktarını arttırırlar [7, 146]. Kanallar, fosfoinositidler aracılığıyla epsine bağlanarak dakikalar içinde klatrin kaplı çukurlar aracılığıyla erken endozomlara giderler [147]. Aşırı eksprese edilmiş ENaC'lar, geri dönüşüm endozomlarında ve geç endozomlarda ayrı ayrı lokalize olurlar [148].

ENaC ubiquitinasyonu ve degradasyonu

Ubikitin, protein degradasyonunda görev alan bir polipeptiddir. Membrandaki proteinlerin hücre içine alınması ve proteazom olarak bilinen proteolitik kompleksler tarafından tanınması için bir etiket görevi görür [149]. Proteinlerin ubiquitasyonu genellikle iki ya da üç enzimin aracılık ettiği üç farklı enzimatik aktivite sayesinde meydana gelir. İlk olarak, ubikuitin aktive edici bir enzim (E1), ATP gerektiren bir reaksiyon ile yüksek enerjili bir tiyoester bağı (E1-S~ubiquitin) oluşturarak ubikitini aktive eder. Aktive olan ubikitin, ubikitin-konjuge edici enzime (E2) aktarılır ve ardından ubikuitin ligaz (E3) tarafından hedef proteinlere eklenir. Bir ubikitin molekülüne başka ubikitin moleküllerinin eklenmesiyle en az dört ya da beş ubikitinli bir zincir oluşturulması işlemine poliubikitinasyon adı verilir [149]. Hedef proteindeki çok sayıdaki lizine, her bir lizinde

tek bir molekül olacak şekilde ubiquitin eklenmesine ise monoubikitasyon denir. Membran proteinlerinin ubiquitinasyonu, bu proteinlerin hücre içine alınmasını sağlar. Ancak, hücre içinde proteinlerin izlediği degradatif yolak, ubiquitin ilavesi arasındaki farka bağlıdır. Poliubikitasyon proteinleri proteozomlara yönlendirirken monoubikitasyon ise lizozomal degradasyona yönlendirir [150].

ENaC alt birimlerinin ubiquitin konjugasyonu, bir E3 ubiquitin-protein ligaz olan Nedd4 (nöral öncü hücre tarafından eksprese edilen gelişimsel olarak downregüle edilmiş gen 4) aracılığıyla meydana gelir [141]. Nedd4'ün, Nedd4-1 ve Nedd4-2 olmak üzere iki izoformu vardır. Nedd4-2, tüm memeli epitel hücrelerinde ENaC ubiquitinasyonundan sorumlu olan izoformdur [151]. Nedd4-2, karboksil terminal bölgelerindeki korunmuş triptofan alanları (WW alanları) aracılığıyla ENaC proteinlerinin PY motiflerine (PPXY) bağlanır. Bu bağlanma, kanalın endositozu için membrandaki ENaC proteinlerinin birçok bölgesinden mono- veya poliubikitinlenmesine yol açar [7, 141]. Monoubikitinlenmiş ENaC'lar lizozomal degradasyon için hedeflenirler [152]. Poliubikitinlenmiş ENaC'lar ise aşırı miktarda sentezlenmiş ve apikal membrana asla ulaşamayan kanallardır ve proteozomal degradasyon için hedeflenirler. Ubikitasyon işlemi böylece membrandaki ENaC kanal miktarının azalmasına neden olur [7].

İnsan β ve γ ENaC genlerinde PY motiflerinin silinmesine yol açan genetik mutasyon, kalıtsal Liddle sendromuna yol açar. Liddle sendromu, Nedd4-2 tarafından hücre membranından ENaC kanallarının alınımının azalması ve buna bağlı olarak aşırı renal Na^+ emilimi ile karakterizedir [153]. α ENaC için Nedd4-2 ile ilişkili bir genetik mutasyon tanımlanmamıştır Nedd4-2 nakavt ($^{-/-}$) farelerde, tuza duyarlı hipertansiyon, hiperabsortif ve enflamatuvar kistik fibrozis fenotipi ve respiratuvar distres sendromu ortaya çıkmıştır [11]. Bu bulgular, Nedd4-2'nin ENaC aktivitesinin kontrolündeki önemini ve bu hastalık koşullarının patofizyolojisine katkısını göstermektedir.

2.6.3. ENaC aktivitesinin düzenlenmesinde görev yapan kinazlar

ENaC kanallarının aktivitesi hücre içinde bulunan çok sayıda kinaz arasındaki çapraz etkileşim aracılığıyla düzenlenir. Kinazlar, kanal alt birimlerini doğrudan fosforile ederek kanal açıklığını değiştirme yoluyla ya da Nedd4-2'yi fosforile ederek membrandaki ENaC

alt birimlerinin miktarını düzenleme yoluyla etki gösterirler. Bu tür mekanizmalar ENaC düzenlemesinde akut, subakut ve kronik değişikliklerle etkili olabilirler [7].

Serum glukokortikoid kinaz (SGK)

SGK tüm ökaryotlarda bulunan bir kinazdır. SGK1, SGK 2 ve SGK 3 olmak üzere üç izoformu bulunur. Tüm SGK izoformları ENaC aktivitesini artırır, ancak SGK1 ve SGK3, en güçlü uyarıcılardır [154]. Aldosteron ve glukokortikoid hormonları SGK1 ekspresyonunu artırır. Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) ve rapamisin sinyal kompleksi 2 (TORC2), SGK1'i fosforile ederek katalitik olarak aktive olmasını sağlar [155, 156]. İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1), PI3K ve TORC2 aktivitesini artırır ve böylece SGK1'in fosforilasyonunu ve aktivasyonunu uyarır [156, 157].

SGK1, α -ENaC'ı doğrudan fosforile ederek kanal aktivitesini uyarır [158]. Ayrıca, Nedd4-2'yi fosforile ederek, Nedd4-2'nin α , β ve γ ENaC alt birimlerine bağlanma afinitesini azaltır. Böylece dolaylı yoldan membrandaki ENaC miktarını artırır [159].

Protein kinaz A (PKA)

Protein kinaz A (PKA), hücre içinde adenilil siklaz aktivitesinin yükselmesine bağlı olarak miktarı artan cAMP tarafından aktive edilir. Bu aktivasyon, vazopressin ve adrenalinin sırasıyla böbrek ve akciğer epitel hücrelerindeki reseptörlere etkisiyle meydana gelir. Reseptör aracılı PKA aktivitesi, birkaç dakika içinde ENaC ve Na^+ taşınımı üzerinde etki eder [11]. PKA'nın ENaC üzerindeki bu hızlı etkisine SGK1 aracılık eder. cAMP, PKA ve PI3K aktivasyonu aracılığıyla SGK'yı artırır [160].

PKA, Nedd4-2'yi fosforile eder. Bu fosforilasyon, Nedd4-2'nin ENaC alt birimlerine bağlanmasını azaltarak apikal membrandaki kanal tutulmasını artırır [161]. PKA aktivasyonu ayrıca ENaC- α alt birimlerinin ekzositozunu ve apikal membrana translokasyonunu da uyararak membrandaki kanal miktarının artmasını sağlar [162].

PI3K ve PKB

PI3K ailesi, çeşitli hücrel işlevler sergileyen üç sınıftan oluşur. Sınıf I PI3K'lar, insülin ve IGF1 tarafından uyarılır ve serin/treonin protein kinaz B'yi (PKB) (Akt olarak da bilinir), PDK1'i ve SGK1'i aktive eder. Böylece, epitelyal dokularda Na⁺ transportunu arttırır [155].

PKB, SGK1'in fosforile ettiği bölgelere benzer bölgelerden ENaC alt birimlerini fosforile ederek kanalı aktive eder [161]. Benzer şekilde Nedd4-2'yi de fosforile ederek yüzeydeki ENaC proteinlerinin miktarını arttırabilir [163].

İkappa B kinaz-β (IKKβ)

Nükleer faktör kappa-B kinaz alt birim beta inhibitörü (IKKβ ya da IKK2), nükleer faktör kappa B inhibitörünü fosforile eden kinazdır. IKKβ, proenflamatuvar sitokin TNFα tarafından aktive edilir [164].

IKKβ, ENaC-β ile ilişkilidir ancak bu alt birimi doğrudan fosforile etmez. IKKβ aktivasyonu Nedd4-2'yi fosforile ederek β alt birimine bağlanmasını inhibe eder. Bu sayede membrandaki kanal miktarını ve fonksiyonunu arttırır [165].

Protein kinaz C (PKC)

PKC, hücre içi Ca²⁺, inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) ve G-protein eşlenik reseptör aracılı yollarla aktive edilir. PKC, β ve γ ENaC alt birimlerinin degradasyonunu ve hücre içi havuzdan γ ENaC kaybını arttırır [166]. Bu kinaz, ENaC'ı doğrudan fosforile etmez, bunun yerine ERK 1/2 sinyal yolağı ile etkileşime girer [167]. ERK1/2 hem kanal açıklığını azaltır hem de β ve γ alt birimlerini fosforile ederek ENaC'ın Nedd4-2 ile etkileşimi arttırır. Böylece hücrelerdeki Na⁺ transportunu azaltır [11].

Protein kinaz D

PKD, vazopressin ve aldosteron gibi çeşitli G-protein eşlenik reseptör agonistlerine yanıt olarak aktive edilir. PKD'nin PKD1, PKD2 ve PKD3 olmak üzere üç izoformu bulunur

[168]. PKD1'in aldosteron tarafından aktivasyonu sonucu apikal membrana ENaC- α ve - β alt birimlerinin eklenmesi uyarılarak epitelyal Na⁺ transportu artar [169].

ERK-1/2 ve MAPK

ERK1 ve ERK2, sırasıyla mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK) 3 ve 1 olarak da bilinirler. Bu kinazlar, epidermal büyüme faktörü (EGF), progesteron ve PKC tarafından aktive edilerek ENaC kanallarını düzenlerler [11].

ERK1/2'nin aktivasyonu, doğrudan ENaC- β ve - γ 'nın fosforilasyonunu arttırarak ENaC aktivitesini azaltır. ERK fosforilasyonu da Nedd4-2'nin ENaC alt birimlerine bağlanmasını arttırarak membrandaki ENaC miktarını azaltabilir [170].

CK1/2

Kazein kinaz 1 (CK1) aktivasyonu, ENaC'ın fonksiyonunu ve yüzey ekspresyonunu arttırır. CK1, ENaC alt birimlerini doğrudan fosforile etmez, ancak ENaC biyosentezinin miktarını ve/veya plazma membranına eklenmesini arttırarak dolaylı yoldan etki gösterir [171].

Kazein kinaz 2 (CK2), ENaC- β ve γ alt ünitelerini fosforile ederek doğrudan veya Nedd4-2'yi fosforile ederek dolaylı olarak kanal aktivitesinin ve membrandaki ENaC miktarının artmasına neden olur [172, 173].

GRK2

G-protein-eşlenik reseptör kinaz 2 (GRK2), ENaC- β 'nin doğrudan fosforilasyonu ve Nedd4-2'nin fosforilasyonu aracılığıyla Nedd4-2 ve ENaC arasındaki etkileşimini bozar. Böylece ENaC aktivitesinin uyarılmasına neden olarak hücre içi Na⁺ miktarını arttırır [173].

5'-AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK)

AMPK, besin (glikoz) veya oksijen miktarında (hipoksi) meydana gelen değişiklikler nedeniyle ortaya çıkan hücrel AMP: ATP oranının yükselmesi ile aktive olur. Ayrıca, hücre içi Ca^{+2} artışı, pro-enflamatuar sitokinler, iskemi ve diyet ile alınan Na^{+} gibi başka faktörler tarafından da aktive edilir [174]. Vasopressin, AMPK defosforilasyonuna neden olur [175].

AMPK'nın ENaC'ı inhibe ettiği ilk defa 2005 yılında *Xenopus* oositleri ve fare toplama kanalı hücrelerinde rapor edilmiştir [17]. Ancak, AMPK kanalı *in vitro* olarak fosforile etmediğinden ve AMPK ile ENaC arasında doğrudan bir etkileşim tespit edilmediğinden ENaC AMPK'nın direkt bir hedefi olarak görülmemiştir. Ayrıca, bir Liddle sendromu ENaC- β alt birimi mutanlığı AMPK aktivasyonuna yanıt vermemiştir. Bu mutanlık, Nedd4-2 tarafından düzenlenen endositoza duyarsız olduğundan, AMPK'nın ENaC'ı Nedd4-2 aracılığıyla inhibe ediyor olabileceği öne sürülmüştür [17]. AMPK'nın, plazma membranındaki ENaC miktarını azaltma yoluyla kanalı inhibe ettiği gözlemine dayanılarak tasarlanan sonraki çalışmada, Nedd4-2 mutanlığı *Xenopus* oositlerinde AMPK aktivasyonunun ENaC alt birimlerini direkt olarak fosforile ederek kanalı inhibe etmediği, bunun yerine Nedd4-2'nin fosforilasyonunu artırarak ENaC β alt birimi ile Nedd4-2 arasındaki etkileşimi arttırdığı kanıtlanmıştır [174]. AMPK'nın katalitik alt birimi olan $\alpha 1$ 'in, solunum yolları, böbrek ve kolon epitelinde de ENaC'ı inhibe ettiği ve AMPK $\alpha 1^{-/-}$ farelerde ENaC- β ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. AMPK'nın, bu hücrelerde de ENaC'ı inhibe etmek için Nedd4-2'yi kullandığı doğrulanmıştır [15]. AMPK- $\beta 1^{-/-}$ farelerde ENaC- β ekspresyonunun azaldığının bulunması AMPK etki mekanizmasının açıklanmasına destek sağlamıştır [176]. Sonraki çalışmalarda, AMPK aktivatörleri AICAR, resveratrol ve metforminin sırasıyla akciğer epitelyal hücrelerinde, böbrek toplama kanalı hücrelerinde ve umbilikal ven endotelyal hücrelerinde ENaC aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [16, 177, 178]. Benzer şekilde kistik fibrozis bronşiyal epitel hücrelerinde de çeşitli AMPK aktivatörlerinin doza bağımlı bir şekilde ENaC'ı inhibe ettiği belirlenmiştir [179]. Bu çalışmalarla, AMPK $\alpha 1$ 'in, elektrojenik Na^{+} emiliminin önemli bir fizyolojik düzenleyicisi olduğu ve epitelyal Na^{+} transportunu kontrol etmek için yeni bir farmakolojik hedef olabileceği kanıtlanmıştır.

2.6.4. Erkek fertilitesinde ENaC'ların rolü

Olgun fare spermlerinde ENaC α ve δ alt birimlerinin bulunduğu gösterilmesi ve kapasite olmamış fare spermleri amiloride etkin bırakıldığında, intraselüler Na^+ 'da bir azalma meydana gelmesi spermlerde ENaC'ların bulunduğu dair ilk bulgulardır [5]. Na^+ içermeyen medyuma bu katyonun eklenmesi, fare spermlerinde Em'nin hızla depolarize olmasına neden olmuş, amilorid ve amilorid analogu EIPA depolarizasyonu bloke etmiştir [80]. Bu bulgular, ENaC inhibisyonunun kapasitasyon ile ilişkili hiperpolarizasyona aracılık ediyor olabileceğini göstermiştir.

Rat testislerindeki germ hücrelerinin tüm evrelerinde (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler) ENaC- α 'nın sitoplazmik havuzlarda lokalize olduğu, yuvarlak spermatidler spermatozoaya dönüştükçe, ENaC lokalizasyonunun sitoplazmadan kuyruğa kaydığı belirlenmiştir. Epididimisten izole edilen spermlerde ise ENaC'ın, akrozomda ve kuyruğun orta parçasında bulunduğu gözlenmiştir [8]. Bu lokalizasyonlar, ENaC'ın akrozom reaksiyonu ve sperm motilitesinde de olası bir rol oynayabileceğini göstermiştir.

Bugüne kadar insan spermünde ENaC fonksiyonunu araştırmaya yönelik yalnızca üç çalışma yapılmıştır. İlk çalışmada, insan testisinde ENaC- δ alt ünitesinin bulunduğu bildirilmiştir [95]. Daha sonra, sperm kuyruğunun orta parçasında ENaC- α proteininin varlığı gösterilmiş, EIPA'nın, hem sağlıklı donörlere hem de astenozospermik hastalara ait spermlerde motiliteyi önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur [9]. Diğer çalışmada ise insan spermlerinde ilk kez ENaC- β ekspresyonu tanımlanmış ve amilorid ile inhibe edilmiş ENaC'ların sperm kapasitasyonu sırasında plazma membranının hiperpolarizasyonuna neden olarak membran potansiyelini düzenlediği bildirilmiştir [10].

ENaC aktivitesinin spermatogenez ve fertilité için zorunlu olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. α , β ve γ alt birimlerini kodlayan SCNN1A, SCNN1B veya SCNN1G genlerinin inaktivasyonu ile transgenik fareler üretilmiş, ancak bu fareler doğumdan birkaç gün sonra öldüğünden [180], gen-nakavt etkisinin bu farelerin doğurganlığı üzerindeki etkisini değerlendirmek mümkün olmamıştır.

2.7. AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz (AMPK)

AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), yapısal olarak bir katalitik α alt birimi ile β ve γ olmak üzere iki düzenleyici alt birimden oluşan serin/treonin heterotrimerik bir proteindir. AMPK'nın bu üç alt birimini kodlayan genler, omurgalılar, omurgasızlar, bitkiler, mantarlar ve protozoa dahil ökaryotik türlerde yüksek oranda korunmuştur [181, 182]. AMPK'nın aktivasyonu, α -alt ünitesinin treonin 172'den fosforilasyonu ile gerçekleşir. Somatik hücrelerde AMPK'yı Thr172'den fosforile edebilen kinazlar (a) karaciğer kinaz B1 (LKB1) [183], (b) Ca^{+2} /kalmodulin'e bağlı protein kinazlar olan CaMKK α ve CaMKK β [184] ve (c) dönüştürücü büyüme faktörü TGF- β -aktive kinaz-1'dir [185]. AMPK ayrıca fosfatazlar [protein kinaz fosfataz-1 ve 2A (PP2A ve PP2C)] ile de fosforile edilebilir [186, 187].

Hücrede enerji azaldığında AMP/ATP oranı artar ve buna bağlı olarak hem allosterik aktivasyon yoluyla hem de net fosforilasyonun artmasıyla AMPK aktivitesi uyarılır. Aktive olan AMPK, ATP üreten katabolik yolların uyarılmasına ve ATP tüketen anabolik yolların inhibisyonuna yol açar [188]. Böylece hücre içi ATP konsantrasyonlarını koruyarak hem tüm vücutta hem de hücrese düzeyde enerji homeostazisini düzenler [189, 190]. AMPK, egzersiz ve stres gibi patofizyolojik durumlarda aktive olabildiği gibi, metabolik hormonlar (leptin, adiponektin, ghrelin) veya farmakolojik moleküller [5-aminoimidazol-4-karboksamid-1- β -D-ribosid (AICAR), metformin ve tiyazolidinedionlar] tarafından da aktive edilebilir [191].

2.7.1. Erkek fertilitesinde AMPK'nın rolü

AMPK, testislerin somatik gonadal hücreleri (Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri) ile germinal hücrelerinde eksprese edilir ve gonadal eksen ile enerji dengesi arasında bağlantı kurarak üreme fonksiyonunda önemli bir rol oynar [12].

Somatik gonadal hücrelerin proliferasyonu ve steroidogeneizde AMPK'nın rolü

Testis büyüklüğü ve sperm üretimi, yetişkin Sertoli hücrelerinin toplam sayısı ile direkt olarak ilişkilidir. Folikül uyarıcı hormon (FSH), PI3K/Akt/mTORC1 yolağının katılımıyla Sertoli hücrelerinin proliferasyon ve sağkalım süreçlerini düzenler. Anormal AMPK-

mTOR sinyalleri, Sertoli hücre polaritesinde ve spermatogenezde bozulmaya neden olur [192]. Rat Sertoli hücrelerinde AMPK aktivasyonu, mTORC1 sinyalinde azalmaya ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CDKI) ekspresyonunda artışa neden olarak hücre proliferasyonunu engeller [193]. Gebelik sırasında AMPK metformin ile aktive edildiğinde, testislerin fetal ve neonatal büyüklüğünde azalma meydana gelir. Germ hücre sayısı değişmese de hem fetal hem de yenidoğan testlerinde metformin uygulaması ile Sertoli hücre sayısı azalır [194]. Isıl işlem AMPK sinyal yolağını inhibe ederek olgunlaşmamış domuz Sertoli hücrelerindeki sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu geri dönüşümlü olarak bozar [195]. AMPK aktivatörü AICAR'ın kullanımı, adhezyon molekülü ekspresyonunu arttırarak rat Sertoli hücrelerinde bağlantı kompleksi bütünlüğünü arttırır [196]. Fare Sertoli hücrelerinde $\alpha 1$ AMPK geninin silinmesi, ince başlı anormal spermatozoa ile ilişkili olarak erkek fertilitesinde düşüğe neden olur [197].

AMPK, hücrel enerji homeostazisini korumak ve aşırı steroid üretimini önlemek için gonadal steroidogenezi inhibe eden moleküler bir düzenleyicidir [198]. Erkek $\alpha 1$ AMPK^{-/-} farelerde, Leydig hücrelerinin hacmi artmıştır, endoplazmik retikulum alanları değişmiştir, intratestiküler kolesterol konsantrasyonu yüksektir ve steroid üretimine katılan proteinlerin ekspresyonu daha fazladır. Hiperaktif Leydig hücrelerine bağlı olarak bu hayvanlar yüksek miktarda testosteron içerirler [14]. İnsanlarda, AMPK inhibisyonuna bağlı olarak ortaya çıkan artmış steroid üretimi Peutz-Jeghers Sendromu (PJS) ile ilişkilendirilebilir. PJS, LKB1'i kodlayan serin/treonin kinaz 11 (STK11) genindeki mutasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkan otozomal dominant bir hastalıktır. PJS hastalarında, AMPK fosforilasyonunun azalmasına bağlı olarak östrojen ve testiküler aromataz ekspresyonu artmıştır [199].

Spermatogenezde ve sperm fizyolojisinde AMPK'nın rolü

Testislerde sperm üretiminin ve ejakülasyondan sonra dişi üreme sisteminden geçişleri sırasında karşılaştıkları çevresel değişiklikler karşısında sperm kalitesinin ve fonksiyonunun düzenlenebilmesi için enerji dengesi oldukça önemlidir. Hücrenin enerji düzeyini ve redoks durumunu algılayan mekanizmalar arasında, metabolik yolları aktivite durumuna göre kontrol eden AMPK vardır [200]. AMPK, hipotalamus-hipofiz-gonadal eksenin enerji dengesi ile bağlayarak üreme fonksiyonunda önemli bir rol oynar

[12]. Ancak, AMPK'nın erkek fertilitésinin kontrolündeki rolüne odaklanan çalışmalar az sayıdadır.

Spermlerde, AMPK proteini ilk defa 2012 yılında domuzlarda tanımlanmıştır [201]. Daha sonra, fare [14, 202], aygır [203] ve tavuk [204] gibi diğer hayvan türlerine ait spermlerde de AMPK ekspresyonu gösterilmiştir. AMPK proteininin insan spermlerinde bulunduğunu gösteren ilk çalışma ise 2017 yılında yapılmıştır [200]. AMPK'nın spermlerde özellikle akrozomda olmak üzere baş bölgesinde ve kuyruğun orta parçasında lokalize olduğu gösterilmiştir [205].

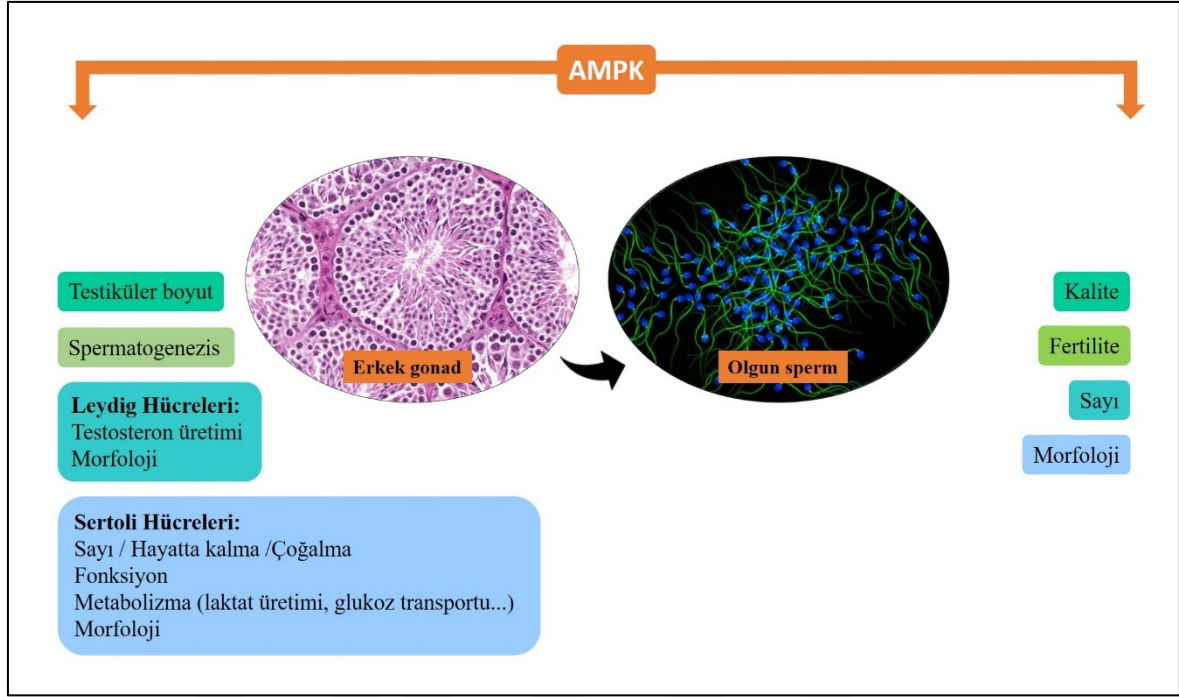
Spermler dişi üreme kanalından geçerken farklı çevresel koşullarla karşılaştıklarından sperm işlevinin düzenlenmesi için optimal düzeyde bir AMPK aktivasyonu seviyesi gereklidir. Yaban domuzunda AMPK'nın farmakolojik inhibisyonu ya da uzun süreli (24 saat) aktivasyonu, motiliteyi azaltır, akrozomal membran bütünlüğünü, organizasyonunu ve lipid düzensizliğinde artışa bağlı olarak plazma membranı akışkanlığını bozar [205-207]. AMPK aktivitesi insanlarda sperm motilitesini arttırmak için gereklidir. Yüksek hareketliliğe sahip normal spermlerde aktif AMPK miktarı yüksek iken, daha az hareketli veya hareketsiz spermlerde belirgin şekilde düşüktür. AMPK farmakolojik olarak inhibe edildiğinde ise sperm ileri hareketliliğinde belirgin bir azalma meydana gelir [200].

AMPK ile ilişkili bir kinaz olan tümör baskılayıcı LKB1 izoformu, memelilerde haploid spermatidlerde ekprese edilir ve spermiyogenez ve fertilizasyon yeteneğinde önemli bir rol oynar. LKB1 nakavt farelerin epididimisinde olgun sperm sayısı anlamlı şekilde azdır, üretilen birkaç sperm de hareketli değildir ve steril farelere neden olan anormal baş morfolojisine sahiptir [208].

AMPK, spermlerde mitokondriyal membran potansiyelinin korunmasına katkıda bulunur [205]. α 1AMPK nakavt farelerin spermlerinde mitokondriyal membran potansiyeli, mitokondri sayısı ve bazal oksijen tüketimi belirgin şekilde azalmıştır [14]. AMPK aktivatörü resveratrol, insan spermlerinin dondurma-çözme sonrası mitokondriyal membran potansiyelini önemli ölçüde artırır [209]. Taze fare spermlerinde metformin, konsantrasyona bağlı olarak mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına neden olur [12]. Dolayısıyla, sperm mitokondriyal membran potansiyelini korumak için optimum düzeyde AMPK aktivitesi gereklidir [207].

Sperm işlevlerine katkıda bulunan önemli faktörlerden biri de plazma membranının lipid organizasyon derecesidir. AMPK, yaban domuzu ve keçi gibi bazı türlerde sperm plazma membranının akışkanlığının ve lipid organizasyonunun korunmasında rol oynar [205, 210]. Bu hayvanların spermelerinde AMPK inhibitörü bileşik C (CC) veya aktivatörü A769662'yi kullanıldığında plazma membranı lipid düzensizliği önemli ölçüde artar [207]. AMPK'nın bu etkisi hücre dışı uyarıcılara bağlıdır. Yaban domuzu spermeleri kapasite edici uyarılarla (Ca^{+2} , bikarbonat ve serum albümin) inkübe edildiğinde plazma membranı organizasyon bozukluğu artar [205].

Kapasitasyon sırasında meydana gelen değişikliklerde spermin enerji düzeyi önemlidir [211]. AMPK aktivitesinin inhibisyonu, yaban domuzlarında kapasite edici koşullar altında akrozomal membran bütünlüğünü önemli ölçüde azaltırken, uyarıcı içermeyen ortamda etkisi göstermez. Bununla birlikte, kapasite olmuş domuz spermelerinde AMPK inhibisyonu kalsiyum iyonofor A23187 tarafından indüklenen akrozom reaksiyonunu etkilemez [205]. Benzer şekilde fare spermelerinde metformin ile aktive edilen AMPK, akrozom reaksiyonuna etki etmez [212]. AMPK aktivatörü A769662, insanda akrozomal membran bütünlüğünde ölçülebilir bir etkiye sahip değildir [213]. Ancak, A769662'nin domuz spermelerinde, 24 saat boyunca devam eden bir AMPK aktivitesinden sonra dış akrozomal membran bütünlüğü önemli ölçüde azaldığı için AMPK'nın etkisinin stimülasyon süresine bağlı olduğu düşünülebilir [214]. Memelilerin aksine, kuş sperminde yapılan az sayıda çalışma, AMPK aktivitesinin akrozom reaksiyonunda görev aldığını göstermektedir [204, 215]. Memelilerle kuş spermeleri arasındaki bu farklılıklar, AMPK'nın akrozom reaksiyonundaki fonksiyonel rolü hakkında daha fazla araştırma yapılmasının önemini vurgulamaktadır. Erkek gonadlarda ve olgun sperm üretiminde AMPK'nın işlevleri Şekil 2.2'de özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Erkek gonadlarda ve olgun sperm üretiminde AMPK'nın işlevleri (Kaynak [209]'dan modifiye edilmiştir)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneyde Kullanılan Medyumlar

Medyum hazırlamada kullanılan kimyasallar sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür (CaCl₂), magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO₄.7H₂O), monopotasyum fosfat (KH₂PO₄), D-Glukoz, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit (HEPES), sodyum laktat, sodyum pirüvat, sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve bovine serum albumin (BSA) Merck Millipore'dan satın alındı.

Kapasitasyon koşullarının kontrolü olarak, 10 mM HEPES ve 3 mg/ml BSA eklenmiş Biggers-Whitten Whittingham (BWW) medyum (95 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.7 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 20 mM sodyum laktat, 5 mM glukoz, 0.25 mM sodyum pirüvat ve 25 mM NaHCO₃, pH 7.4) kullanıldı [216]. Bu medyuma "kapasitatif medyum" (CM) adı verildi. BSA ve NaHCO₃ içermeyen, daha düşük CaCl₂ (0.2 mM) ve daha yüksek NaCl (120 mM) konsantrasyonuna sahip BWW medyum ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Bu medyum "non-kapasitatif medyum" (NCM) olarak adlandırıldı. NCM ve CM medyumlarına final konsantrasyonu 2 mM olan 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) (sc-200659, Santa Cruz Biotechnology) eklenmesiyle elde edilen medyumlara ise non-kapasitatif medyum-AICAR (NCM-A) ve kapasitatif medyum-AICAR (CM-A) adı verildi.

3.2. Semen Örneklerinin Toplanması

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 24.09.2018 tarihli 679 numaralı kararıyla yürütüldü. Çalışmaya, Temmuz 2019-Ağustos 2019 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfertilite ve Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran, yaşları 19 ile 38 arasında değişen, fertilite bakımından sağlıklı 30 erkek hasta dahil edildi. Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle kliniğe gelen hastalardan, hastanın adının, soyadının yazılı olduğu steril kaplara, mastürbasyon yöntemi ile alındı. Örnekler, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilerek likefiye edildi. Spermiyogram ile sperm sayıları ve motiliteleri analiz edildi. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2010 yılında yayımladığı semen değerlendirme kriterlerine göre sperm konsantrasyonu 15x10⁶/ml ve üzeri, toplam sperm

motilitesi %40 ve üzeri olan örnekler normozoospermik kabul edildi. Kriterleri sağlayan hastalara çalışma hakkında sözlü bilgi verildikten sonra, bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılarak sözlü ve yazılı onamları alındı.

3.3. Spermilerin Saflaştırılması

Gönüllülerden alınan semen örnekleri laboratuvara getirilerek deney tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 1:1 oranında NCM medyum eklendi. Nazıkçe pipetlenerek homojen şekilde karışması sağlanan örnekler 1300 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 1 ml NCM eklenerek 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek tekrar yıkandı. Motil sperm, yüzdürme tekniği kullanılarak saflaştırıldı. Bunun için ikinci yıkama sonrasında elde edilen pellet üzerine 2 ml NCM eklendi, tüp 45° açıyla spora yerleştirdi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpün üst kısmından motil sperm içeren 1 ml medyum dikkatlice alınarak temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı.

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Yüzdürme tekniğiyle izole edilmiş sperm 4 alikota ayrılarak etiketlendi. Alikotlar 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra pelletler üzerine 1 ml NCM, NCM-A, CM ve CM-A medyumları eklendi. Pipetlenerek süspansiyon haline getirilen örnekler, 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda sperm 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve pellet 600 µl fosfat buffer salin (PBS) (15-M107, Bio-optica) içinde süspanse edildi.

3.5. Sperm Motilitesinin Değerlendirilmesi

Sperm motilitesini belirlemek için DSÖ tarafından belirlenmiş standart manuel teknikler kullanıldı. Makler sayım kamarasına (Counting Chamber Makler) PBS içindeki sperm örneğinden 10 µl koyularak ışık mikroskopunda (Olympus Japan BH-2) x20 objektif büyütmesinde sperm motilitesi değerlendirildi. Sperm motilite bakımından, ileri hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz olmak üzere üç ayrı motilite kategorisine göre gruplandırıldı ve toplam motilite % cinsinden hesaplandı. Medyumların ve AMPK aktivatörünün motiliteye etkisinin değerlendirilmesinde % ileri hareketlilik dikkate alındı.

3.6. ELISA Yöntemi ile AMPK Aktivitesi ve ENaC- β Miktarının Belirlenmesi

Makler sayım kamarası ile yapılan hücre sayımının ardından 100 μ l sperm örneği alınarak konsantrasyon 10^6 sperm/ml olacak şekilde ayarlandı. Hücreler 3 defa dondurma-çözme işlemi yapılarak parçalandı. 1500xg'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak ELISA analizlerinde kullanıldı.

Örneklerdeki p-AMPK α -1/2 (201-12-6865, Shanghai Sunred Biological Technology) ve ENaC β (201-12-6084, Shanghai Sunred Biological Technology) konsantrasyonlarını belirlemek için ticari ELISA kitleri kullanıldı. 96 kuyucuklu plakanın ilk kuyucuğuna örnek eklenmeyerek kör olarak kullanıldı. Sonraki 5 kuyucuğa 50 μ l kit içerisindeki hazır olarak verilmiş standart solüsyonunun dilüe edilmesiyle hazırlanmış artan konsantrasyonlardaki standart solüsyonu, sonraki kuyucuklara ise 40 μ l sperm örneği konuldu. Standart kuyucuklarına streptavidin-HRP, örnek kuyucuklarına ise streptavidin-HRP ve pAMPK α 1/2 veya ENaC β antikoru eklendi. Plaka 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile yıkanan kuyucuklara kromojen A ve kromojen B solüsyonları eklenerek oda sıcaklığında 10 dk karanlıkta inkübe edildi. Durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve ELISA plaka okuyucuda (BioTek Snergy H1) 450 nm dalga boyunda optik dansite (OD) değerleri ölçüldü. İki kez yinelenen deneylerde, standart konsantrasyonları ve ilgili OD değerlerine göre standart eğrisi çizilerek doğrusal regresyon denklemi hesaplandı. Sperm örneklerinden alınan OD değerlerine bu denklem uygulanarak örneklerdeki pAMPK α 1/2 ve ENaC β konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı.

3.7. Flow Sitometri Yöntemi ile Sperm Analizi

Medyumlarda inkübasyonun ardından santrifüj edilerek PBS içinde yeniden süspansiyon edilen taze sperm örneklerinin canlılığını, hücre içi sodyum miktarını, plazma membran potansiyelini, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu değerlendirmek üzere flow sitometri yöntemi kullanıldı.

3.7.1. Sperm canlılığının ve hücre içi sodyum miktarının ölçülmesi

Hücre içi sodyum miktarını belirlemek için, CoroNa yeşil boyası (C36676, ThermoFisher Scientific) kullanıldı. Boyanın, hücre membranından difüze olduktan sonra hücre içi

esterezlar yardımıyla sodyuma duyarlı forma dönüşme ve bu sayede hücre içi sodyuma bağlanma özelliğinden yararlanıldı. PBS içinde süspansiyon edilmiş 100 µl sperm örneği üzerine 10 µM final konsantrasyonda CoraNa yeşil boyası eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından ölü hücrelerin ayırt edilmesini sağlayan propidyum iyodür (PI) (421301, Biolegend) boyasından 5 µl eklenerek 3 dakika daha inkübe edildi. Örnekler, BD Accuri C6 Plus Flow Sitometre (Becton Dickinson, Piscataway, NJ) cihazında analiz edildi. Her bir örnekte 10.000 sperm değerlendirilerek floresan izotiyosiyanat (FITC) (533/30 nm) filtresinde (FL1 kanalı) ve PI (585/40 nm) filtresinde (FL2 kanalı) toplanan floresan analiz edildi. Canlı spermelerin floresanı, her bir histogramda PI-pozitif ölü hücrelerin arka plan floresanının çıkarılmasıyla belirlendi ve CoraNa yeşili-pozitif canlı hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu ölçüldü.

3.7.2. Plazma membran potansiyelinin ölçülmesi

Spermelerin plazma membran potansiyelindeki değişiklikleri ölçmek için, hiperpolarize membranlarda biriken katyonik bir boya olan 3,3'-Dipropiltiadikarbosiyanin iyodid [DISC₃(5)] boyası (D306, Molecular Probes) kullanıldı. 100 µl sperm örneği üzerine final konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde boya eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 5 µl PI eklendi ve 3 dakika daha inkübe edildi. Boyanmış örnekler, BD Accuri C6 Plus Flow Sitometre (Becton Dickinson, Piscataway, NJ) cihazında analiz edildi. PI ile boyanmış ölü hücreler dışlandı ve böylece DISC₃(5) floresanı yalnızca canlı hücrelerde değerlendirildi. Her bir örnekte incelen 10,000 sperm arasından PI-negatif / DiSC3(5) pozitif hücreler allofitosiyanin (APC) (675/25 nm) filtresi (FL4 kanalı) ve PI (585/40 nm) filtresi (FL2 kanalı) kullanılarak belirlendi. Hücrelerden yayılan floresan analiz edilerek DISC₃(5)-pozitif canlı hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu ölçüldü.

3.7.3. Kapasitasyonun ölçülmesi

Kapasitasyon sırasında meydana gelen en önemli olaylardan biri sperm proteinlerinin tirozin fosforilasyonundaki artıştır. Bu nedenle sperm tirozin fosforilasyonda meydana gelen değişim, hücrelerdeki fosforile olmuş tirozin bölgelerini tanıyan, fikoeritrin (PE) ile konjuge edilmiş anti-fosfotirozin monoklonal antikoru (klon PY-20) (309310, Biolegend) kullanılarak değerlendirildi. Sperm PBS içinde hazırlanmış %2'lik paraformaldehit (sc-

281692, Santa Cruz Biotechnology) ile 10 dk fikse edildi. Fiksasyonun ardından santrifüjle yıkandı ve PBS içinde hazırlanmış % 0.5'lik Triton x100 (T8787, Sigma-Aldrich) ile 10 dk boyunca permeabilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Hücreler PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra 2 µg/ml final konsantrasyonda PY-20 antikoru eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Antikor ile işaretlenmiş örnekler, BD Accuri C6 Plus Flow Sitometre (Becton Dickinson, Piscataway, NJ) cihazında analiz edildi. Her bir örnekte 10.000 spermden yayılan floresan PE (585/40 nm) filtresi (FL2 kanalı) kullanılarak ölçüldü. Histogramlar analiz edilerek PY-20-pozitif hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu belirlendi.

3.7.4. Akrozom reaksiyonunun ölçülmesi

Akrozom reaksiyonunu değerlendirmek için, spermin iç akrozomal membranında bulunan membran kofaktör proteininin (CD46) miktarı ölçüldü. Bunun için PE ile konjuge edilmiş anti-CD46 monoklonal antikoru (352402, Biolegend) kullanıldı. Spermeler PBS içinde hazırlanmış %2'lik paraformaldehit ile 10 dk fikse edildi. PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra 5 µl anti-CD46 antikoru eklenerek 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Her bir örnekte 10.000 sperm sayılarak elde edilen veriler, BD Accuri C6 Plus Flow Sitometre (Becton Dickinson, Piscataway, NJ) cihazında analiz edildi. CD46-pozitif hücrelerin floresanı PE filtresinde (585/40 nm) (FL2 kanalı) ölçüldü ve histogramların analiziyle hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu belirlendi.

3.8. İmmunofloresan Yöntemi ile ENaC-β ve CD46 Ekspresyonunun Belirlenmesi

Sperm örneklerindeki ENaC-β ve Nedd4-2 ekspresyonu indirekt immunofluoresan yöntemi kullanılarak incelendi. PBS içindeki sperm süspansiyonları lamlara sürülerek yaymalar hazırlandı. Havada kurutulan lamlar, %4'lük paraformaldehit içinde 10 dakika boyunca fikse edildi. Fikse edilmiş örnekler +4°C'de saklandı. Yaymalar, PBS ile üç kez yıkandı ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca %0,1'lik TritonX-100 içinde permeabilize edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika %10'luk normal keçi serumu (ab7481, Abcam) ile spesifik olmayan antijenlerin bloklanması ardından hücreler gece boyunca +4°C'de tavşan poliklonal anti-ENaC-β (bs-4252R, Bioss Antibodies) (1:50) ve fare monoklonal anti-CD46 (sc-166159, Santa Cruz Biotechnology) (1:50) primer antikoları ile inkübe edildi. Üç kez PBS ile yıkamanın ardından oda sıcaklığında 1 saat süreyle Alexa Fluor 594 ile işaretlenmiş keçi anti-tavşan-IgG sekonder antikoru (111-585-003, Jackson Immuno Research) ve

Alexa Fluor 488 ile işaretlenmiş keçi anti-fare-IgG sekonder antikoru (115-545-003, Jackson Immuno Research) ile inkübe edildi. Lamlar, çekirdek boyası olan DAPI'yi içeren floresan kapatma medyumunu (1214-20, BioVision) ile kapatıldı ve görüntülenmeden önce karanlık ortamda +4°C'de saklandı. Floresan mikroskop (DM 4000 Leica görüntülü analiz sistemleri, Germany) ile en az 200 sperm rastgele fotoğraflandı. Hücrelerdeki CD46 lokalizasyonları incelenerek akrozom reaksiyonunu tamamlamış hücreler sayıldı. ENaC- β 'ya ait floresan ışımalar ImageJ programı (versiyon 1.52, National Institutes of Health) değerlendirildi.

3.9. İstatistiksel Analiz

Kontrol gruplarının (NMC ve CM) birbirleri arasındaki ve kontrol grupları ile AICAR uygulanmış gruplar (NCM-A ve CM-A) arasındaki farklılıklar Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc., London, UK) programı kullanılarak analiz edildi. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile verilerin dağılımı değerlendirildi. Normal dağılıma sahip olan veriler t-testi ile, normal dağılıma sahip olmayan veriler ise Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Değişkenleri tanımlamak için ortalama \pm standart sapma (\pm SS) değerleri kullanıldı. İstatistiksel kararlarda $p < 0.05$ ve $p < 0.001$ değerleri anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi. İstatistiksel verilere ilişkin grafikler GraphPad Prism 7 programı kullanılarak oluşturuldu.

4. BULGULAR

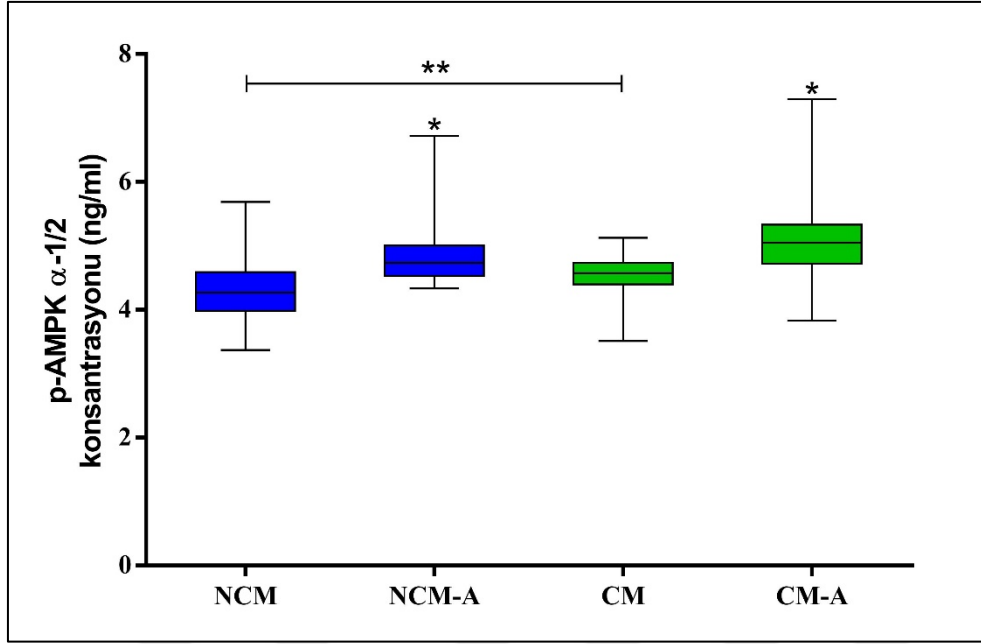
4.1. ELISA Bulguları

4.1.1. AMPK aktivitesi bulguları

CM medyumda inkübe edilen hücrelerdeki aktif AMPK (p-AMPK α -1/2) konsantrasyonunun NCM medyumda inkübe edilen hücrelere göre daha yüksek olduğu bulundu ($p < 0.05$). NCM-A ve CM-A medyumlardaki AICAR'ın, NCM ve CM medyumlara kıyasla spermlerdeki aktif AMPK miktarında anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı ($p < 0.001$). Spermlerdeki aktif AMPK yüzdelerinde ait istatistiksel veriler Çizelge 4.1'de özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.1'de yapıldı.

Çizelge 4.1. p-AMPK α -1/2 konsantrasyonlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

p-AMPK α -1/2 konsantrasyonu (ng/ml)	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	3,373	5,688	4,267	4,350	0,514	0,094
	NCM-A	4,335	6,721	4,773	4,859	0,520	0,095
	CM	3,514	5,127	4,572	4,517	0,377	0,069
	CM-A	3,833	7,297	5,050	5,164	0,753	0,137



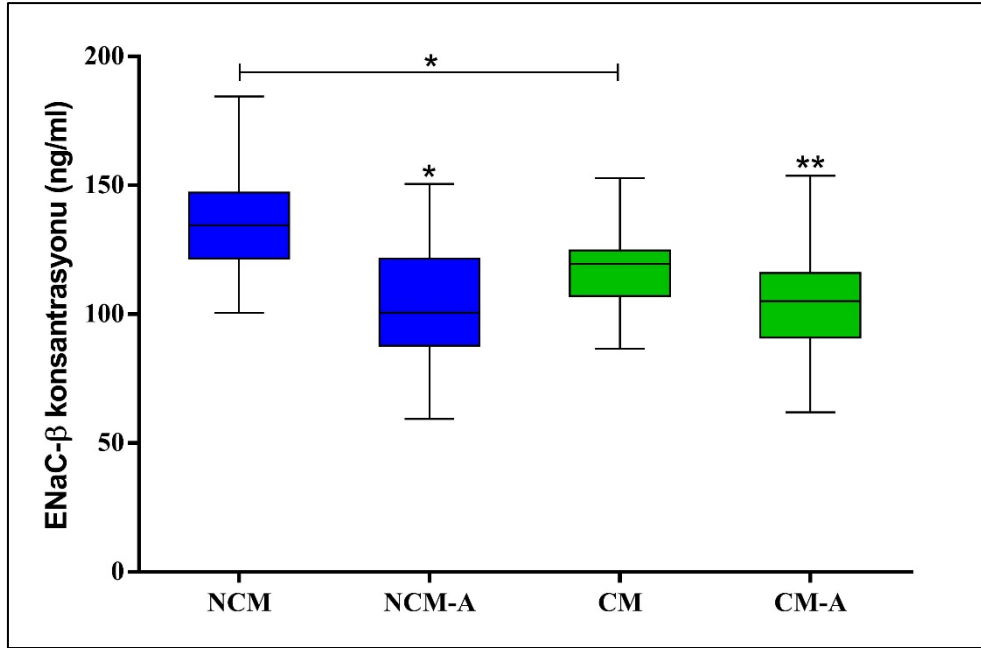
Şekil 4.1. Deney grupları arasında AMPK aktivitesinin karşılaştırılması (* $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, $n = 30$)

4.1.2. ENaC- β miktarı bulguları

NCM medyumda inkübe edilen spermelerin içerdiği ENaC- β miktarının CM medyumda inkübe edilenlerden daha yüksek olduğu bulundu ($p < 0.001$). NCM-A medyumda inkübasyonun spermelerdeki ENaC- β konsantrasyonunda NCM medyuma göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu saptandı ($p < 0.001$). Benzer şekilde CM-A medyumda inkübe edilen hücrelerde CM medyumda inkübe edilenlere kıyasla ENaC- β konsantrasyonunun daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$). ENaC- β konsantrasyonlarına ait istatistiksel veriler Çizelge 4.2’de özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.2’te yapıldı.

Çizelge 4.2. ENaC- β konsantrasyonlarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

ENaC- β konsantrasyonu (ng/ml)	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	100,592	184,512	134,512	135,629	19,270	3,518
	NCM-A	59,392	150,592	100,552	103,760	21,681	3,958
	CM	86,672	152,832	119,512	117,583	16,781	3,064
	CM-A	61,952	153,712	105,072	103,283	19,656	3,589



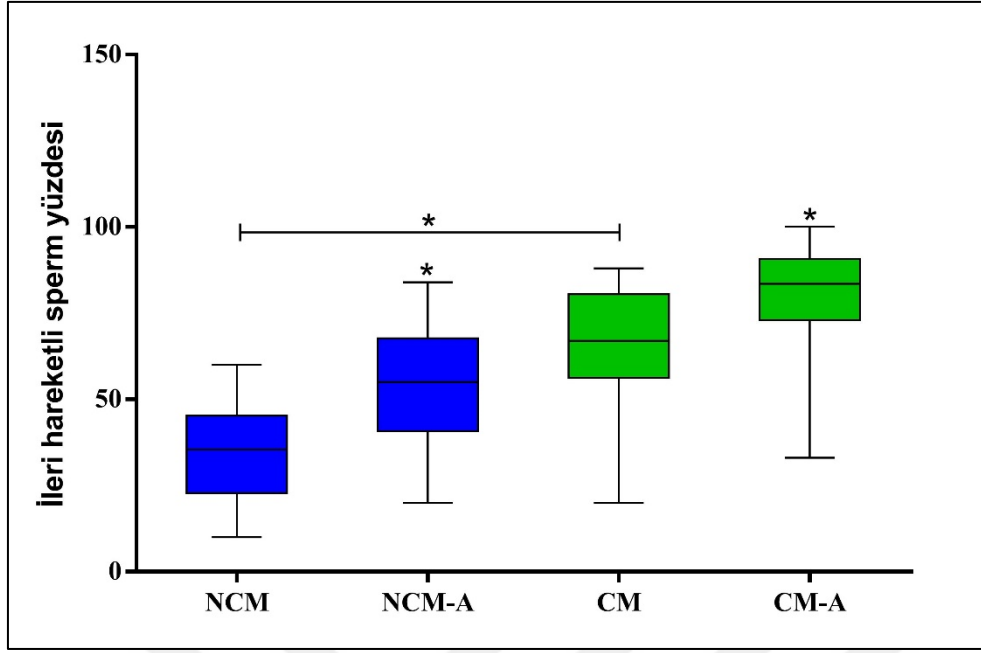
Şekil 4.2. Deney grupları arasında ENaC- β konsantrasyonlarının karşılaştırılması (* $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, $n = 30$)

4.2. Motilite Bulguları

CM medyumda inkübe edilen örneklerdeki ileri hareketli sperm yüzdesi NCM medyumda inkübe edilenlerden belirgin olarak yüksekti ($p < 0.001$). AICAR eklenmiş NCM-A ve CM-A gruplarına ait örneklerdeki ileri hareketli sperm sayısında NCM ve CM gruplarına kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0.001$). İleri hareketli sperm yüzdelerinde ait istatistiksel veriler Çizelge 4.3'te özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.3'te yapıldı.

Çizelge 4.3. İleri hareketli sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

İleri hareketli sperm yüzdesi	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	10	60	35,5	34,639	14,002	2,556
	NCM-A	20	84	55	54,650	16,918	3,089
	CM	20	88	67	65,086	18,022	3,290
	CM-A	33	100	83,7	79,983	15,904	2,904



Şekil 4.3. Deney grupları arasında ileri hareketli sperm yüzdelерinin karşılaştırılması (* $p < 0.001$, $n = 30$)

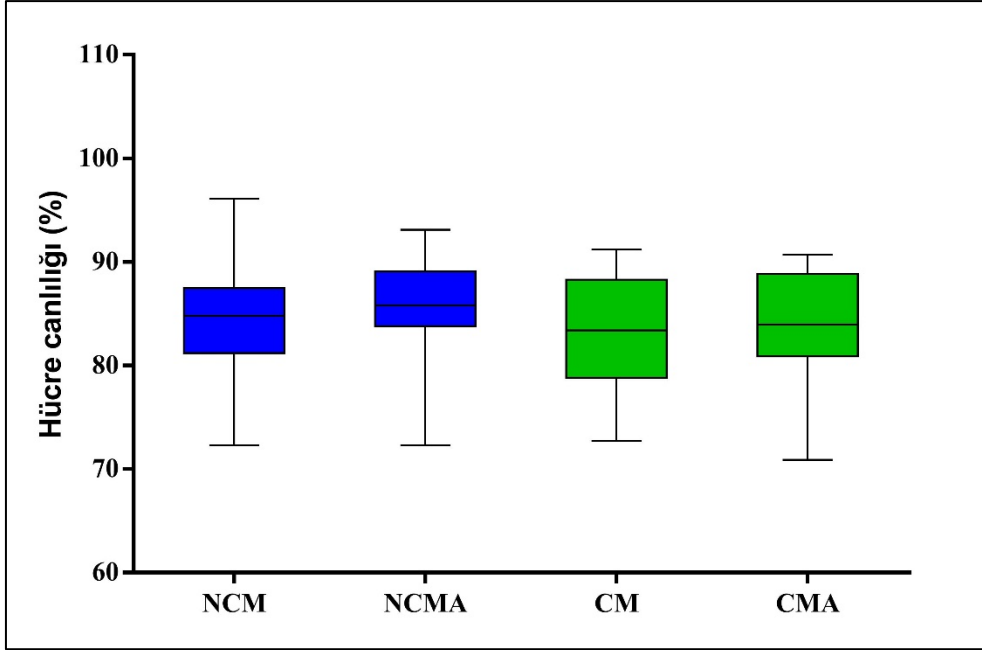
4.3. Flow Sitometri Bulguları

4.3.1. Sperm canlılığı bulguları

AMPK aktivasyonunun sperm canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere hücreler PI ile boyanarak flow sitometri yöntemiyle analiz edildi. NCM-A ve CM-A medyumlarıdaki AICAR uygulamasının örneklerdeki canlı sperm yüzdesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı bulundu (sırasıyla $p = 0,469$ ve $p = 0,762$). Sperm canlılığına ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 4.4'te özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.4'te yapıldı.

Çizelge 4.4. Sperm canlılığına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

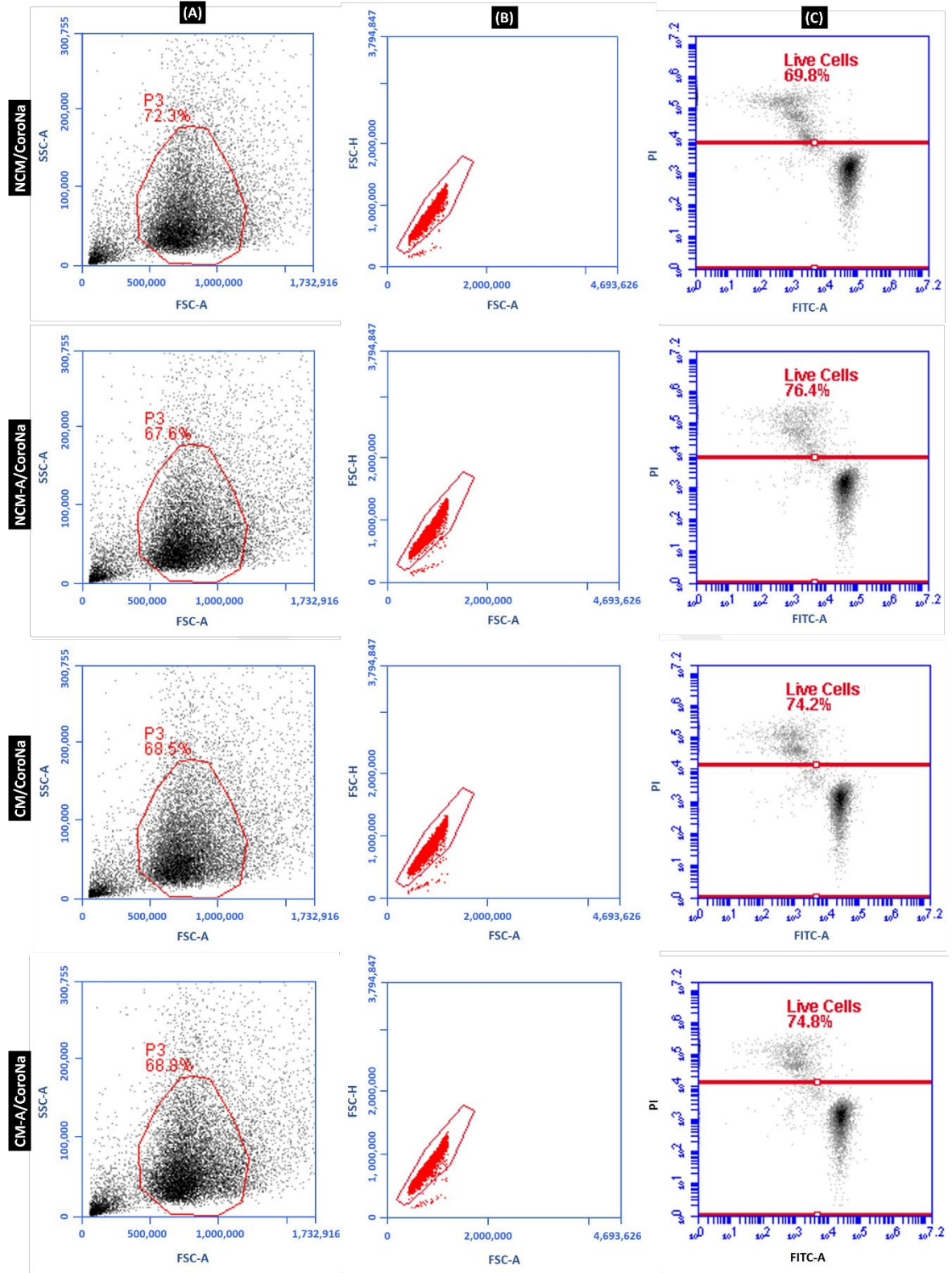
Hücre canlılığı	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	72,3	96,1	84,8	84,500	5,895	1,076
	NCM-A	72,3	93,1	85,8	85,470	5,072	0,926
	CM	72,7	91,2	83,4	83,013	5,818	1,062
	CM-A	70,9	90,7	83,95	83,587	5,525	1,009



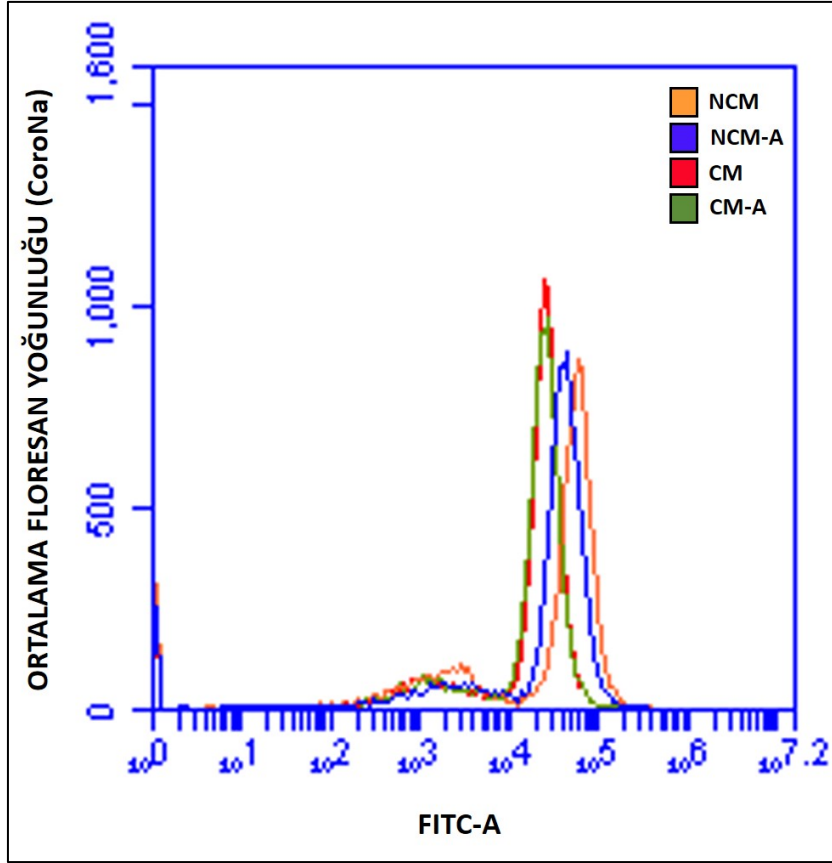
Şekil 4.4. Deney grupları arasında sperm canlılık oranlarının karşılaştırılması ($n = 30$)

4.3.2. Hücre içi Na^+ konsantrasyonu bulguları

Spermlerdeki hücre içi Na^+ konsantrasyonlarını analiz etmek için CoroNa yeşil boyası kullanıldı. Değerlendirmenin yalnızca canlı hücrelerde yapılabilmesi amacıyla boyama PI ile birlikte yapılarak ortalama floresan yoğunlukları ölçüldü. CM medyumda inkübe edilmiş canlı spermelerde, NCM medyuma inkübe edilenlere kıyasla hücre içi Na^+ miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi ($p < 0.001$). AICAR ile inkübasyonun ardından ise hem NCM-A medyumda hem de CM-A medyumda inkübe edilen canlı spermelerde hücre içi Na^+ konsantrasyonunun belirgin bir şekilde azaldığı saptandı ($p < 0.05$). CoroNa yeşil / PI analizlerine ilişkin flow sitometri grafikleri ve histogramları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verildi. İstatistiksel tanımlayıcı veriler Çizelge 4.5'te özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.7'de yapıldı.



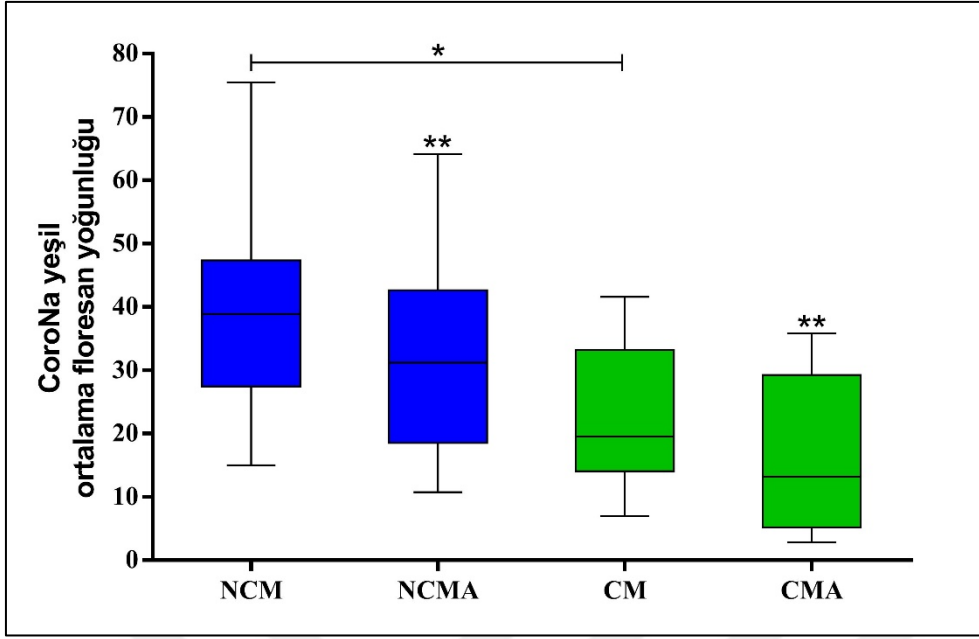
Şekil 4.5. CoroNa yeşil boyamaya ait örnek flow sitometri analizleri (A) Spermilerin büyüklük ve granülaritesine göre dağılımlarını gösteren nokta alan grafikleri, (B) Tek hücrelerin seçilerek analiz edildiğini gösteren nokta alan grafikleri, (C) CoroNa yeşil / PI floresan yoğunluklarını gösteren nokta alan grafikleri



Şekil 4.6. CoroNa yeşil floresan yoğunluklarını gösteren birleştirilmiş histogramlar

Çizelge 4.5. CoroNa yeşil floresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

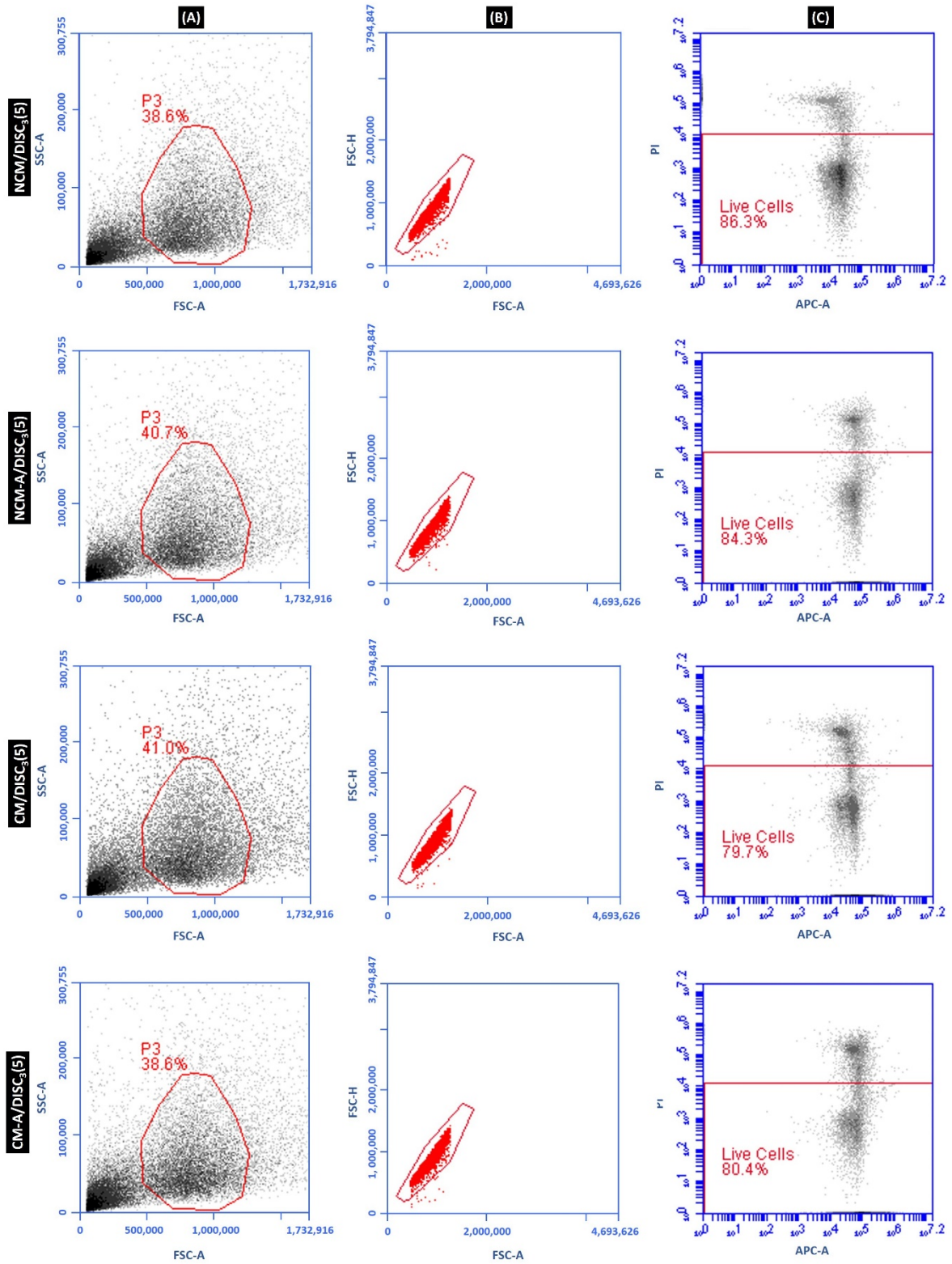
CoroNa yeşil ortalama floresan yoğunluğu	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	15,036	75,480	38,886	39,791	15,830	3,046
	NCM-A	10,768	64,147	31,196	31,284	13,924	2,680
	CM	6,923	41,588	19,547	22,810	10,781	2,201
	CM-A	2,849	35,827	13,205	16,573	11,708	2,390



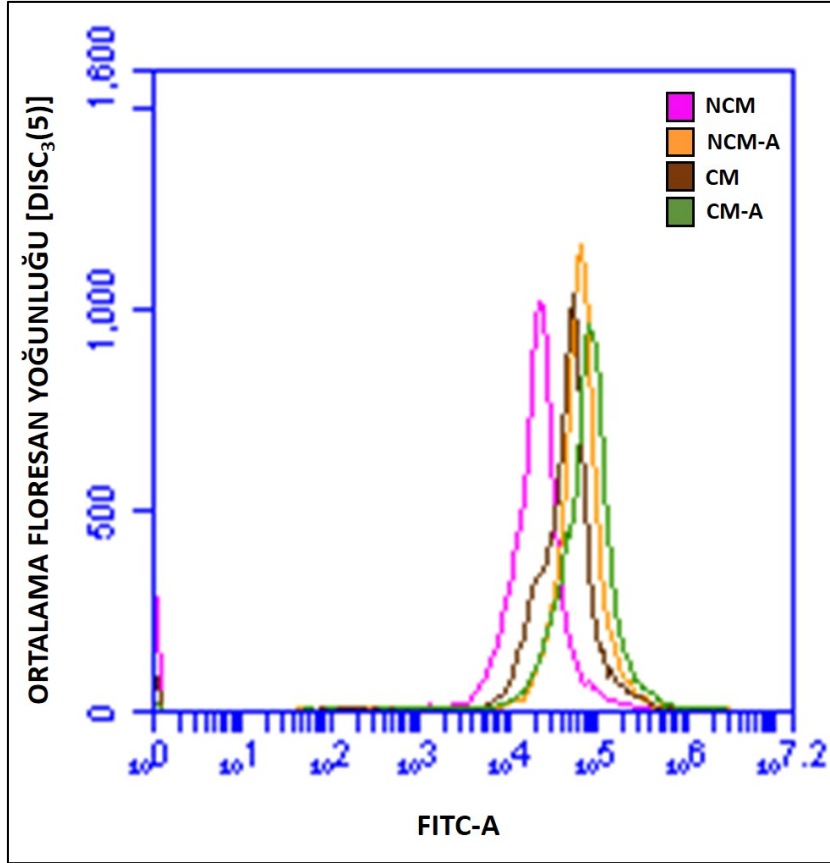
Şekil 4.7. Deney grupları arasında CoroNa yeşil floresan yoğunluklarının karşılaştırılması (* $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, $n = 30$)

4.3.3. Plazma membran potansiyeli bulguları

Spermilerin plazma membran potansiyelindeki değişiklikleri ölçmek için DISC₃(5) boyası kullanıldı. Spermiler aynı zamanda PI boyası ile de işaretlenerek değerlendirmenin yalnızca canlı hücrelerde yapılması sağlandı. Hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu ölçüldü. Spermiler CM medyumda inkübe edildiklerinde plazma membranının hiperpolarizasyonunun, NCM medyumda inkübe edilmiş spermierinkine göre belirgin olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$). AICAR eklenmiş NCM-A ve CM-A medyumlarının, spermilerin hiperpolarizasyonunda kontrollere göre anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı ($p < 0.05$). DISC₃(5) floresan analizlerine ilişkin flow sitometri grafikleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verildi. İstatistiksel tanımlayıcı veriler Çizelge 4.6'da özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.10'da yapıldı.



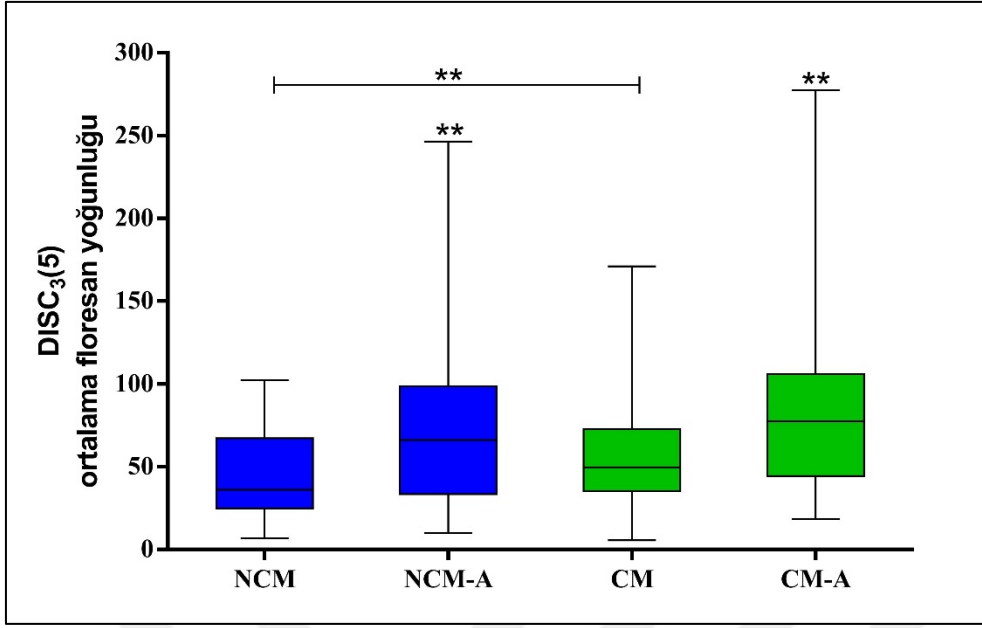
Şekil 4.8. DISC3(5) boyamaya ait örnek flow sitometri analizleri (A) Spermilerin büyüklük ve granülaritesine göre dağılımlarını gösteren nokta alan grafikleri, (B) Tek hücrelerin seçilerek analiz edildiğini gösteren nokta alan grafikleri, (C) DISC3(5) / PI floresan yoğunluklarını gösteren nokta alan grafikleri



Şekil 4.9. DISC3(5) floresan yoğunluklarını gösteren birleştirilmiş histogramlar

Çizelge 4.6. DISC3(5) floresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

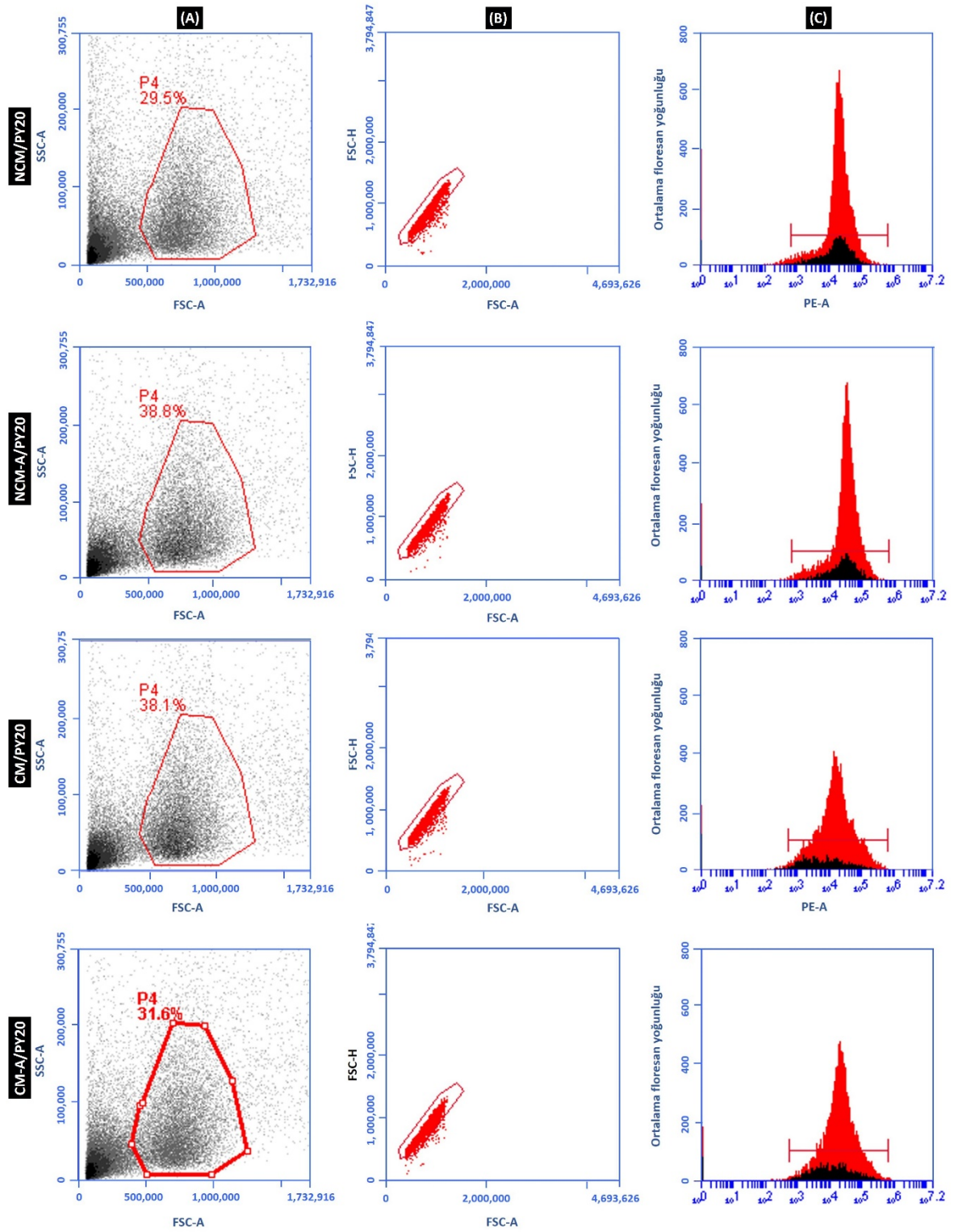
DISC ₃ (5) ortalama floresan yoğunluğu	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	6,867	102,150	36,139	45,808	26,626	5,221
	NCM-A	10,001	246,377	65,956	72,513	52,534	10,303
	CM	5,526	170,929	49,646	58,848	36,266	6,853
	CM-A	18,290	277,564	77,446	83,018	51,179	9,672



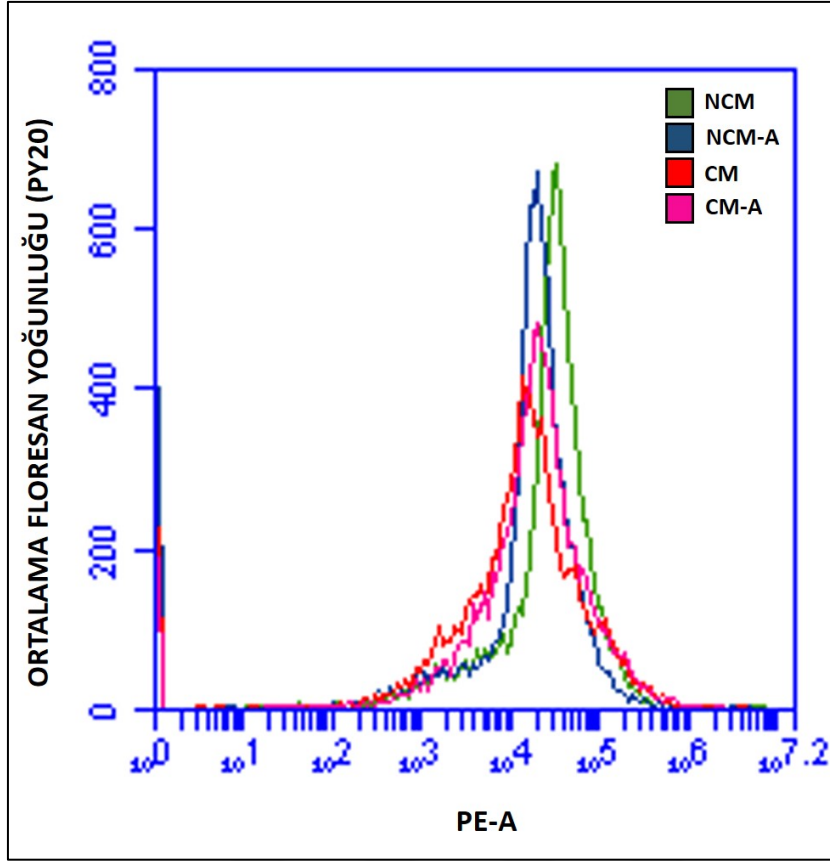
Şekil 4.10. Deney grupları arasında DISC₃(5) floresan yoğunluklarının karşılaştırılması (* $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, $n = 30$)

4.3.4. Kapasitasyon bulguları

Deney gruplarındaki kapasite olmuş sperm miktarını değerlendirmek için, hücrelerdeki tirozin fosforilasyon oranı ölçüldü. Bunun için spermler PY20 antikoruna ile işaretlenerek flow sitometrede analiz edildi. Spermler CM medyumda inkübe edildiklerinde PY20 miktarının NCM medyumda inkübe edilenlere göre anlamlı olarak arttığı saptandı ($p < 0.001$). NCM-A hem de CM-A medyumlarının spermlerin PY20 konsantrasyonunda NCM ve CM medyumlarına kıyasla anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$). PY20 floresan analizlerine ilişkin flow sitometri grafikleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verildi. İstatistiksel tanımlayıcı veriler Çizelge 4.7’de özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.13’te yapıldı.



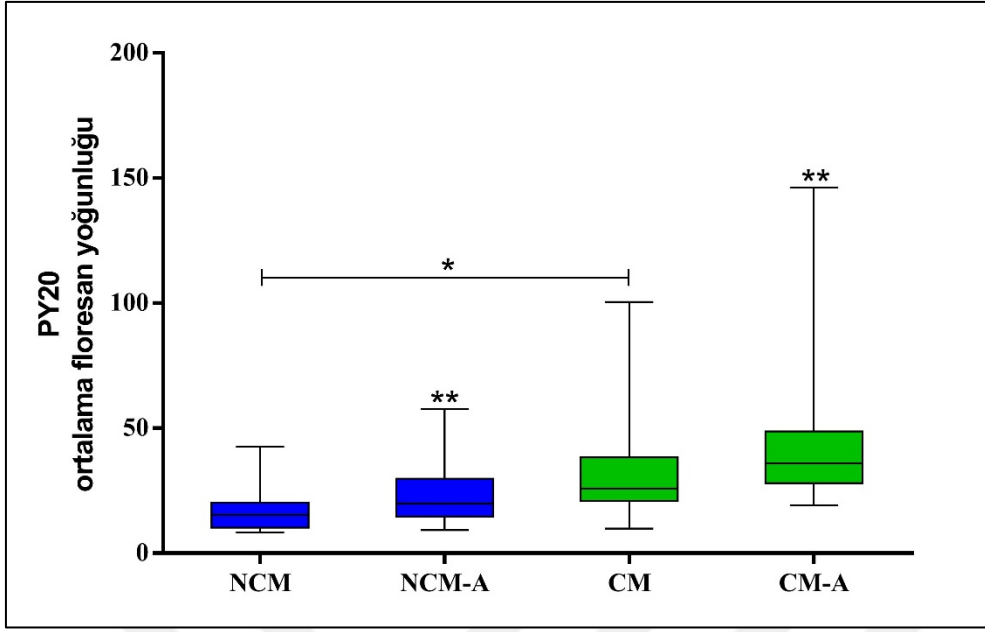
Şekil 4.11. PY20 ile işaretlemeye ait örnek flow sitometri analizleri (A) Spermilerin büyüklük ve granülaritesine göre dağılımlarını gösteren nokta alan grafikleri, (B) Tek hücrelerin seçilerek analiz edildiğini gösteren nokta alan grafikleri, (C) PY20 ortalama floresan yoğunluklarını gösteren histogramlar



Şekil 4.12. PY20 floresan yoğunluklarını gösteren birleştirilmiş histogramlar

Çizelge 4.7. PY20 floresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

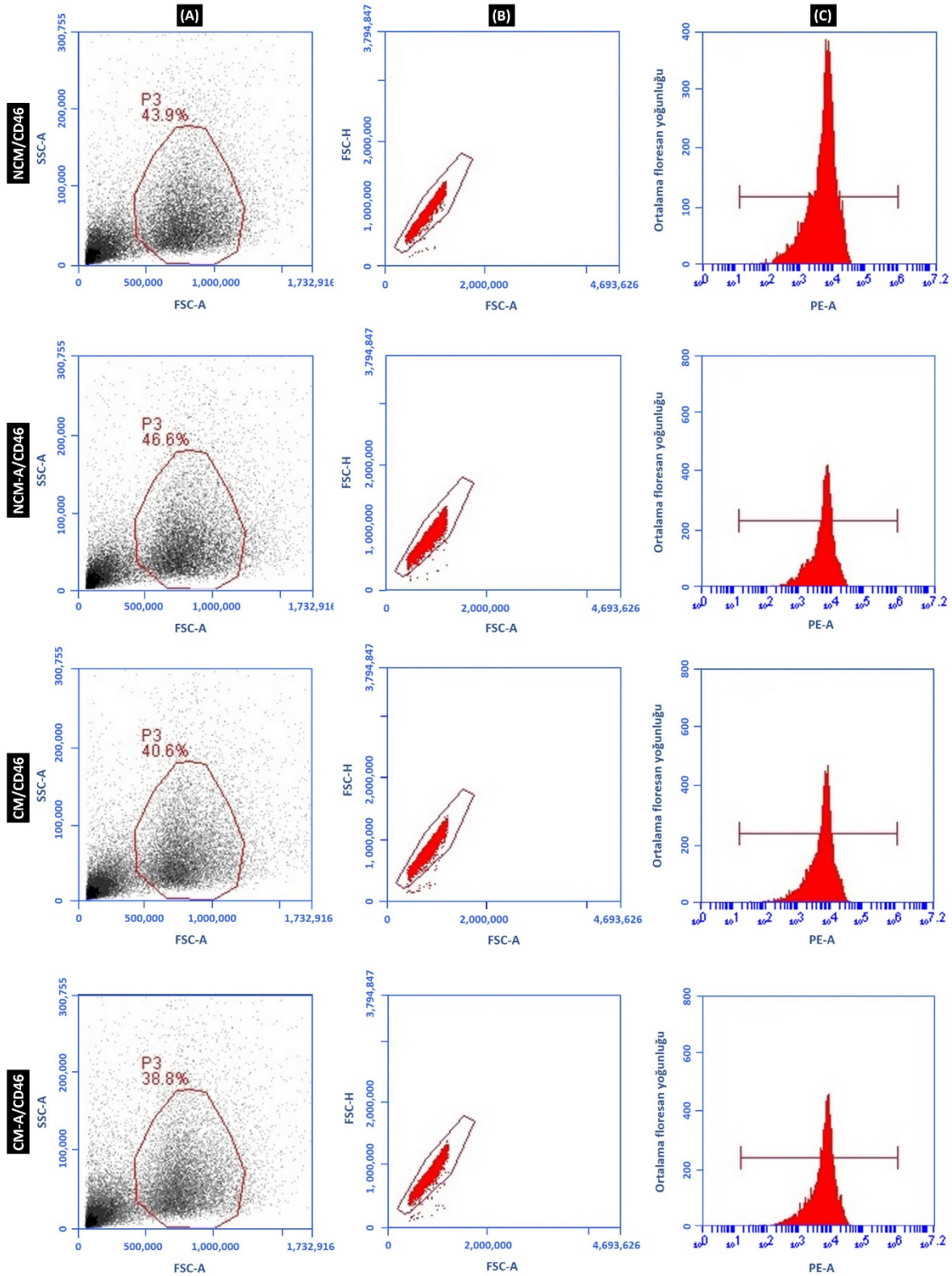
PY20 ortalama floresan yoğunluğu	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM		42,591	8,230	15,346	17,534	9,441
NCM-A		57,591	9,178	19,915	23,625	13,126	2,396
CM		100,465	9,849	25,938	33,879	21,866	3,992
CM-A		46,180	19,096	35,877	43,803	26,971	4,924



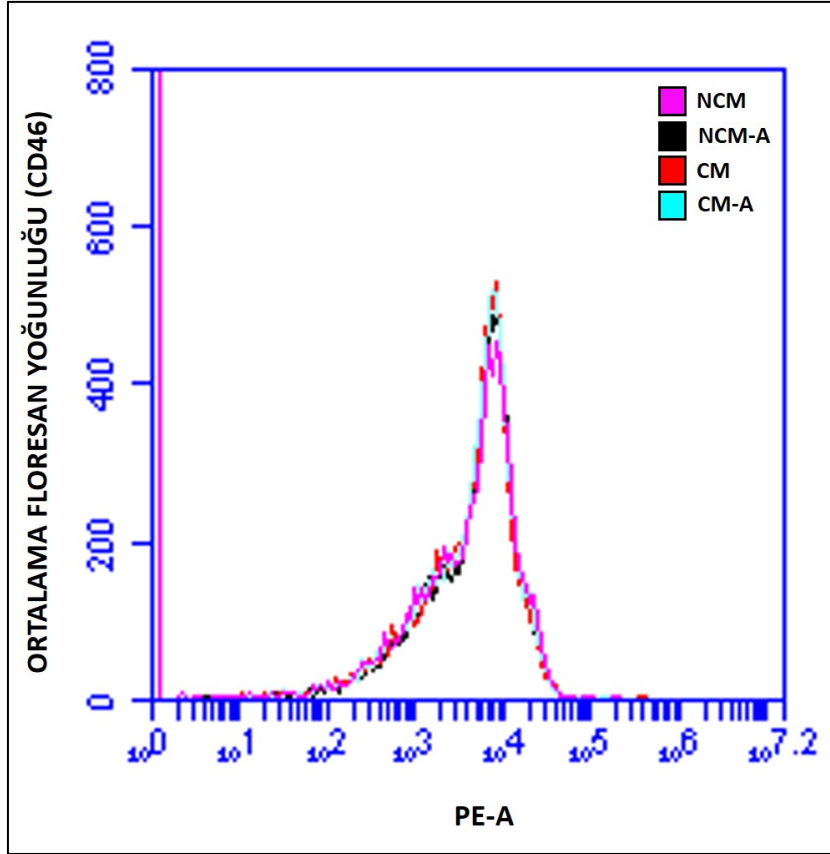
Şekil 4.13. Deney grupları arasında PY20 floresan yoğunluklarının karşılaştırılması (* $p < 0.001$, ** $p < 0.05$, $n = 30$)

4.3.5. Akrozom reaksiyonu bulguları

Spermlerin akrozom reaksiyonu durumları CD46 antikorunu kullanılarak flow sitometre ile değerlendirildi. NCM ve CM medyumları arasında CD46 floresan yoğunluğu bakımından anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,920$). Benzer şekilde, NCM-A ve CM-A medyumlarında inkübasyonun da spermdeki CD46 konsantrasyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi (sırasıyla $p = 0,964$ ve $p = 0,978$). CD46 floresan analizlerine ilişkin flow sitometri grafikleri Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verildi. İstatistiksel tanımlayıcı veriler Çizelge 4.8'de özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.16'da yapıldı.



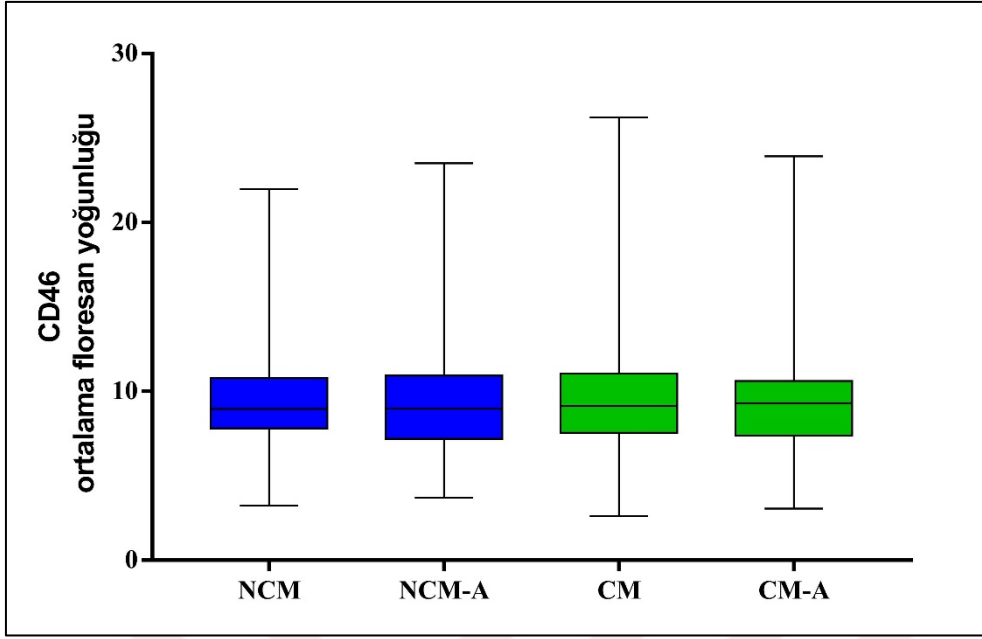
Şekil 4.14. CD46 ile işaretlemeye ait örnek flow sitometri analizleri (A) Spermilerin büyüklük ve granülaritesine göre dağılımlarını gösteren nokta alan grafikleri, (B) Tek hücrelerin seçilerek analiz edildiğini gösteren nokta alan grafikleri, (C) CD46 ortalama floresan yoğunluklarını gösteren histogramlar



Şekil 4.15. CD46 floresan yoğunluklarını gösteren birleştirilmiş histogramlar

Çizelge 4.8. CD46 floresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

CD46 ortalama floresan yoğunluğu	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	3,222	21,989	8,956	10,429	4,997	0,912
	NCM-A	3,706	23,514	8,972	10,583	5,559	1,015
	CM	2,624	26,210	9,122	10,708	5,898	1,077
	CM-A	3,052	23,911	9,287	10,575	5,402	0,986



Şekil 4.16. Deney grupları arasında CD46 floresan yoğunluklarının karşılaştırılması ($n = 30$)

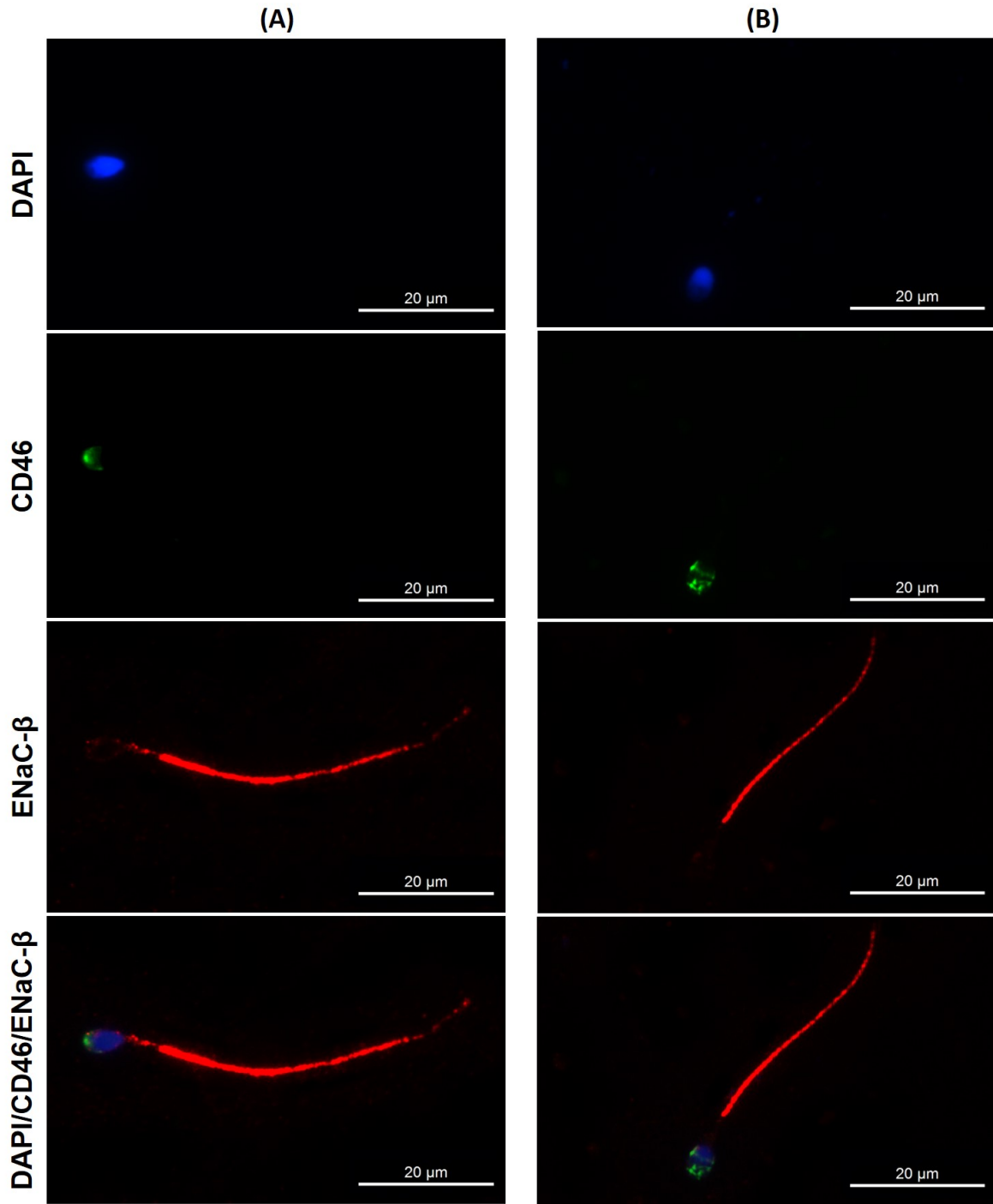
4.4. İmmunofloresan bulguları

4.4.1. Normal morfoloji gösteren spermeler

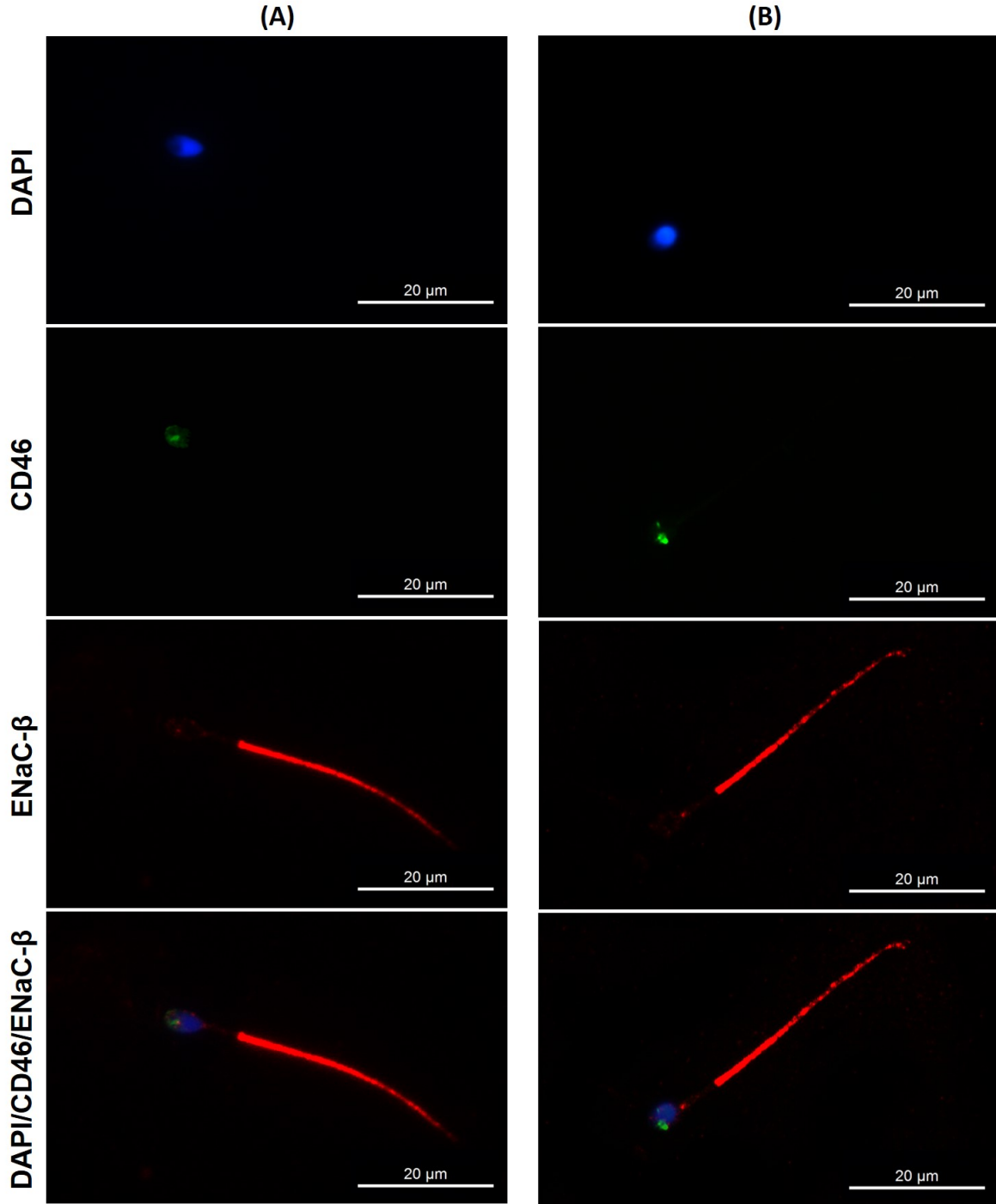
Normal morfolojiye sahip spermelerde ENaC- β 'nin özellikle kuyruğun esas parçasında lokalize olduğu belirlendi. Son parçada ise zayıf immunoreaktivite gözlemlendi. Az sayıda pozitif reaksiyon gösteren hücre dışında orta parça genellikle ENaC- β -negatif olarak izlendi. Spermelerdeki akrozom reaksiyonunu göstermek amacıyla kullanılan CD46 immunoreaksiyonu ise; akrozomal kep, ekvatoryal segment ve başın tamamı olmak üzere farklı lokalizasyonda izlendi. CD46-negatif spermeler ve akrozomal kep boyunca CD46 immunopozitifliği gösteren spermeler akrozom intakt olarak nitelendirildi. Ekvatoryal segmentte CD46 reaktivitesinin gözlenmesi, spermelerin akrozom reaksiyonunu tamamladıklarının göstergesi olarak kabul edildi.

Deney grupları, esas parçadaki ENaC- β immunoreaksiyonu ve baş bölgesindeki CD46 lokalizasyonu açısından incelenerek AMPK aktivasyonunun ENaC- β protein miktarı ve akrozom reaksiyonu ile ilişkisi değerlendirildi. NCM medyumda inkübe edilmiş spermelerde kuyruğun esas parçasında çok kuvvetli ENaC- β immunoreaksiyonu izlendi. Bu grupta az sayıda hücrenin akrozom reaksiyonu geçirmiş olduğu, diğerlerinin intakt

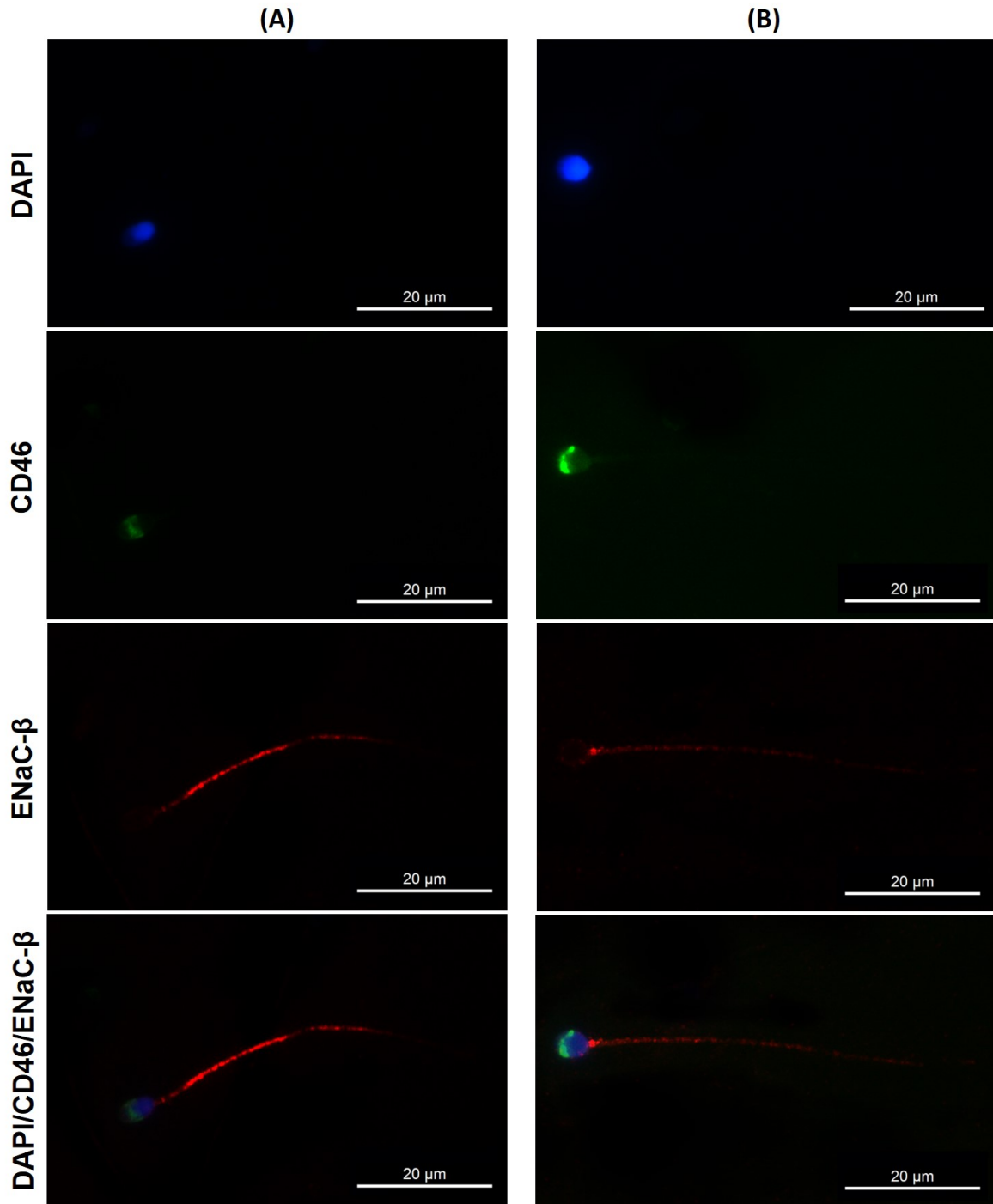
akrozoma sahip oldukları görüldü (Resim 4.1 ve 4.2). NCM-A medyumda inkübasyonun ardından esas parçadaki ENaC- β immunopozitifliğinin yoğun floresan görüntüsünden noktalı floresan görüntüsüne değiştiği ve reaktivitenin ortadan zayıfa doğru değiştiği izlendi. Az sayıda ekvatoryal segmentte pozitif CD46 reaksiyonu gösteren sperm dışında bu gruptaki spermlerin de NCM medyumdaki spermlere benzer şekilde akrozomlarının intakt olduğu gözlemlendi (Resim 4.3 ve 4.4). CM medyumda inkübe edilen spermlerin esas parçalarında NCM medyuma kıyasla azalmış immunopozitiflik izlendi. Ancak reaksiyon hala kuvvetli düzeydeydi. Bu hücrelerin çoğunun akrozom reaksiyonu geçirmediği gözlenirken çok az sayıda hücrenin reaksiyonu tamamladıkları belirlendi (Resim 4.5 ve 4.6). CM-A medyumda inkübasyonun, NCM-A medyuma benzer şekilde kuyruğun esas parçasındaki ENaC- β immunopozitifliğinin noktalı floresan görüntüsüne değişmesine neden olduğu ve immunoreaktivitenin zayıf olduğu gözlemlendi. Bu grupta da CM medyuma benzer şekilde sadece az sayıda hücrenin akrozom reaksiyonu geçirmiş olduğu, diğerlerinin intakt akrozoma sahip oldukları görüldü (Resim 4.7 ve 4.8). ImageJ programıyla yapılan ölçümler sonucu elde edilen ENaC- β floresan yoğunluklarına ve akrozom reaksiyonunu tamamlamış hücre sayılarına ait istatistiksel tanımlayıcı veriler Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da özetlendi ve gruplar arası karşılaştırmalar Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de yapıldı.



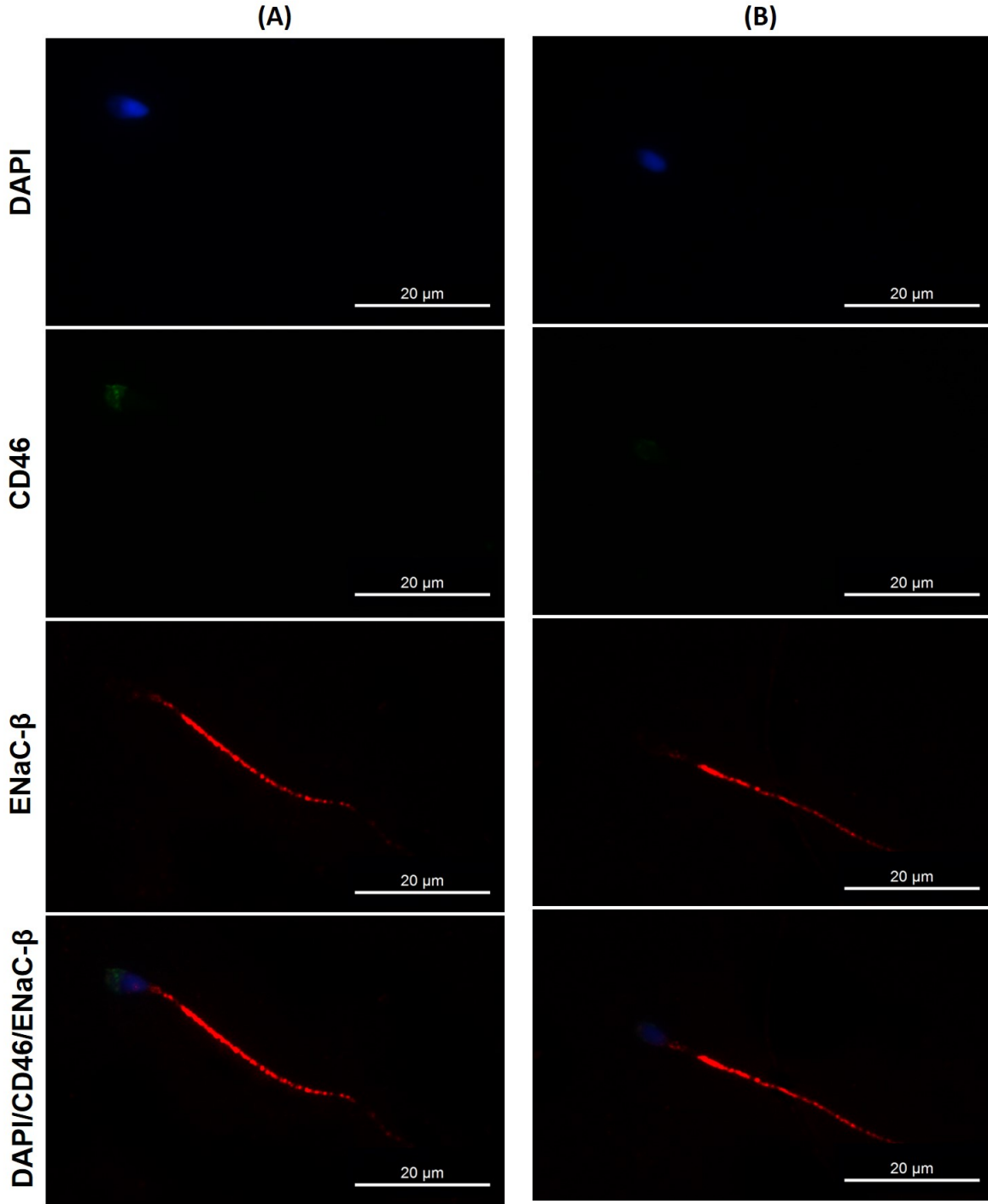
Resim 4.1. NCM grubuna ait immüno Floresan incelemeler (A) akrozom boyunca CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında çok kuvvetli, orta parça ve son parçasında zayıf ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor (B) akrozom boyunca CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında kuvvetli, son parçasında zayıf ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor



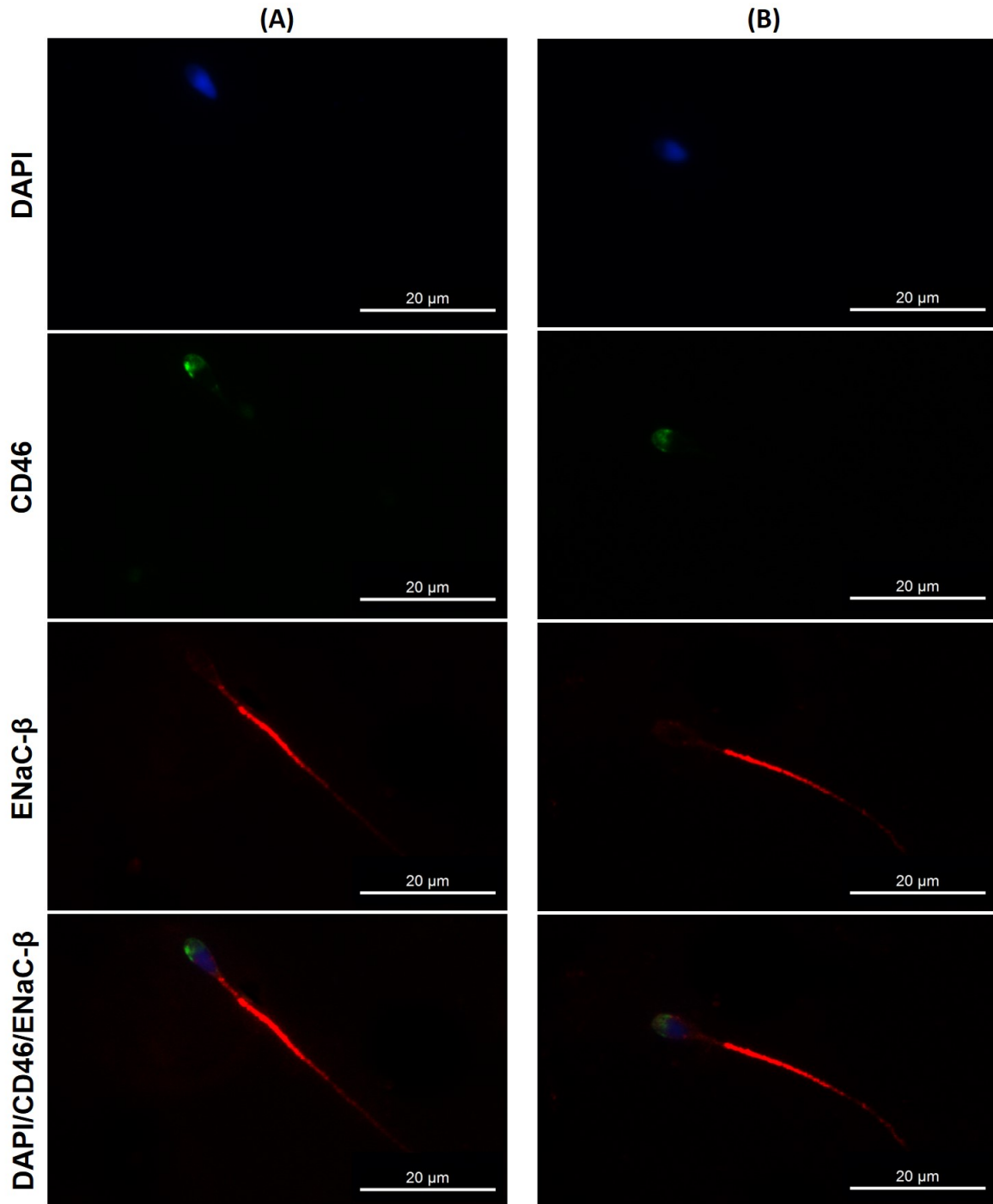
Resim 4.2. NCM grubuna ait immüno Floresan incelemeler (A) akrozomda CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında çok kuvvetli, son parçasında zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) ekvatoryal segmentte CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında kuvvetli, son parçasında ise zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor



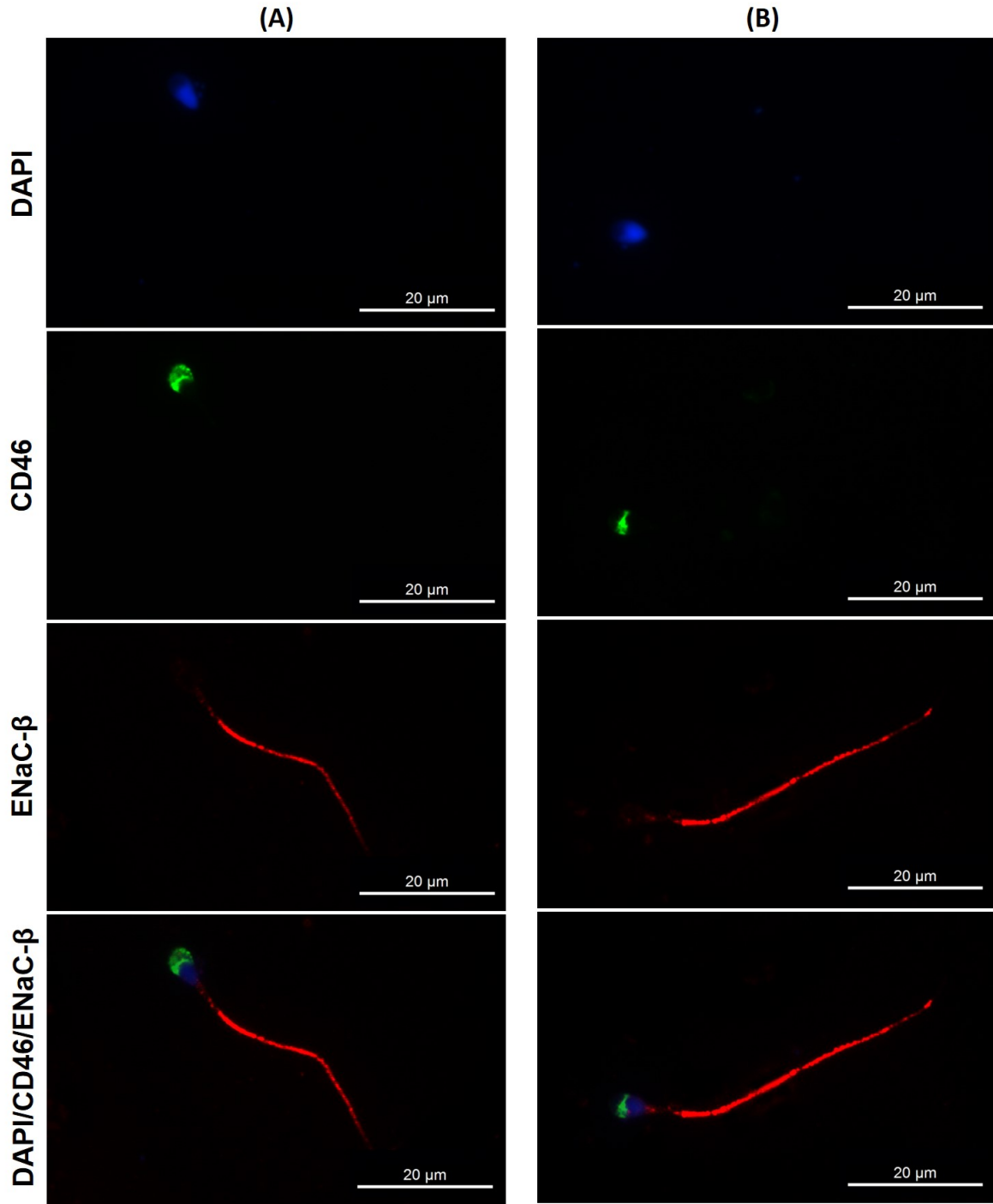
Resim 4.3. NCM-A grubuna ait immüno Floresan incelemeler (A) akrozom boyunca zayıf CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında orta yoğunlukta, orta parça ve son parçasında zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) ekvatoryal segmentte kuvvetli CD46 immunoreaksiyonu ve bağlantı parçasında kuvvetli, kuyruğun orta parçasında ve esas parçasında zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor



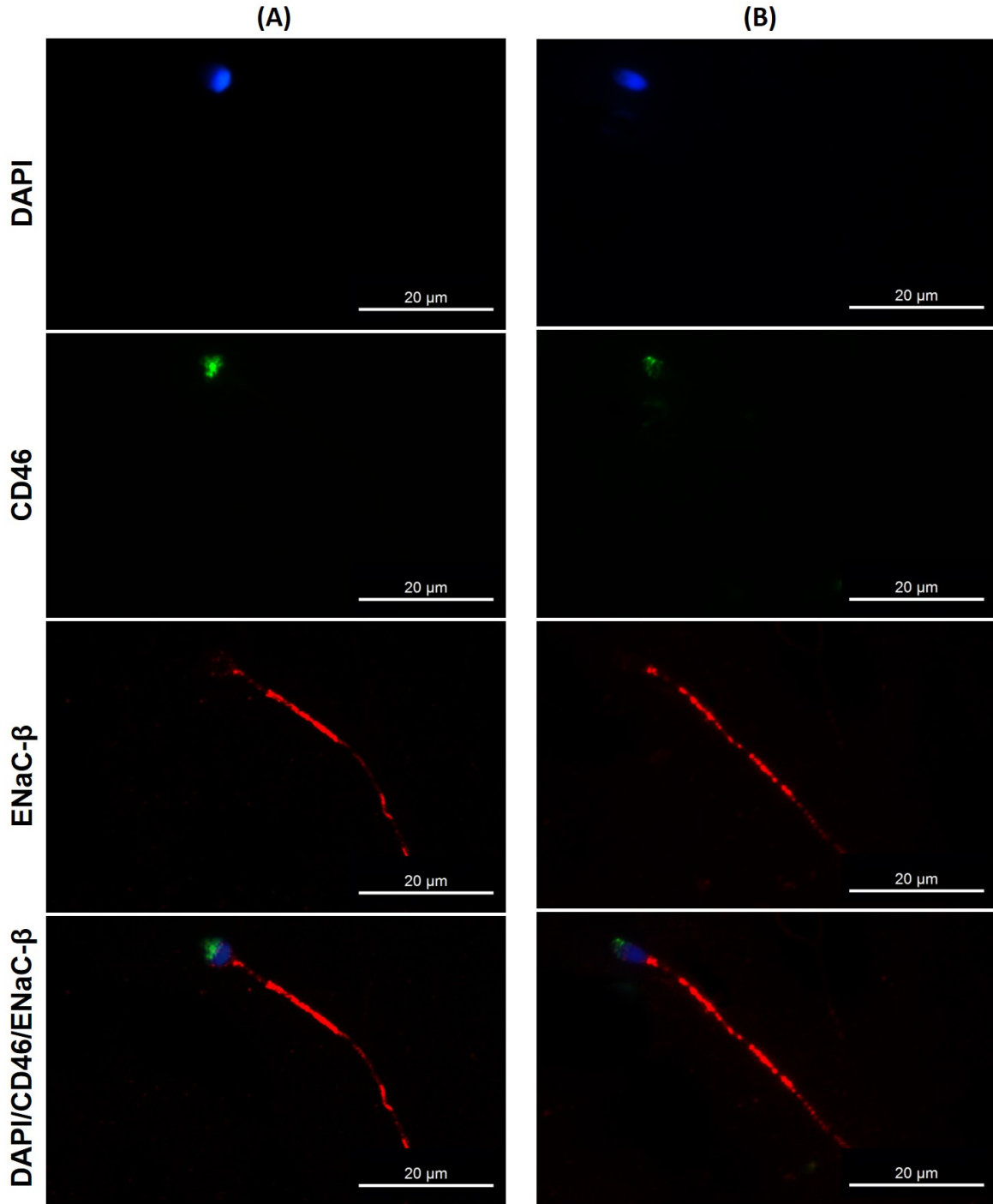
Resim 4.4. NCM-A grubuna ait immünofloresan incelemeler (A) akrozomda zayıf CD46 immunoreaksiyonu ve esas parçada şiddette, orta parçada zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) CD46-negatif sperm başı ve esas parçasında zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu gösteren sperm kuyruğu izleniyor



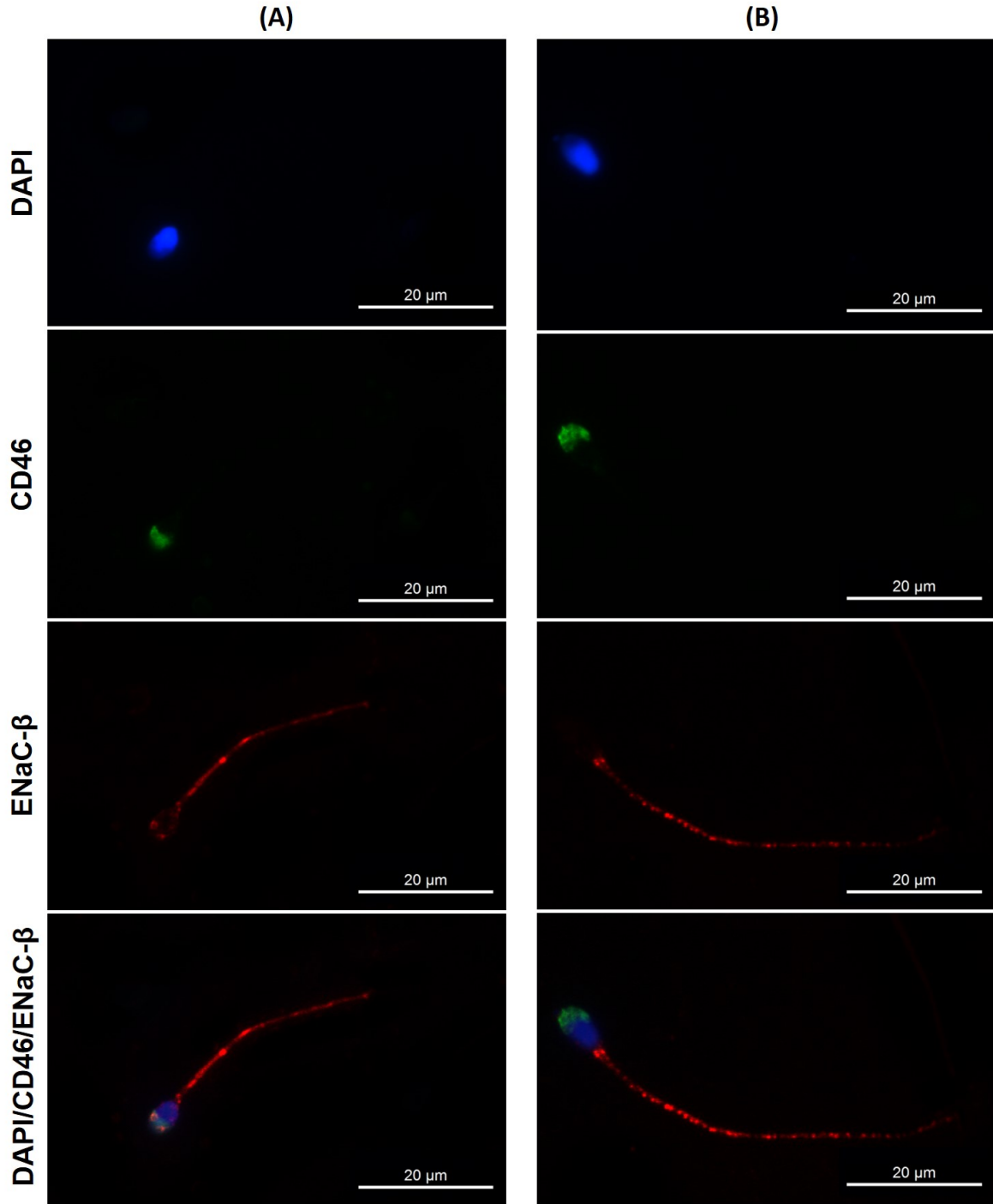
Resim 4.5. CM grubuna ait immüno Floresan incelemeler (A) akrozom boyunca CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında kuvvetli, orta parçasında zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) akrozomda zayıf CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında orta yoğunlukta ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor



Resim 4.6. CM grubuna ait immünofloresan incelemeler (A) akrozoal bölgede kuvvetli CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında orta yoğunlukta ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) ekvatoryal segmentte CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında kuvvetli, son parçasında zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor



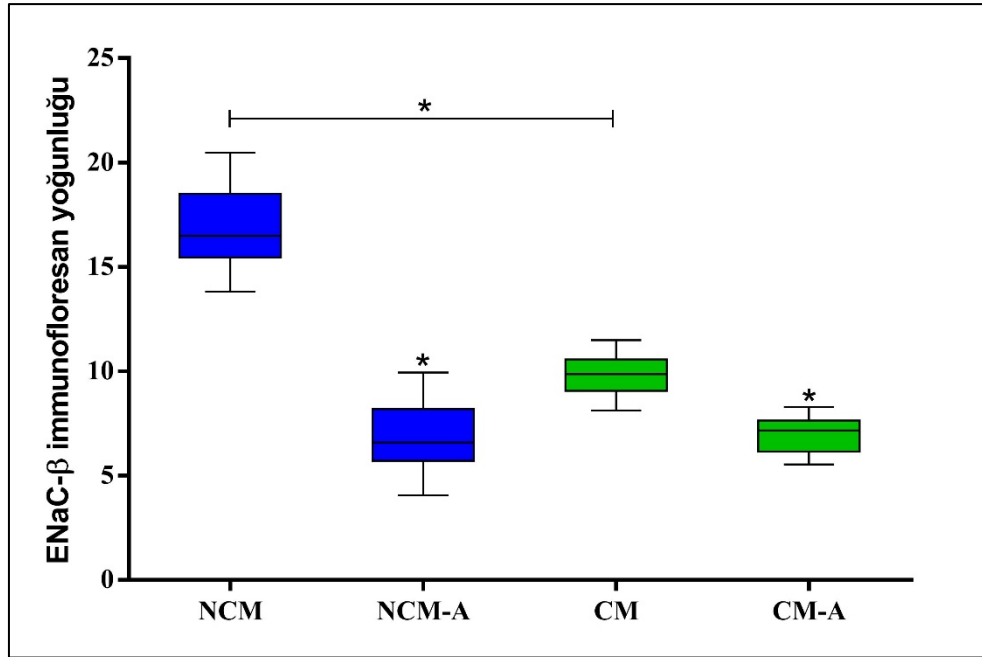
Resim 4.7. CM-A grubuna ait immüno Floresan incelemeler (A) akrozom boyunca CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında orta yoğunlukta ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor (B) akrozomal bölgede CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında orta yoğunlukta ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor



Resim 4.8. CM-A grubuna ait immüno Floresan incelemeler (A-B) akrozom boyunca CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruğun esas parçasında zayıf ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor

Çizelge 4.9. ENaC- β immunofloresan yoğunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

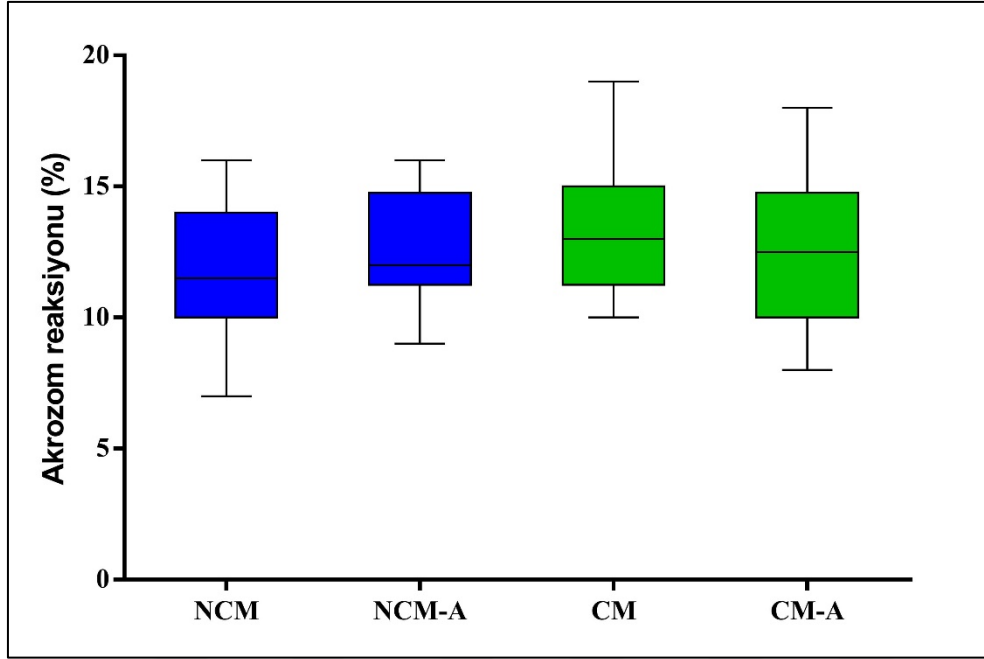
ENaC- β immunofloresan yoğunluğu	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	13,810	20,468	16,485	16,816	1,838	0,411
	NCM-A	4,053	9,943	6,580	6,779	1,621	0,362
	CM	8,124	11,486	9,862	9,823	0,947	0,211
	CM-A	5,545	8,272	7,171	6,986	0,847	0,189



Şekil 4.17. Deney grupları arasında ENaC- β immunofloresan yoğunluklarının karşılaştırılması ($*p < 0.001$, $n = 30$)

Çizelge 4.10. Akrozom reaksiyonu geçirmiş sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı istatistiksel veriler ($n = 30$)

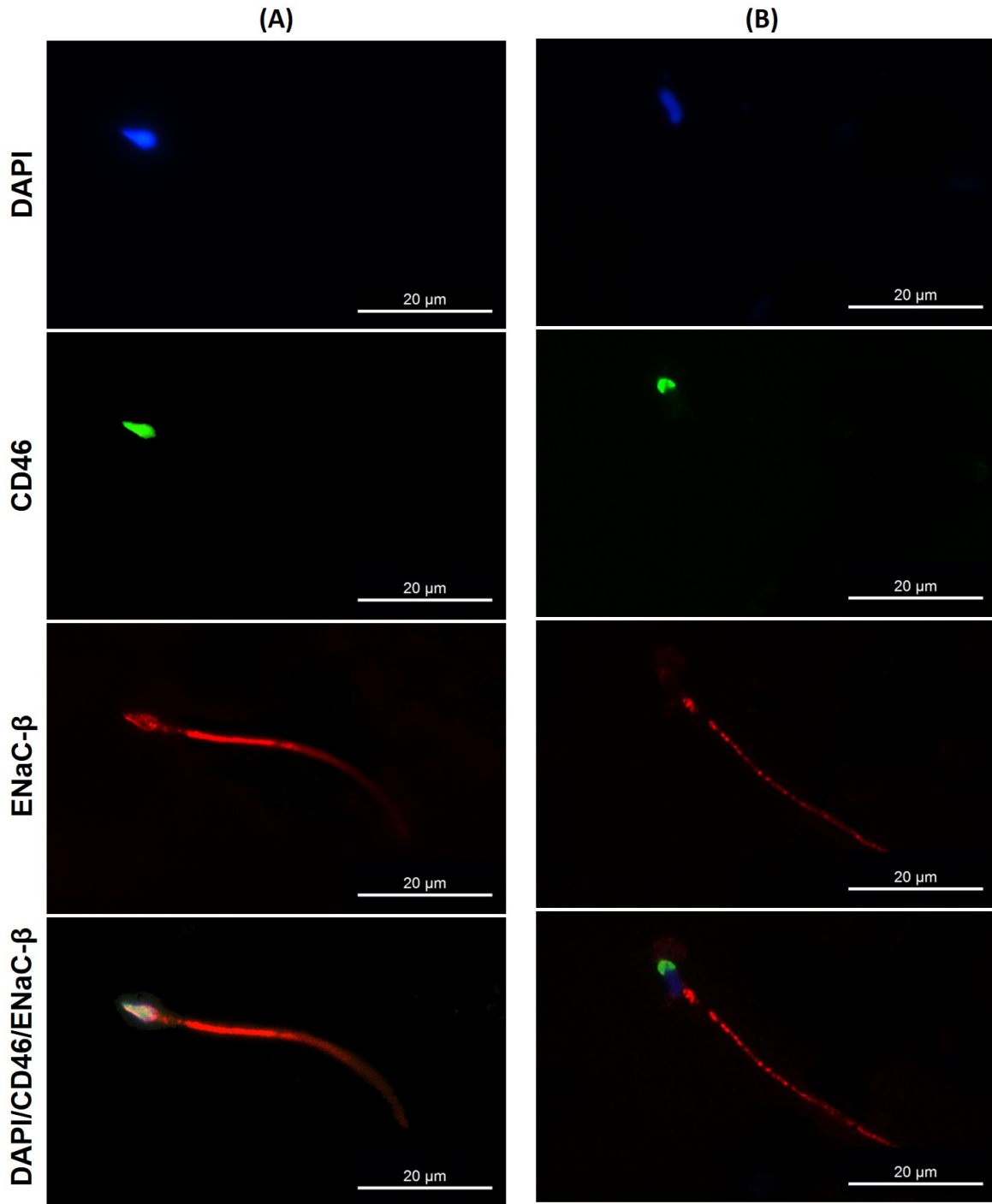
Akrozom reaksiyonu geçirmiş sperm yüzdesi	Gruplar	En düşük değer	En yüksek değer	Ortanca değer	Ortalama değer	Standart Sapma (SS)	Standart hata (SEM)
	NCM	7	16	11,5	11,95	2,56	0,47
	NCM-A	9	16	12	12,60	2,06	0,38
	CM	7	19	13	13,25	2,36	0,43
	CM-A	8	18	12,5	12,70	2,83	0,52



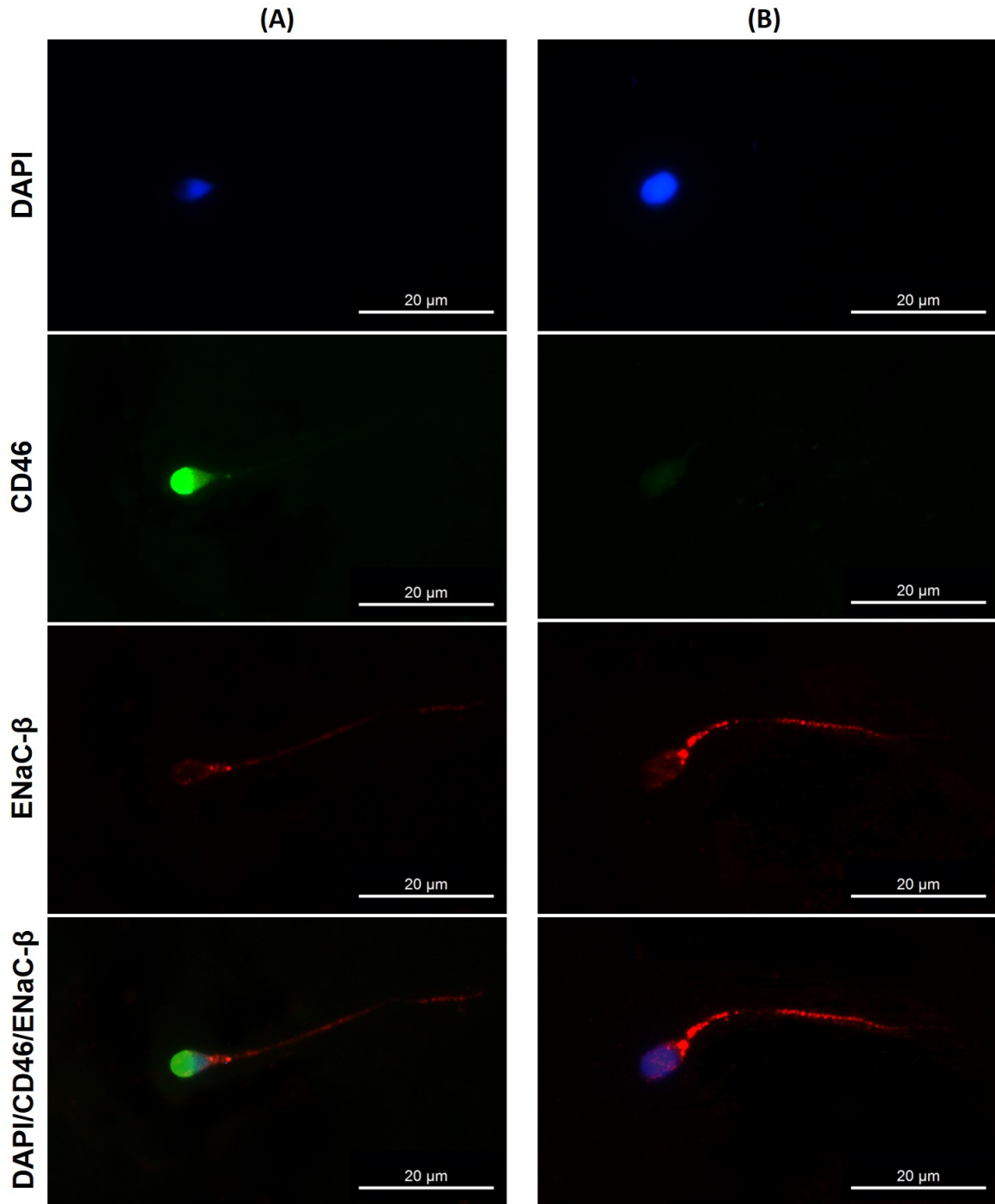
Şekil 4.18. Deney grupları arasında akrozom reaksiyonu geçirmiş sperm yüzdelerinin karşılaştırılması ($n = 30$)

4.4.2. Anomali gösteren spermiler

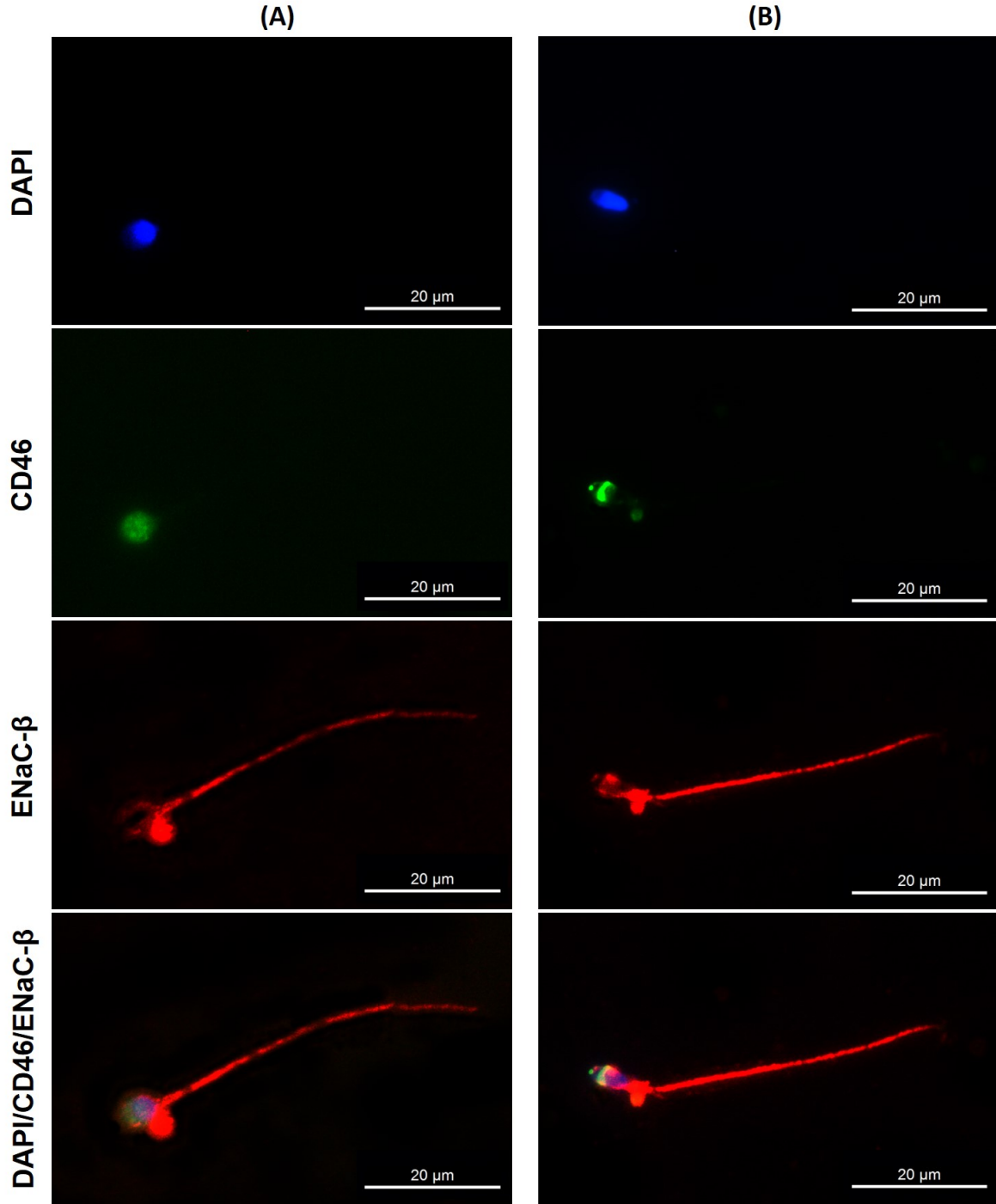
Örneklerdeki konik baş, uzun baş (Resim 4.9) piriform baş ve büyük baş (Resim 4.10) gibi baş anomalilerine; asimetrik boyun ve sitoplazmik droplet (Resim 4.11) gibi boyun anomalilerine; kalın orta parça (Resim 4.12), kısa kuyruk (Resim 4.13), çift kuyruk (Resim 4.14) ve kıvrık kuyruk (Resim 4.15 ve 4.16) gibi kuyruk anomalilerine sahip spermiler ve kuyuksuz spermiler (Resim 13) de ENaC- β ve CD46 reaktivitesi bakımından değerlendirildi. Anormal morfolojili bazı spermilerin kuyruklarında inkübasyon medyumundan bağımsız olarak ENaC- β floresan yoğunluğunun çok yüksek olduğu, bazılarında ise immunreaktivitenin oldukça zayıf olduğu izlendi. Görülen immunreaktivitenin özellikle sitoplazmik droplet ve orta parça anomalilerinde sperm anomalisi gösteren ilgili bölgelerinde çok daha kuvvetli olduğu tespit edildi. Baş ve kuyruk anomalilerine sahip spermiler genellikle CD46-negatif ve akrozomal kep boyunca CD46-pozitif reaksiyon gösterirken, az sayıda hücrede CD46 proteininin ekvatoryal segmentte lokalize olduğu izlendi (Resim 4.9- 4.16).



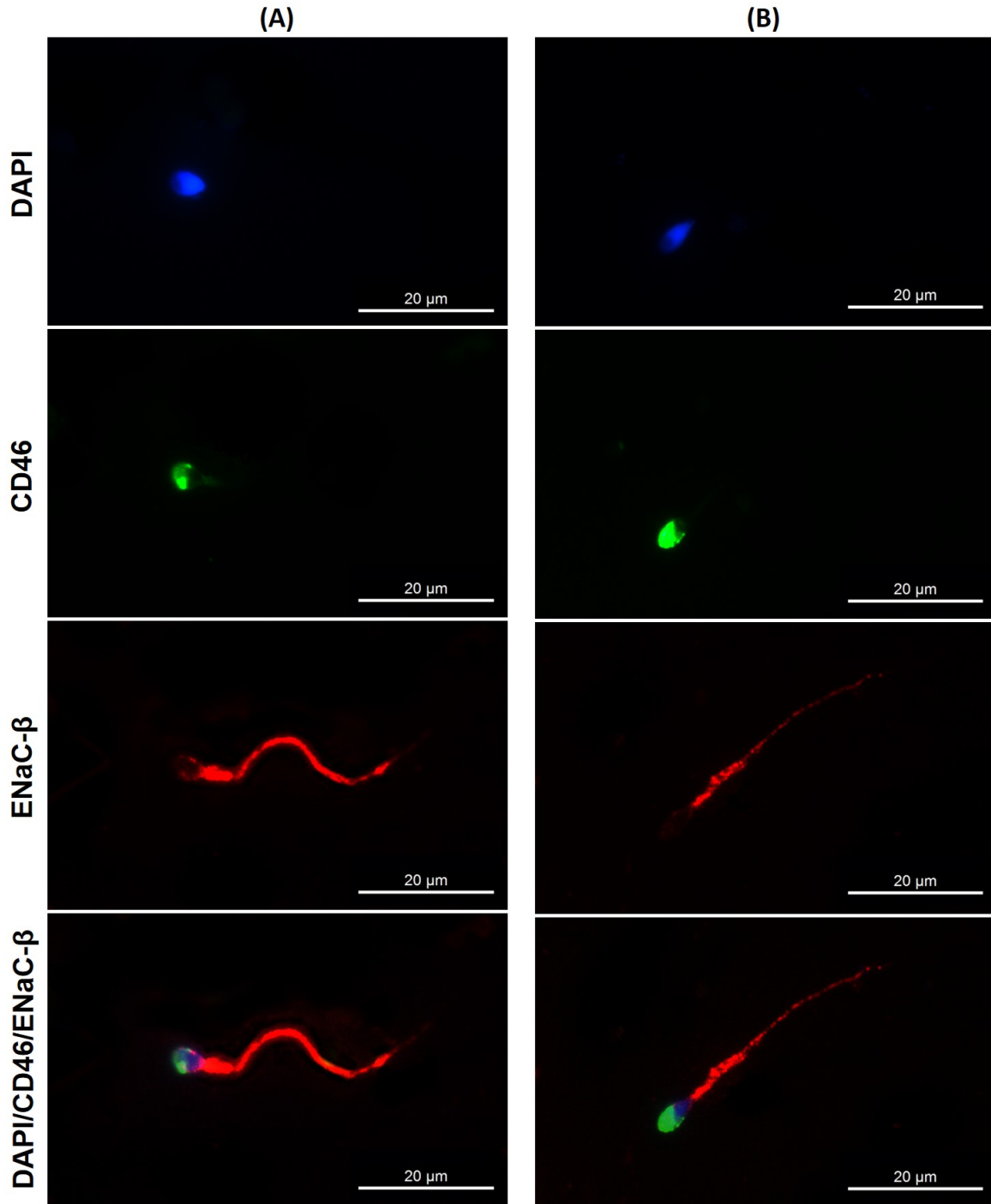
Resim 4.9. Baş anomalisine sahip spermere ait immunofloresan incelemeler (A) Konik başlı spermde başın tamamında kuvvetli CD46 immunoreaksiyonu, baş ve kuyruğun esas parçasında çok kuvvetli ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor (B) ince uzun başlı spermde akrozom boyunca kuvvetli CD46 immunoreaksiyonu, kuyruk boyunca zayıf ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor



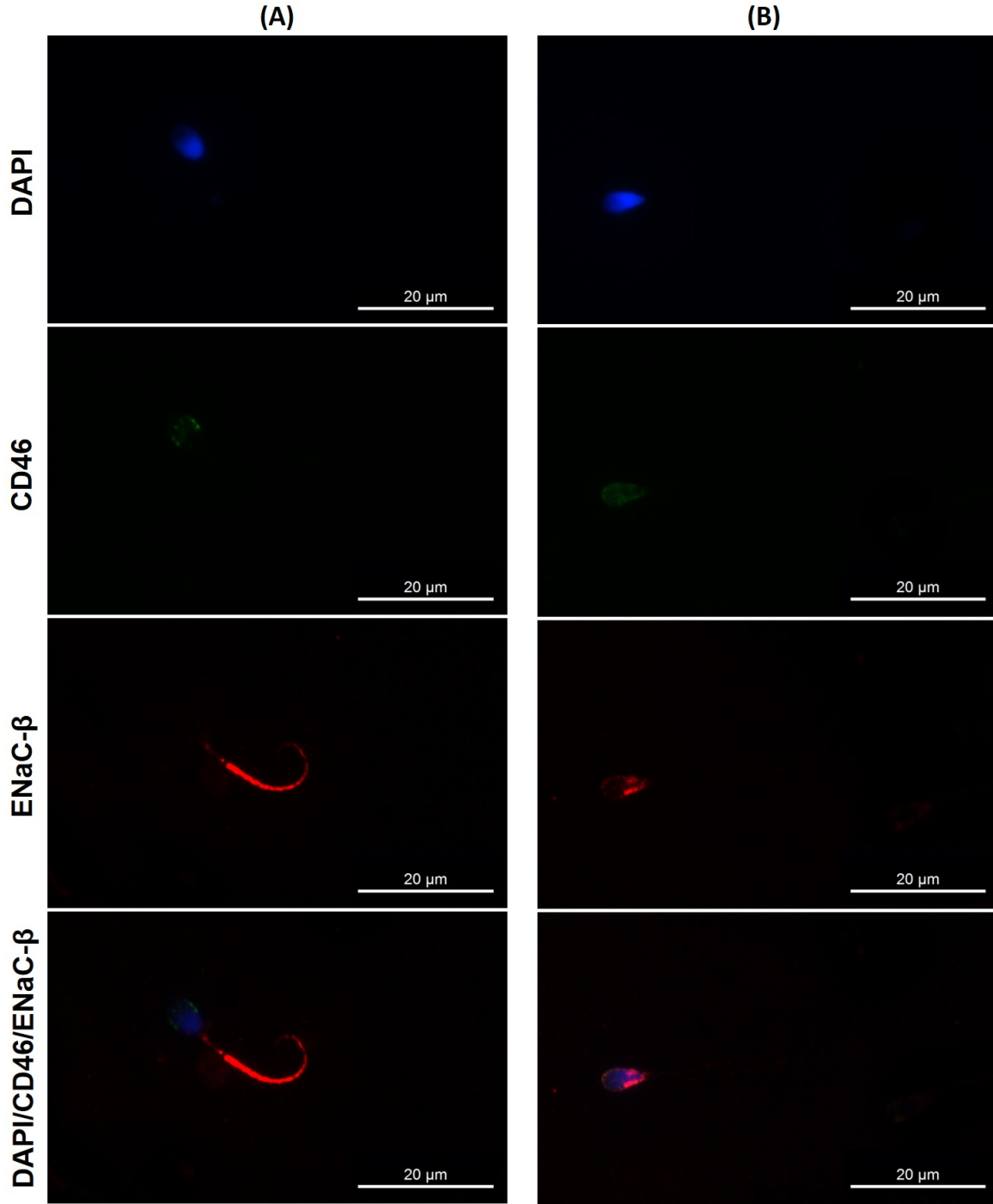
Resim 4.10. Baş anomalisine sahip spermere ait immunofloresan incelemeler (A) piriform başlı spermde akrozom boyunca kuvvetli CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruk boyunca çok zayıf ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor (B) büyük başlı spermde CD46-negatif sperm başı ve post-akrozomal bölgede ve kuyruk boyunca orta şiddette ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor



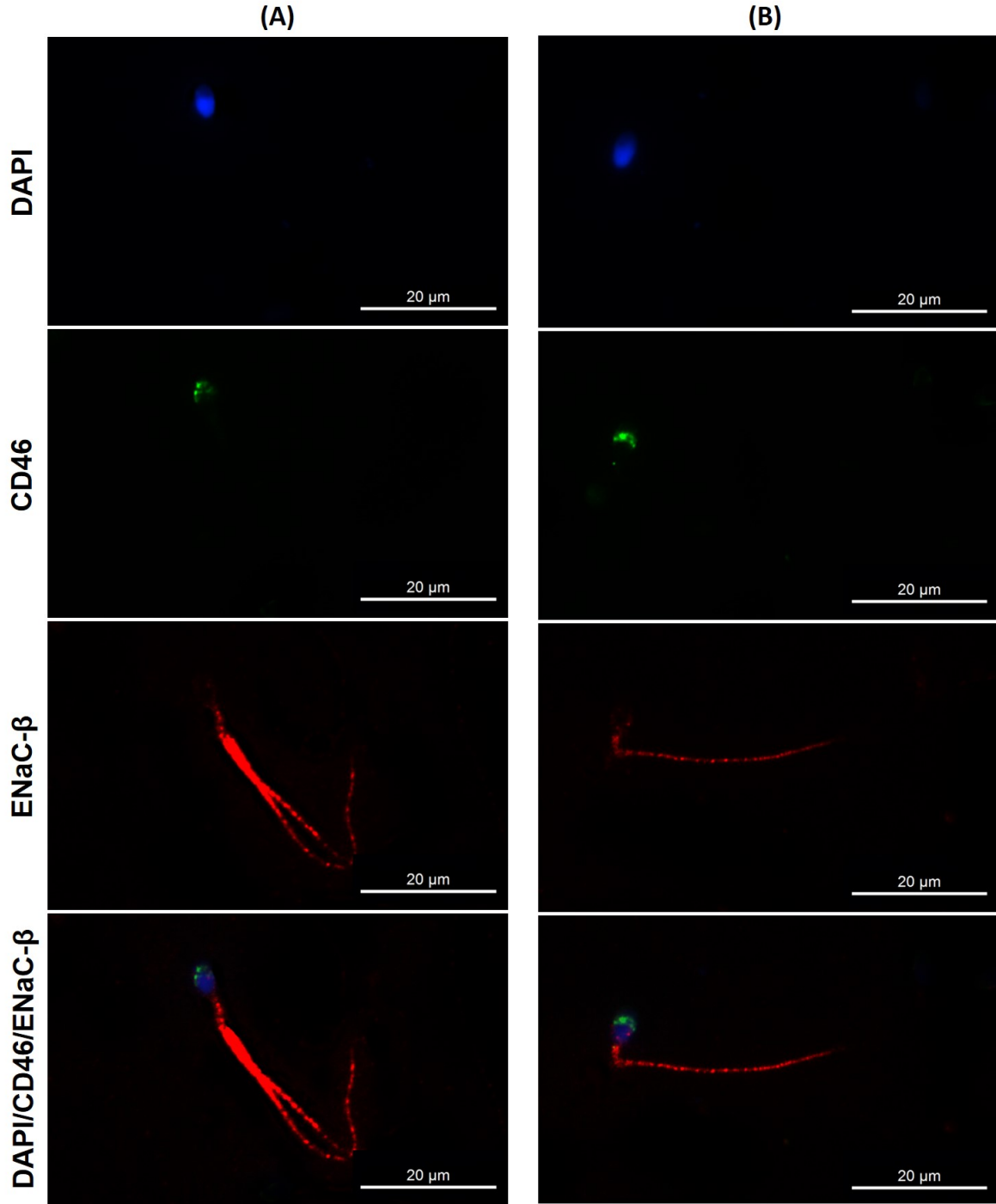
Resim 4.11. Boyun anomalisine sahip spermere ait immunofloresan incelemeler (A) sitoplazmik droplet içeren spermde akrozom boyunca zayıf CD46 immunoreaksiyonu, sitoplazmik droplette çok kuvvetli ve kuyruk boyunca orta yoğunlukta ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) proksimal sitoplazmik droplet içeren spermde ekvatoryal bölgede kuvvetli CD46 immunoreaksiyonu, sitoplazmik droplette ve kuyruk boyunca çok kuvvetli ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor



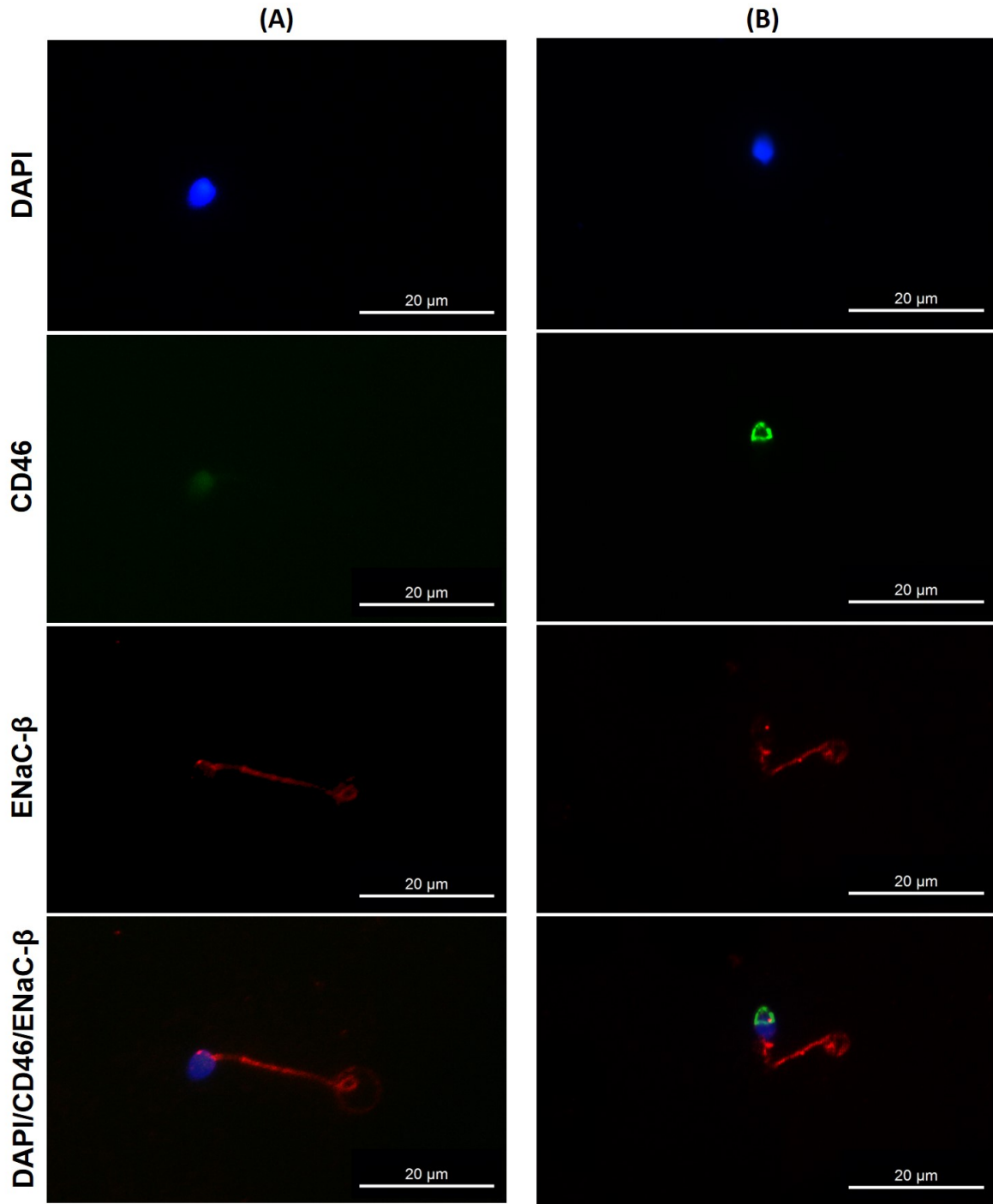
Resim 4.12. Orta parça anomalisine sahip spermelere ait immunofloresan incelemeler (A) kalın orta parçaya sahip spermde ekvatoryal segmentte CD46 immunoreaksiyonu, kuyruk boyunca kuvvetli ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) kalın orta parçaya sahip spermde akrozom boyunca kuvvetli CD46 immunoreaksiyonu ve orta parçada orta şiddette, esas parçada zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor



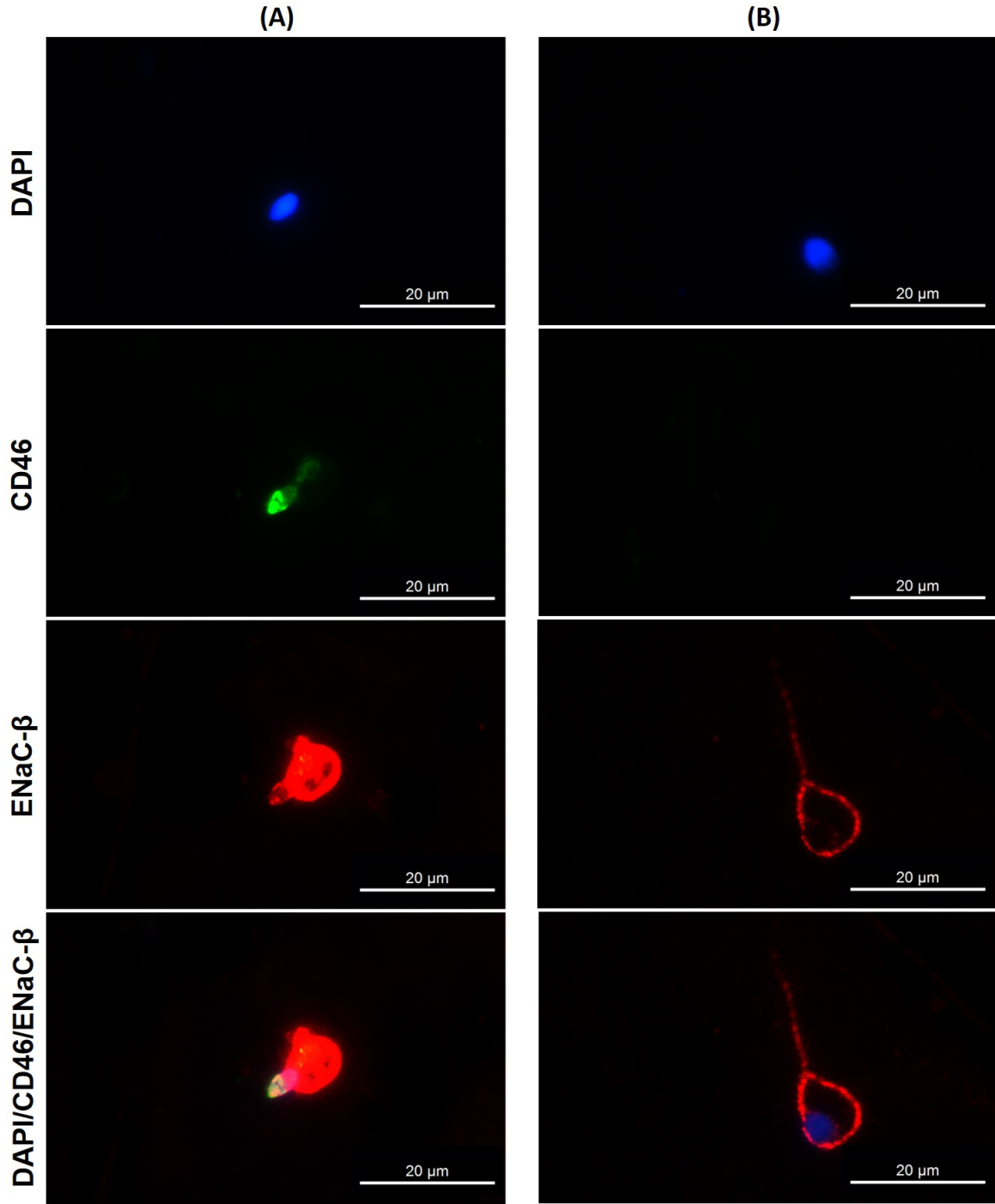
Resim 4.13. Kuyruk anomalisine sahip spermere ait immunofloresan incelemeler (A) kısa kuyruklu spermde CD46-negatif sperm başı ve kuyruğun esas parçasında çok kuvvetli, son parçasında zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) kuyruksuz spermde CD46-negatif sperm başı ve post-akrozomal bölgede kuvvetli ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor



Resim 4.14. Kuyruk anomalisine sahip spermelere ait immunofloresan incelemeler (A) çift kuyruklu spermde akrozomda zayıf CD46 immunoreaksiyonu ve kuyrukların esas parçalarında çok kuvvetli, son parçalarında zayıf ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor (B) kıvrık kuyruklu spermde akrozom boyunca CD46 immunoreaksiyonu, kuyruk boyunca zayıf ENaC-β immunoreaksiyonu izleniyor



Resim 4.15. Kuyruk anomalisine sahip spermelere ait immunofloresan incelemeler (A) asimetrik boyunlu, kıvrık kuyruklu spermde CD46-negatif sperm başı ve post-akrozomal bölgede kuyruk boyunca zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) kıvrık kuyruklu spermde apikal bölgeden ekvatoryal bölgeye doğru hücre sınırlarında CD46 immunoreaksiyonu ve kuyruk boyunca zayıf ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor



Resim 4.16. Kuyruk anomalisine sahip spermere ait immunofloresan incelemeler (A) kıvrık kuyruklu spermde akrozomda kuvvetli CD46 immunoreaksiyonu, baş çevresinde orta, kuyruk boyunca çok kuvvetli ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor (B) kıvrık kuyruklu spermde CD46-negatif sperm başı ve kuyruk boyunca orta şiddette ENaC- β immunoreaksiyonu izleniyor

Çalışmada yapılan tüm deneyler birlikte değerlendirildiğinde; AICAR uygulamasının spermlerdeki aktif AMPK miktarını arttırdığı, ENaC- β konsantrasyonunu azalttığı, sperm ileri hareketliliğini arttırdığı, PI floresan yoğunluğunu değiştirmediği, CoroNa yeşil floresan yoğunluğunu azalttığı, DISC₃(5) floresan yoğunluğunu ve PY20 floresan yoğunluğunu arttırdığı ve CD46 floresan yoğunluğunu değiştirmediği gözlendi (Çizelge 4.9). Ayrıca spermelerde ENaC- β proteinin ağırlıklı olarak kuyruğun esas parçasında lokalize olduğu gözlendi. ENaC- β immunoreaktivitesi ile CD46 lokalizasyon değişikliği arasında bir korelasyon saptanmadı.

Çizelge 4.11. Tüm deneylere ilişkin ortalama değerler

Gruplar	Fosfo-AMPK α -1/2 (ng/ml)	ENaC- β (ng/ml)	İleri hareket (%)	PI (ort. flor. yoğ.)	CoroNa yeşil (ort. flor. yoğ.)	DISC ₃ (5) (ort. flor. yoğ.)	PY20 (ort. flor. yoğ.)	CD46 (ort. flor. yoğ.)
NCM	4,350	135,629	34,639	84,500	39,791	45,808	17,534	10,429
NCM-A	4,859	103,760	54,650	85,470	31,284	72,513	23,625	10,583
CM	4,517	117,583	65,086	83,013	22,810	58,848	33,879	10,708
CM-A	5,164	103,283	79,983	83,587	16,573	83,018	43,803	10,575



5. TARTIŞMA

Memeli spermleri ejaküle olduklarında henüz oositi fertilize edebilme yeteneğinde değildirlir. Dişi üreme kanallarındaki göçleri sırasında fertilizasyon yeteneği kazanırlar. Spermlerin bu fonksiyonel olgunlaşma süreci kapasitasyon olarak adlandırılır [29]. *In vivo* kapasitasyon çalışmaları etik nedenlerle insanlarda yürütülememektedir. Bunun yerine, dişi üreme kanallarındaki sıvının içeriğine uygun olarak hazırlanmış kültür medyumları kullanılarak kapasitasyon *in vitro* olarak taklit edilebilir. Bu medyumlar genellikle elektrolitler (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , Mg^{+2} , Ca^{+2} , ve PO_4^{-3}), enerji substratları (glukoz, pirüvat ve laktat) ve bir kolesterol alıcısı (genellikle serum albumin) içerir [1]. Bu çalışmada, sperm fizyolojisini inceleyebilmek için daha önce tanımlanmış kimyasal içeriğe uygun şekilde hazırlanan bir kapasitatif medyum (CM) kullanılarak kapasitasyonu destekleyen koşullar oluşturulmuştur. Kapasitasyonu desteklemeyen koşullar için ise HCO_3^- ve serum albumin içermeyen, aynı zamanda daha düşük Ca^{+2} konsantrasyonuna sahip non-kapasitatif medyum (NCM) kullanılmıştır. Yapılan analizler, kullanılan CM medyumun spermlerin kapasitasyonunu arttırdığını doğrulamıştır.

Kapasitasyonun moleküler temelleri, plazma membranındaki kolesterolün uzaklaştırılması, fosfolipid bozulmasına bağlı olarak plazma membranı akışkanlığının artması, hücre içi iyon konsantrasyonunun değişmesi, plazma membranının hiperpolarizasyonu ve tirozin fosforilasyonunun artması gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere dayanır. Bu olaylar, spermin hiperaktive motilite kazanmasında ve akrozom reaksiyonu geçirmesinde önemli rol oynar [2].

Kapasitasyon sürecinde hücre içine HCO_3^- alınması önemli bir adımdır [35]. HCO_3^- sperm plazma membranındaki NBC'ler aracılığı ile hücre içine taşınır ve burada atipik adenilil siklazı aktive ederek cAMP üretimine yol açar [86]. Ayrıca sitoplazmanın alkalizasyonuna ve plazma membranının hiperpolarizasyonuna neden olur [1]. Sperimde bulunan CFTR de hücre içine HCO_3^- ü ileten bir kanal proteindir. CFTR gen mutasyonlarının erkeklerde infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. Bu kanal inhibe edildiğinde, hücre içi pH, cAMP üretimi ve membran hiperpolarizasyonu gibi HCO_3^- ile ilişkili olayların azaldığı bildirilmiştir [128].

cAMP'nin hücre içindeki en iyi tanımlanmış hedefi PKA'dır. PKA, spermelerde motiliteyi, kapasitasyonu, akrozomal membrandaki ve plazma membranındaki biyokimyasal değişiklikleri ve fertilizasyonu düzenleyerek sperm fizyolojisinde merkezi bir rol oynar [41]. PKA hücre içindeki diğer kinazlarla iş birliği içerisinde fonksiyon gösterir. Bu kinazlardan biri de AMPK'dır [214].

AMPK, farklı uyarılarla aktive edildiğinde hem hücresel düzeyde hem de tüm vücut düzeyinde enerji homeostazisini düzenleyen ve hücresel enerji durumunun sensörü olarak işlev gören bir kinazdır [191]. Testiste sperm üretimi ile ejakülasyondan sonra sperm fonksiyonu ve kalitesi için enerji dengesinin doğru bir şekilde düzenlenmesi gereklidir. Bu anlamda AMPK hipotalamus-hipofiz-gonadal eksenini enerji dengesi ile bağlayarak üreme fonksiyonunu fizyolojik olarak düzenler [12]. Ayrıca, sperm düşük enerji ve düşük oksijen miktarı içeren ekstraselüler ortam dalgalanmalarına adaptasyon sağlamasına yardımcı olur [217]. Bu nedenle AMPK sperm fonksiyonlarının gerekli kontrolünü yapan yeni bir sinyal yolağı olarak ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda, AMPK aktivasyonunun insan sperm fizyolojisi ile ilişkisi incelenmiştir. AMPK'nın aktivasyonu α -alt ünitesinin treonin 172 bölgesinden fosforilasyonu ile gerçekleştiği için [191] hücrelerdeki p-Thr172 AMPK konsantrasyonu ölçülmüş ve kapasite olmuş spermelerde AMPK aktivitesinde anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur. Çalışmada elde edilen bulgular, domuz sperminde kapasitasyon sırasındaki hücre içi cAMP artışının, PKA aktivasyonu aracılığıyla AMPK aktivitesinin hızla artmasına neden olduğunun bildirildiği Hurtado de Llera ve diğerlerinin (2014) çalışması ile uyumlu bulunmuştur [214]. Kapasitasyon sırasında gözlemlenen AMPK aktivitesi artışına ilişkin PKA tarafından direkt aktivasyon dışındaki olası bir mekanizmanın cAMP degradasyonunun düzenlenmesi olabileceği düşünülmüştür. Çünkü hücre içi cAMP miktarı arttıktan sonra, fosfodiesterazlar cAMP'yi 5'AMP'ye degrade ederek bu habercinin düzeyini hızla bazal seviyeye döndürürken, ortaya çıkan 5'AMP da AMPK'yı aktive eder. Bu nedenle, kapasitatif medyumdaki hücre içi cAMP miktarının artmasına neden olan HCO_3^- gibi bir uyarın, PKA'nın direkt aktivasyonu yoluyla veya fosfodiesterazların indükleyici etkisiyle allosterik olarak ya da her iki mekanizmanın da katılımıyla birden AMPK'yı aktive etmiş olabilir [214]. AMPK aktivasyonunun ayrıca Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış ile de uyarıldığı bilinmektedir [205]. Dolayısıyla çalışmada

kapasitatif medyuma eklenen yüksek konsantrasyondaki Ca^{+2} 'nin spermelerde gözlenen AMPK aktivitesindeki artışın bir diğer nedeni olabileceği düşünülmüştür.

Olgun memeli spermde AMPK'nın varlığı ilk defa 2012 yılında domuzda ve farede bildirilmiştir [194, 201]. Daha sonra, aygır [203], rat [218], keçi [210] ve insan [209, 213] spermde AMPK ekspresyonu gösterilmiştir. AMPK'nın domuz spermde tüm akrozomda ve kuyruğun esas parçasında lokalize olduğu gözlenmiştir. Bu türlerde, AMPK aktif forma dönüştüğünde orta parçadaki varlığını devam ettirirken akrozom bölgesinde en apikal kısım ve subekvatoryal segment ile sınırlandırılmıştır [205]. Aygır spermde, aktif AMPK esas olarak baştaki subekvatoryal bölgede ve kuyruğun orta parçasında gözlenmiştir [203]. İnsan spermde inaktif AMPK akrozomun tamamı ve kuyruğun tamamında bulunurken, aktif formunun ise akrozomun yalnızca en apikal kısmında ve kuyruk boyunca bulunduğu bildirilmiştir [209, 213]. Bu lokalizasyonlar AMPK'nın sperm motilitesinde ve akrozom reaksiyonunda olası bir role sahip olabileceğini göstermiştir.

Bir enerji düzenleyici protein olarak AMPK spermde mitokondriyal membran potansiyelin (DYm) korunmasına katkıda bulunan önemli bir yolak olarak belirtilmiştir [205]. $\alpha 1$ AMPK nakavt farelerin spermde DYm ve mitokondri sayısı azalmıştır [14]. Domuzlarda A769662 kullanılarak AMPK kısa süreli aktive edildiğinde, Ca^{+2} ve HCO_3^- ile uyarılmış, yüksek DYm'ye sahip sperm sayısındaki azalma engellenmiştir [207]. AMPK'nın indirekt aktivatörü olan resveratrol, donmuş çözölmüş insan spermde DYm'yi önemli ölçüde arttırmıştır [209]. AMPK'nın spermde DYm'nin düzenlenmesi ile ilişkisi, memeli spermde mitokondrielerin bulunduğu orta parçada önemli miktarda aktif AMPK'nın lokalizasyonunun gösterilmesi ile de desteklenmiştir [205, 210, 213].

AMPK'nın sperm motilitesine katılımı, farelerde [14, 208] ve domuzlarda [201] bağımsız olarak yürütülen farklı deneysel yaklaşımlarla gösterilmiştir. Farelere ait haploid spermatidlerde AMPK ile ilişkili kinaz LKB1 izoformunun ekprese edildiği gösterilmiş, LKB1 nakavt farelerin epididimisinde olgun sperm sayısının anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir. Üretilen spermde ise hareketli olmadığı, bu nedenle bu farelerin infertil oldukları bulunmuştur [208]. Katalitik alt ünite $\alpha 1$ geninden yoksun transgenik farelerde ($\alpha 1$ AMPK nakavt) sperm hareketliliğinde belirgin bir azalma gözlenmiştir [14]. Domuz spermde CC ile AMPK inhibisyonunun, hareketli sperm yüzdesini ve sperm hızını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir [201]. Benzer şekilde insan spermde hareketli

spermlerde AMPK aktivitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir [200]. AMPK aktivatörü A769662 kullanılarak, AMPK aktivitesinin fizyolojik seviyelerin üstüne arttırılmasının ise domuz [207] ve insanda [213] sperm motilitesini olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu nedenle, sperm AMPK aktivitesinin yukarı veya aşağı dalgalanmalarının memeli sperm motilitesinde negatif bir rol oynadığı öne sürülmüştür.

Bu çalışmada AMPK aktivatörü olarak, etkisi *in vivo* ve *in vitro* olarak çeşitli insan somatik hücreleri ile keçi ve tavuk spermlerinde gösterilmiş olan farmakolojik ajan AICAR kullanılmıştır [204, 210, 219, 220]. Literatürde 2 mM AICAR'ın hücrelerdeki AMPK aktivitesini etkili bir şekilde arttırdığı bildirildiğinden [204, 210, 219, 220], deney medyumlarına 2 mM final konsantrasyonda AICAR eklenmiştir. Kullanılan AICAR dozunun sperm canlılığı üzerinde pozitif veya negatif bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. AICAR'ın hem kapasite olmamış hem de kapasite olmuş spermlerin AMPK aktivitesinde anlamlı bir artışa neden olduğu saptanmıştır.

ENaC'lar, esas olarak transepitelyal Na^+ transportunun gerçekleştiği çeşitli epitel hücrelerinin luminal membranlarında eksprese edilerek vücudun tuz dengesinin ve normal kan basıncının korunmasını sağlayan Na^+ kanallarıdır. Fonksiyonel kanallar, trimerik homo ya da heterooligomerler şeklinde bir araya gelmiş α (veya δ), β , ve γ alt birimlerinden oluşurlar [221]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ENaC'ların spermlerde de bulunduğu bildirilmiştir.

Fare sperminde kuyruğun orta parçasında ENaC- α 'nın, akrozomda ise ENaC- δ 'nin eksprese olduğu gösterilmiştir [5]. ENaC'ların rat testislerindeki germ hücrelerinde sitoplazmada, epididimisten izole edilen olgun spermlerde ise kuyruğun esas parçasında ve akrozomda lokalize olduğu rapor edilmiştir [8]. İnsan sperminde, immunofloresan yöntemiyle kuyruğun orta parçasında ENaC- α alt ünitesinin eksprese edildiği [9], western blot yöntemiyle hücrelerde ENaC- β alt ünitesinin de bulunduğu gösterilmiştir [10]. Bizim çalışmamızda insan sperminde ilk kez immunofloresan yöntemiyle ENaC- β alt biriminin lokalizasyonu incelenmiştir. ENaC- β 'nin özellikle kuyruğun esas parçasında lokalize olduğu bulunmuştur. Normal morfolojiye sahip spermlerde orta parçanın genellikle ENaC- β -negatif olması, çalışmamızı insan sperminde ENaC lokalizasyonunun gösterildiği tek çalışma olan Kong ve diğerlerinin (2008) çalışmasından [9] ayırmaktadır. Söz konusu çalışmada ENaC- α alt biriminin sperimde yalnızca kuyruğun orta parçasında bulunduğu

bildirilmiştir. ENaC'ların α , β ve γ alt birimlerinden oluşan trimerik kanallar oldukları ve membrandaki kanal ekspresyonunun her üç alt birime bağlı olduğu göz önüne alındığında, α ve β alt birimlerinin lokalizasyonlarının benzer olması beklenmektedir. Çalışmamız bu bakımdan rat spermindeki ENaC- α lokalizasyonu [8] ile örtüşmektedir.

Çalışmamızda çeşitli baş ve kuyruk anomalilerine sahip spermlerdeki ENaC- β lokalizasyonu da incelenmiştir. Baş anomalilerine sahip spermlerle sağlıklı spermler arasında ENaC- β lokalizasyonu bakımından herhangi bir fark gözlenmemiştir. Proksimal sitoplazmik droplet içeren spermlerde sitoplazmik droplette kuvvetli immunoreaksiyon izlenmiştir. Sitoplazmik dropletteki bu lokalizasyon, rat testislerindeki germ hücrelerinde (spermatogonyumlar, spermatosit ve spermatidlerde) ENaC alt birimlerinin sitoplazmik havuzlarda bulunması ile açıklanabilir [8]. Olgun spermler transkripsiyonel olarak sessiz olduğundan kuyrukta lokalize olan alt birimlerin kaynağının bu sitoplazmik havuzlar olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde yer alan bulgular ile birlikte bu çalışmanın sonuçları, olgun spermdeki lokalizasyonları nedeniyle ENaC'ların sperm motilitesinde görev alıyor olabileceğini göstermiştir. Çalışmada ayrıca AMPK aktivitesindeki artışın hem non-kapasitatif hem de kapasitatif ortamda sperm ileri hareketliliğini arttırdığı gözlenmiştir. Kapasite olmamış spermlerde AMPK'nın motilite üzerindeki etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu spermlerde ileri hareketlilik ~%35 iken AMPK aktivasyonu ile ~%55'e ulaşmıştır. AMPK'nın sperm motilitesi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu bulgusu, bu sperm fonksiyonunun hücrenin enerji düzeyine bağlı olması ve AMPK'nın hücresel enerjiyi düzenleyen bir kinaz olması [200] ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca literatürde ENaC'lar inhibe edildiğinde sağlıklı bireylere ve astenozoospermik hastalara ait spermlerde motilitenin arttığı bildirildiğinden [9], çalışmada gözlenen ileri hareketlilikteki artışın AMPK aktivasyonuna bağlı membrandaki ENaC azalması ile de ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Epitelyal hücrelerdeki ENaC aktivitesi, kanal açıklığının ve hücre membranındaki ENaC miktarının değiştirilmesi olmak üzere iki yolla düzenlenir. Kanal açıklığının düzenlenmesi ENaC alt birimlerinin kinazlar tarafından direkt olarak fosforile edilmesiyle gerçekleşir. Bu fosforilasyon olayları kanalın açılmasına neden olarak aktivitesini uyarabilir ya da kapanmasını sağlayarak kanalı inhibe edebilir. Plazma membranındaki kanal miktarının

düzenlenmesi ise, ENaC alt birimlerine ubiquitin konjuge eden Nedd4-2'nin fosforilasyonu ile gerçekleşir. Fosforilasyon, Nedd4-2'nin kanal alt birimleri ile etkileşimini azaltabilir, bu durumda membrandaki kanal miktarı ve hücre içi Na⁺ konsantrasyonu artar. Nedd4-2-ENaC bağlanmasını arttıran fosforilasyonlar ise kanalın endositozunun arttırarak membrandaki ekspresyonunun ve hücre içi Na⁺ konsantrasyonunun azalmasına yol açar [11].

Kanal aktivitesinin düzenlenmesinde SGK1, PKA, PKB, IKK β , PKC, PKD1, ERK1/2, CK2 ve GRK2 gibi çok sayıda kinazın dahil olduğu sinyal yolları görev alır [11]. Literatürde AMPK aktivasyonunun da ENaC inhibisyonu ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, ENaC eksprese eden oositlere aktif AMPK proteinin veya AMPK aktivatörünün mikroenjeksiyonu, ENaC'ları inhibe etmiştir. Benzer şekilde fare toplama kanalı hücrelerinde farmakolojik AMPK aktivasyonu da ENaC inhibisyonuna neden olmuştur. Bununla birlikte bu hücrelerde AMPK aktivasyonu kanal açıklığı ya da iletkenliğini etkilememiştir. Bu bulgular, AMPK'ya bağlı ENaC inhibisyonunun, plazma membranındaki aktif kanalların sayısının azalması yoluyla gerçekleştiğine dair ilk kanıtlardır [17].

Dominant-negatif ve sürekli aktif Nedd4-2 mutantlarını eksprese eden oositlerde AMPK'nın ENaC'ı inhibe edemediği gösterilmiştir [174]. Benzer deneyler SGK1, PKA ve ERK mutantları kullanılarak yapıldığında, AMPK tarafından ENaC inhibisyonu etkilenmemiştir. Dolayısıyla Nedd4-2-ENaC etkileşimini düzenleyen bu yolların Nedd4-2'nin AMPK'ya bağlı fosforilasyonundan sorumlu olmadıkları ortaya konmuştur. Benzer şekilde insan embriyonik böbrek hücrelerinde AMPK hem *in vitro* hem *in vivo* olarak Nedd4-2'yi fosforile etmiş, hücresel AMPK aktivasyonu bu hücrelerde ENaC- β alt ünitesi ile Nedd4-2 arasındaki etkileşimde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar, AMPK'nın ENaC-Nedd4-2 etkileşimini arttırarak, plazma membranındaki ENaC miktarını azaltma yoluyla ENaC'ları inhibe ettiğini göstermiştir [174].

AMPK'nın ENaC'ları inhibe etmek için Nedd4-2'yi kullandığı, bu sayede ENaC ubiquitinasyon ve endositozunun arttırdığı farelerde *in vivo* olarak da gösterilmiştir. AMPK α 1^{-/-} farelerin solunum yolları, böbrek ve kolon epitelinde ENaC inhibisyonunun gerçekleşmediği bulunmuştur. Bu farelerde elektrojenik Na⁺ emilimi artmış ve buna bağlı olarak intestinal ve renal işlevlerde değişiklikler ortaya çıkmıştır [15]. Benzer şekilde,

AMPK'nın $\beta 1$ alt ünitesinin silindiği AMPK- $\beta 1^{-/-}$ farelerde üriner Na^+ salınımının arttığı belirlenmiştir. AMPK'nın bu etkisinin ENaC- β alt ünitesinin ekspresyonundaki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [176].

AMPK aktivatörleri fenformin ve AICAR, akciğer epitel hücrelerinde ENaC inhibisyonuna neden olarak hücrelere apikal Na^+ girişini engellemiştir [16]. İnsan kistik fibrozis bronşiyal epitel hücrelerinde metformin ve AICAR ENaC'ı inhibe etmiştir [179]. Resveratrol fare böbrek kortikal toplama kanalı hücrelerinde ENaC aktivitesini inhibe etmiştir [177]. Metformin, insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde α -, β -, and γ -ENaC ekspresyonunu azaltmıştır [178]. Bu çalışmalar, AMPK'nın farmakolojik olarak aktive edildiğinde ENaC aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir.

Çalışmamızda ilk defa spektrofotometrik yöntemle spermlerdeki ENaC- β proteininin konsantrasyonu ölçülmüştür. Kapasitasyon sırasında hücrelerdeki ENaC- β miktarında anlamlı bir azalma meydana geldiği bulunmuştur. Bu bulgu kapasitatif koşullarda hücrelerdeki AMPK aktivitesinin artması ile korelasyon göstermiştir. Ayrıca AICAR ile AMPK aktivasyonu hem kapasite olmamış hem de kapasite olmuş spermelerde ENaC- β konsantrasyonunun azalmasına neden olmuştur. Sonuçlar, immunofloresan yöntemiyle de desteklenmiştir. AMPK aktivasyonu sonucu kapasite olmuş ve kapasite olmamış spermelerin kuyruk esas parçasındaki ENaC- β immunoreaksiyonunun azaldığı gözlenmiştir. İncelenen baş ve kuyruk anomalilerine sahip spermelerde inkübasyon medyumundan bağımsız olarak değişen yoğunluklarda ENaC- β immunoreaksiyonu izlendiği için AMPK aktivitesinin bu spermelerdeki etkisinin daha detaylı araştırmalar ile ortaya konması gerektiği düşünülmüştür.

Kapasitasyon sırasında hücrelerdeki ENaC- β konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak gerçekleşen ENaC kanal inhibisyonuna ilişkin bulgularımız, spermelerdeki hücre içi Na^+ miktarı ölçülerek doğrulanmıştır. Kapasite olmuş spermelerdeki hücre içi Na^+ konsantrasyonunda kapasite olmamış spermelere kıyasla anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu bulguların, kapasite olmuş spermelerde hücre içi Na^+ konsantrasyonun daha düşük olduğunun bildirildiği çalışma ile [80] bağdaştığı görülmüştür. Epitelial hücrelerde CFTR'nin ENaC- β veya ENaC- γ alt ünitelerini içeren Na^+ kanallarını, özellikle kanalın kapalı durumdaki zamanını uzatarak negatif olarak düzenlediği bildirilmiştir [222]. Dolayısıyla, spermeler HCO_3^- yokluğunda inkübe edildiğinde CFTR aktif olmadığı için

ENaC'ın açık olacağı tahmin edilmektedir [10]. Bu nedenle çalışmamızda gözlenen kapasitasyon sırasında ortaya çıkan hücre içi Na^+ miktarı değişikliğinin CFTR aktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Çalışmamızda kapasite olmuş hücrelerde aynı zamanda AMPK aktivitesinin de arttığı bulunması, kapasitasyon sırasındaki Na^+ azalmasının, CFTR dışında AMPK aktivasyonuna da bağlı olabileceğini göstermiştir. Nitekim, AICAR uygulamasının hem kapasite olmuş hem de kapasite olmamış spermelerde hücre içi Na^+ miktarının azalmasına yol açtığı gözlenmesi AMPK'nın Na^+ transportundaki rolüne ilişkin bir kanıt olarak değerlendirilmiştir.

Spermin kapasite olabilmesi için plazma membran potansiyelinin hiperpolarize olması gerekmektedir [2]. Fare, sığır, at ve insan spermelerinde kapasitasyon sırasında plazma membranının hiperpolarize olduğu gösterilmiştir [2, 78-81]. İnsan sperminde plazma membran potansiyelindeki değişikliklerin fertilité ile ilişkili olduğu [73, 82], idiyopatik ve astenozoospermik infertil erkeklerin fertil erkeklerden daha depolarize membran potansiyeline sahip oldukları [83] ve depolarizasyonun subfertil erkeklerdeki düşük IVF başarı oranı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir [84].

Hiperpolarizasyon, spermdeki hücre içi net negatif yük konsantrasyonunun artması sayesinde gerçekleşir [81]. NBC ve CFTR kanalları ile hücre içindeki HCO_3^- miktarının artırılması hiperpolarizasyona neden olur [35, 128]. Bundan başka K^+ geçirgenliğinin artması ve Na^+ geçirgenliğinin azalması da insan sperminde hiperpolarizasyona neden olabilir [87]. Fare sperminde hiperpolarizasyonun esas olarak Slo3 K^+ kanallarının aktivitesinden kaynaklandığı [90], insan sperminde ise hem Slo3 hem de Slo1 K^+ kanallarının hiperpolarizasyonda görev aldıkları bildirilmiştir [81]. K^+ kanallarının hiperpolarizasyona katılımıyla ilgili çok sayıdaki kanıta rağmen, literatürde Na^+ 'nın ve Na^+ kanallarının insan sperm fizyolojisinin düzenlenmesindeki rolü ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır.

İnkübasyon medyumuna Na^+ yerine membrandan geçemeyen bir katyon olan N-metil-glukamin eklendiğinde, farelerde sperm plazma membranının hiperpolarize olduğu, hücre dışı Na^+ yeniden eklendiğinde, membranın depolarize olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, fare sperminde aktif bir elektrojenik Na^+ iletim sisteminin bulunduğunu işaret etmiştir [80]. Voltaj kapılı Na^+ kanalı Na_v , veratridin ile aktive edildiğinde plazma membranının depolarizasyonuna neden olmuştur [4]. Amilorid ve EIPA tarafından ENaC'ların

kapatılması, fare sperminde plazma membranının hiperpolarizasyonuna yol açmıştır. Kapasitasyonu indüklediği bilinen maddelerle veya cAMP analogları ile inkübasyonun ardından hücre dışı Na^+ tarafından indüklenen depolarizasyon azalmıştır [5]. Bu sonuçlar, kapasitasyon sırasında ortaya çıkan cAMP artışının, sperm plazma membranının hiperpolarizasyonu için ENaC'ları inhibe edebileceğini göstermiştir. Ayrıca, kapasite olmamış fare sperminde, ENaC inhibitörü amilorid hücre içi Na^+ konsantrasyonunun azalmasına neden olmuştur. PKA inhibisyonu ise kapasite olmuş spermelerde hücre içi Na^+ konsantrasyonundaki azalmayı inhibe ettiği için, kapasitasyon ile ilişkili hiperpolarizasyonun, ENaC'ın inhibisyonu ile ilişkili olduğu ve cAMP/PKA sinyal yolağı ile düzenlendiği sonucuna varılmıştır [10, 80].

Bu çalışmada ilk defa AMPK aktivasyonunun ENaC inhibisyonu aracılığıyla plazma membranının hiperpolarizasyonuna etki edip etmediği araştırılmıştır. Sperm kapasitasyonu destekleyen koşullar altında inkübe edildiğinde, non-kapasitatif koşullara kıyasla plazma membran potansiyelinin hiperpolarizasyonunda anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu medyuma eklenen HCO_3^- 'e bağlı olarak membrandaki NBC ve olasılıkla CFTR kanalları aracılığıyla hücre içi negatif yükün artırılması [37] ile tutarlı bulunmuştur. Ayrıca kapasitasyon sırasında artmış AMPK aktivitesinin de hücre içi Na^+ konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak hiperpolarizasyonu indüklemiş olabileceği düşünülmüştür. NCM ve CM medyumlara eklenen AICAR ile inkübe edilmiş spermelerin kontrollere kıyasla daha hiperpolarize plazma membranına sahip olduklarının gösterilmesiyle bu hipotez doğrulanmıştır.

Sperm hiperpolarizasyonunun tek başına fare sperminin akrozom reaksiyonuna uğramasında kilit bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Na_v kanallarının veratridin ile aktivasyonu, plazma membranının depolarizasyonuna neden olmuştur. Veratridin tek başına akrozom reaksiyonu üzerinde etkili olmazken, progesteron ile indüklenen akrozom reaksiyonunu bloke etmiştir [4]. ENaC inhibitörü amilorid, CFTR agonisti genistein ve K^+ iyonoforu valinomisin kapasite olmamış spermde hiperpolarizasyonu indüklemiştir. Bu deneysel ortamda, cAMP'ye bağlı yolağın aktivasyonu ve bunun sonucunda protein tirozin fosforilasyonunda artış gibi diğer kapasitasyonla ilişkili diğer olaylar gözlenmezken, spermi ZP ile indüklenmiş akrozom reaksiyonuna hazırlamak için hiperpolarizasyon yeterli olmuştur. Kapasitasyonu destekleyen medyuma valinomisin eklenmesiyle

hiperpolarizasyon engellendiğinde ise agonist ile indüklenmiş akrozom reaksiyonu inhibe olmuştur [2].

Kapasitasyon sırasında sperm popülasyonun küçük bir kısmının spontan akrozom reaksiyonuna uğradığı bilinmektedir [86]. Bu nedenle çalışmamızda akrozom reaksiyonunu indükleyici bir agonist kullanılmadan, AMPK aktivasyonu ve beraberinde gerçekleşen ENaC inhibisyonunun spontan akrozom reaksiyonuna etkisi değerlendirilmiştir. AMPK aktivasyonunun tek başına hücrelerin spontan olarak akrozom reaksiyonuna girmesinde indükleyici bir etkiye sahip olmadığını bulunmuştur. Kapasitatif ve non-kapasitatif koşullarda AMPK aktivasyonu sonucu ENaC- β reaktivitesinin azaldığı spermelerin bir kısmında akrozom reaksiyonunun tamamlandığı gözlenirken, çoğu spermde akrozomun hala intakt olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla literatürün aksine spermlerdeki ENaC- β miktarının azalması ve buna bağlı olarak plazma membranı hiperpolarizasyonunun hücrelerin spontan akrozom reaksiyonu geçirmesinde tek başına etkili olmadığı belirlenmiştir. Progesteron, Ca^{+2} iyonofor A23187 veya ZP gibi indükleyicilerin kullanılmamış olması çalışmamızın bir eksikliği olarak görülebilir. Ancak, kapasite olmuş domuz spermelerinde AMPK inhibisyonunun A23187 ile indüklenen akrozom reaksiyonunu etkilemediği bildirilmiştir [205]. Benzer şekilde fare spermelerinde AMPK'nin indirekt aktivatörü olan metforminin akrozom reaksiyonunu etkilemediği [212] ve insan spermelerinde AMPK aktivatörü A769662'nin akrozomal membran bütünlüğünde ölçülebilir bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir [200]. Çalışmamız bu çalışmalar ile birlikte değerlendirildiğinde, AMPK akrozomal membran bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamasına rağmen farmakolojik olarak AMPK aktivasyonunun spermde akrozom reaksiyonu sürecine dahil olmadığı anlaşılmaktadır. Bununla birlikte A769662 aracılığıyla 24 saat boyunca devam eden AMPK aktivasyonunun dış akrozomal membran bütünlüğünde önemli bir kayba neden olduğu [214] gösterildiği için etkinin stimülasyon süresine bağlı olduğu ve çalışmamızda uygulanan 4 saatlik aktivasyonun akrozom reaksiyonunu indüklemek için yetersiz kaldığı düşünülebilir.

Spermelerin fizyolojik yeterliliklerinin kazanılması gen transkripsiyonu ya da translasyonundan bağımsızdır. Kapasitasyon sırasındaki sperm fonksiyonellik kazanımı esas olarak önceden var olan proteinlerin post-translasyonel sonrası modifikasyonlarına bağlıdır [205]. Kapasitasyon sırasındaki post-translasyonel değişikliklerden biri de spermdeki tirozin fosforilasyonunun global olarak yükselmesidir. Tirozin

fosforilasyonunun, fare, domuz, bufalo ve insan gibi memeli türlerinde kapasitasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [223]. Sperm proteinlerinin tirozin fosforilasyonunun artması, genellikle kapasitasyonun geç evresinin bir işareti olarak kabul edilir. Tirozin fosforilasyonunun seviyesi, spermin ZP'ye bağlama kapasitesi ile büyük oranda korelasyon gösterir [224]. Subfertil erkeklerin spermlerinde tirozin fosforilasyonunda değişiklikler görülmesi [225, 226] fosforilasyonun fertilizasyondaki fizyolojik rolünü göstermektedir.

Özellikle serum albumin, HCO_3^- ve Ca^{+2} 'nin tirozin fosforilasyonu için gerekli olduğu görülmüş, bu faktörlerin hiçbiri bulunmadığında hem tirozin fosforilasyonunun hem de kapasitasyonun inhibe olduğu gözlenmiştir [227]. Medyuma Na^+ yerine, membrandan geçemeyen bir katyon olan kolin eklendiğinde, fare sperminde HCO_3^- 'e bağlı hiperpolarizasyon ve kapasitasyon ile ilişkili protein tirozin fosforilasyonundaki artış engellenmiştir. Bu bulgular, fare sperminde NBC'nin kapasitasyonun düzenlenmesinde görev aldığını göstermiştir [35]. Ancak literatürde insan sperminde ENaC'ların kapasitasyondaki rolüne ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, insan spermlerinde tirozin fosforilasyonu ölçülerek AMPK aktivasyonu ve ENaC inhibisyonunun kapasitasyondaki rolü araştırılmıştır. Elde edilen bulgular literatürle uyumlu olarak kapasitasyonu destekleyen medyuma inkübe edilmiş spermlerde kapasitasyonun arttığını göstermiştir. AICAR ile AMPK aktivitesi indüklendiğinde, tirozin fosforilasyonunda anlamlı bir artış gerçekleşmiştir. AICAR'ın bu etkisi kapasitasyonun desteklenmediği, yani ortamda HCO_3^- 'ün bulunmadığı koşullarda da kapasitatif koşullardaki kadar belirgin olarak gözlenmiştir. Yani AMPK aktivasyonu tek başına spermler için kapasitatif bir ortam oluşturmuştur. AMPK'nın membrandaki ENaC miktarının azalmasına, hücre içi Na^+ konsantrasyonunun azalmasına ve buna paralel olarak plazma membranının hiperpolarizasyonuna yol açmış olması, kapasitasyonu indüklemekteki başarısını açıklamaya yardımcı olabilir. Bunun yanında, literatürde sperm tirozin fosforilasyonundaki artışın PKA'nın dahil olduğu bir yolak tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. Bu yolakta medyuma eklenen HCO_3^- hücre içindeki cAMP miktarını arttırmakta, bu da PKA aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktive olan PKA sonunda proteinlerin tirozin fosforilasyonuna yol açmaktadır [35]. AMPK, hücre içinde PKA ile ilişkili bir protein olmakla birlikte literatürde yer alan çalışmalardaki genel kanı AMPK'nın PKA tarafından aktive ya da inhibe edildiği yönündedir. Bunun yanında az sayıdaki çalışmada AMPK'nın da PKA aktivitesine etki ettiği gösterilmiştir. Örneğin, rat

primer vasküler düz kas hücrelerinde AMPK ile PKA arasında sinerjistik bir ilişki olduğu bildirilmiş, AICAR'ın bu hücrelerde AMPK aktivasyonunun yanında PKA aktivasyonuna da neden olduğu gösterilmiştir [228]. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda, AMPK'nın tirozin fosforilasyonu üzerindeki indükleyici etkisinin altında yatan PKA'ya bağlı mekanizmaların da araştırılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan sperminde ENaC kanallarının AMPK aktivasyonuna bağlı inhibisyonunun sperm fizyolojisindeki rolünün araştırıldığı çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre;

AICAR'ın spermdeki AMPK aktivitesini arttırdığı, AMPK aktivasyonunun hücre canlılığına etki etmediği ve spermde özellikle kuyruğun esas parçasında lokalize olduğu gösterilen ENaC- β konsantrasyonunun azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. ENaC- β konsantrasyonundaki azalmaya, hücre içi Na⁺ miktarının azalması ve buna bağlı olarak plazma membranının hiperpolarizasyonunun eşlik ettiği görülmüştür. Bu *in vitro* deneysel ortamda sperm ileri hareketliliğinde ve kapasitasyonda belirgin bir artış meydana gelmiştir. Tüm bu etkiler non-kapasitatif koşullarda da kapasitatif koşullarda olduğu kadar belirgin olarak gözlenmiştir. AMPK aktivitesindeki artışın ve beraberindeki ENaC- β inhibisyonunun spermilerin spontan akrozom reaksiyonuna girmesinde ise indükleyici bir etkisi olmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, ENaC kanallarının AMPK aracılı inhibisyonunun insan sperminin fizyolojisinin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle insan sperminin fertilizasyon yeteneği kazanmasına ilişkin yeni bir mekanizmanın varlığını ortaya koyan bu çalışmanın sperm fizyolojisinin aydınlatılması konusunda literatüre sağlayacağı katkının önemli olduğu düşünülmektedir. Sperm plazma membranının hiperpolarizasyonuna katkıları nedeni ile ENaC ve AMPK'nın, depolarize sperm membran potansiyeli kaynaklı azalmış IVF başarısının artırılmasında etkili rol oynayabilecek moleküller olduğu düşünülmüş olup; yapılacak daha ileri çalışmalar ile desteklenerek bu molekülleri hedef alan ajanların IVF tedavisinde kullanımlarının uygun olabileceği kanısına varılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Puga Molina, L.C., Luque, G.M., Balestrini, P.A., Marin-Briggiler, C.I., Romarowski, A. and Buffone, M.G. (2018). Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Front Cell Dev Biol*, 6, 72.
2. De La Vega-Beltran, J.L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E.O., Wertheimer, E., Treviño, C.L., Visconti, P.E. and Darszon, A. (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 44384-44393.
3. Lishko, P.V. (2016). Contraception: Search for an Ideal Unisex Mechanism by Targeting Ion Channels. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(10), 816-818.
4. Candenas, L., Pinto, F.M., Cejudo-Román, A., González-Ravina, C., Fernández-Sánchez, M., Pérez-Hernández, N., Irazusta, J. and Subirán, N. (2018). Veratridine-sensitive Na⁺ channels regulate human sperm fertilization capacity. *Life Sciences*, 196, 48-55.
5. Hernández-González, E.O., Sosnik, J., Edwards, J., Acevedo, J.J., Mendoza-Lujambio, I., López-González, I., Demarco, I., Wertheimer, E., Darszon, A. and Visconti, P.E. (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5623-5633.
6. Awayda, M.S. (1999). Regulation of the epithelial Na⁽⁺⁾ channel by intracellular Na⁽⁺⁾. *American Journal of Physiology*, 277(2), C216-224.
7. Bhalla, V. and Hallows, K.R. (2008). Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(10), 1845-1854.
8. Sharma, S., Hanukoglu, A. and Hanukoglu, I. (2018). Localization of epithelial sodium channel (ENaC) and CFTR in the germinal epithelium of the testis, Sertoli cells, and spermatozoa. *Journal of Molecular Histology*, 49(2), 195-208.
9. Kong, X.B., Ma, H.G., Li, H.G. and Xiong, C.L. (2009). Blockade of epithelial sodium channels improves sperm motility in asthenospermia patients. *International Journal of Andrology*, 32(4), 330-336.
10. Puga Molina, L.C., Pinto, N.A., Torres, N.I., Gonzalez-Cota, A.L., Luque, G.M., Balestrini, P.A., Romarowski, A., Krapf, D., Santi, C.M., Trevino, C.L., Darszon, A. and Buffone, M.G. (2018). CFTR/ENaC-dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC. *Journal of Biological Chemistry*, 293(25), 9924-9936.
11. Baines, D. (2013). Kinases as targets for ENaC regulation. *Current Molecular Pharmacology*, 6(1), 50-64.
12. Bertoldo, M., Faure, M., Dupont, J. and Froment, P. (2015). AMPK: a master energy regulator for gonadal function. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 235.

13. Nguyen, T.M.D. (2017). Impact of 5'-amp-activated protein kinase on male gonad and spermatozoa functions. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 25.
14. Tartarin, P., Guibert, E., Touré, A., Ouiste, C., Leclerc, J., Sanz, N., Brière, S., Dacheux, J.-L., Delaleu, B. and McNeilly, J.R. (2012). Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology*, 153(7), 3468-3481.
15. Almaça, J., Kongsuphol, P., Hieke, B., Ousingsawat, J., Viollet, B., Schreiber, R., Amaral, M.D. and Kunzelmann, K. (2009). AMPK controls epithelial Na⁺ channels through Nedd4-2 and causes an epithelial phenotype when mutated. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 458(4), 713-721.
16. Woollhead, A.M., Scott, J.W., Hardie, D.G. and Baines, D.L. (2005). Phenformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) activation of AMP-activated protein kinase inhibits transepithelial Na⁺ transport across H441 lung cells. *Journal of Physiology*, 566(Pt 3), 781-792.
17. Carattino, M.D., Edinger, R.S., Grieser, H.J., Wise, R., Neumann, D., Schlattner, U., Johnson, J.P., Kleyman, T.R. and Hallows, K.R. (2005). Epithelial sodium channel inhibition by AMP-activated protein kinase in oocytes and polarized renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), 17608-17616.
18. Sadler, T.W. (2011). *Langman Medikal Embriyoloji (Çev. A. C. Başaklar)*. Ankara: Palme Yayıncılık (Eserin orijinali 2010'da yayımlandı). 13-30.
19. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2014). *Histoloji, Konu Anlatımı ve Atlas (Çev. B. Baykal)*. Ankara: Palme Yayıncılık (Eserin orijinali 2011'de yayımlandı). 784-830.
20. Moore, K.L. and Persaud, T.V.N. (2008). *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. (Çev. H. Dalçık ve M. Yıldırım)*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. (Eserin orijinali 2007'de yayımlandı). 15-41.
21. Jonge, C.J.D. and Barratt, C.L.R. (2006). *The Sperm Cell, Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. New York: Cambridge University Press. 1-372.
22. Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş (Çev. R. Demir)*. Ankara: Palme Yayıncılık (Eserin orijinali 2002'de yayımlandı). 529-564.
23. Boussouar, F. and Benahmed, M. (2004). Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15(7), 345-350.
24. Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E. and Oliveira, P.F. (2012). Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol*, 9(6), 330-338.
25. Sutovsky, P. (2003). Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microscopy Research and Technique*, 61(1), 88-102.

26. Yoshinaga, K. and Toshimori, K. (2003). Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microscopy Research and Technique*, 61(1), 39-45.
27. Toshimori, K., Tanii, I., Araki, S. and Oura, C. (1992). Characterization of the antigen recognized by a monoclonal antibody MN9: unique transport pathway to the equatorial segment of sperm head during spermiogenesis. *Cell & Tissue Research*, 270(3), 459-468.
28. Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A. and Oko, R. (2003). Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique*, 61(4), 362-378.
29. Suarez, S.S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14(6), 647-657.
30. Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23(1), 193-196.
31. Demott, R.P. and Suarez, S.S. (1992). Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction*, 46(5), 779-785.
32. Teves, M.E., Guidobaldi, H.A., Unates, D.R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S.J., Morales Garcia, A.A. and Giojalas, L.C. (2009). Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PloS One*, 4(12), e8211.
33. Buffone, M.G., Rodriguez-Miranda, E., Storey, B.T. and Gerton, G.L. (2009). Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *Journal of Cellular Physiology*, 220(3), 611-620.
34. Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H. and Sugita, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 260(17), 9699-9705.
35. Demarco, I.A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J.L., Hockensmith, J.W., Kopf, G.S., Darszon, A. and Visconti, P.E. (2003). Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7001-7009.
36. Molina, L.C.P., Pinto, N.A., Torres, N.I., González-Cota, A.L., Luque, G.M., Balestrini, P.A., Romarowski, A., Krapf, D., Santi, C.M. and Treviño, C.L. (2018). CFTR/ENaC dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC. *Journal of Biological Chemistry*, 293(25), 9924-9936.
37. Puga Molina, L.C., Pinto, N.A., Torres Rodriguez, P., Romarowski, A., Vicens Sanchez, A., Visconti, P.E., Darszon, A., Trevino, C.L. and Buffone, M.G. (2017). Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalinization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. *Journal of Cellular Physiology*, 232(6), 1404-1414.

38. Jaiswal, B.S. and Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 10676-10681.
39. Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R. and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, 289(5479), 625-628.
40. Xie, F., Garcia, M.A., Carlson, A.E., Schuh, S.M., Babcock, D.F., Jaiswal, B.S., Gossen, J.A., Esposito, G., van Duin, M. and Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental Biology*, 296(2), 353-362.
41. Burton, K.A. and McKnight, G.S. (2007). PKA, germ cells, and fertility. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 22, 40-46.
42. Battistone, M.A., Da Ros, V.G., Salicioni, A.M., Navarrete, F.A., Krapf, D., Visconti, P.E. and Cuasnicu, P.S. (2013). Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 570-580.
43. Battistone, M.A., Alvau, A., Salicioni, A.M., Visconti, P.E., Da Ros, V.G. and Cuasnicu, P.S. (2014). Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 20(11), 1054-1066.
44. Carrera, A., Moos, J., Ning, X.P., Gerton, G.L., Tesarik, J., Kopf, G.S. and Moss, S.B. (1996). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Developmental Biology*, 180(1), 284-296.
45. Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J.A., Shabanowitz, J., Herr, J.C., Hunt, D.F. and Visconti, P.E. (2003). Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11579-11589.
46. Li, Y.F., He, W., Kim, Y.H., Mandal, A., Digilio, L., Klotz, K., Flickinger, C.J. and Herr, J.C. (2010). CABYR isoforms expressed in late steps of spermiogenesis bind with AKAPs and ropporin in mouse sperm fibrous sheath. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 101.
47. Arcelay, E., Salicioni, A.M., Wertheimer, E. and Visconti, P.E. (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 463-472.
48. Mitra, K., Rangaraj, N. and Shivaji, S. (2005). Novelty of the pyruvate metabolic enzyme dihydrolipoamide dehydrogenase in spermatozoa: correlation of its localization, tyrosine phosphorylation, and activity during sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25743-25753.

49. Varano, G., Lombardi, A., Cantini, G., Forti, G., Baldi, E. and Luconi, M. (2008). Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not motility in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 23(12), 2652-2662.
50. Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E.V., Sanjay, A., Pilder, S.H., Salicioni, A.M. and Visconti, P.E. (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 7977-7985.
51. Rotem, R., Paz, G.F., Homonnai, Z.T., Kalina, M. and Naor, Z. (1990). Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18), 7305-7308.
52. Naor, Z. and Breitbart, H. (1997). Protein kinase C and mammalian spermatozoa acrosome reaction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 8(9), 337-342.
53. Visconti, P.E. and Tezon, J.G. (1989). Phorbol esters stimulate cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. *Biology of Reproduction*, 40(2), 223-231.
54. de Lamirande, E. and Gagnon, C. (2002). The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Molecular Human Reproduction*, 8(2), 124-135.
55. Aquila, S., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Morelli, C., Pezzi, V. and Ando, S. (2005). Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(8), 4753-4761.
56. Mudgal, P. and Anand, S.R. (1998). Casein kinase II activity of buffalo sperm chromatin. *Molecular Reproduction and Development*, 50(2), 178-184.
57. Branham, M.T., Mayorga, L.S. and Tomes, C.N. (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8656-8666.
58. Buffone, M.G., Hirohashi, N. and Gerton, G.L. (2014). Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biology of Reproduction*, 90(5), 112.
59. Flesch, F.M. and Gadella, B.M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469(3), 197-235.
60. Martinez, P. and Morros, A. (1996). Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Frontiers in Bioscience*, 1, d103-117.
61. Daleke, D.L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research*, 44(2), 233-242.
62. Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K. and Yamamoto, T. (2011). Functions of phospholipid flippases. *Journal of Biochemistry*, 149(2), 131-143.

63. Wang, L., Beserra, C. and Garbers, D.L. (2004). A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Developmental Biology*, 267(1), 203-215.
64. Bevers, E.M. and Williamson, P.L. (2010). Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Letters*, 584(13), 2724-2730.
65. Balasubramanian, K. and Schroit, A.J. (2003). Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annual Review of Physiology*, 65, 701-734.
66. Gadella, B.M. and Harrison, R.A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127(11), 2407-2420.
67. de Vries, K.J., Wiedmer, T., Sims, P.J. and Gadella, B.M. (2003). Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biology of Reproduction*, 68(6), 2122-2134.
68. Zalata, A., Hassan, A., Christophe, A., Comhaire, F. and Mostafa, T. (2010). Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient. *International Journal of Andrology*, 33(3), 528-535.
69. Ostermeier, G.C., Cardona, C., Moody, M.A., Simpson, A.J., Mendoza, R., Seaman, E. and Travis, A.J. (2018). Timing of sperm capacitation varies reproducibly among men. *Molecular Reproduction and Development*, 85(5), 387-396.
70. Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G.W., Mandel, F.S., Hershlag, A., Scholl, G.M. and Rosenfeld, D.L. (1993). Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Human Reproduction*, 8(12), 2155-2166.
71. Visconti, P.E., Ning, X., Fornes, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A. and Kopf, G.S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental Biology*, 214(2), 429-443.
72. Ehrenwald, E., Foote, R.H. and Parks, J.E. (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Molecular Reproduction and Development*, 25(2), 195-204.
73. Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. and Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews*, 79(2), 481-510.
74. Visconti, P.E., Krapf, D., De La Vega-beltrán, J.L., Acevedo, J.J. and Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian journal of andrology*, 13(3), 395-405.
75. Okamura, N., Tajima, Y., Ishikawa, H., Yoshii, S., Koiso, K. and Sugita, Y. (1986). Lowered levels of bicarbonate in seminal plasma cause the poor sperm motility in human infertile patients. *Fertility and Sterility*, 45(2), 265-272.

76. Owen, D.H. and Katz, D.F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of Andrology*, 26(4), 459-469.
77. Borland, R.M., Hazra, S., Biggers, J.D. and Lechene, C.P. (1977). The elemental composition of the environments of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy. *Biology of Reproduction*, 16(2), 147-157.
78. Zeng, Y., Oberdorf, J.A. and Florman, H.M. (1996). pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Developmental Biology*, 173(2), 510-520.
79. Hernández-González, E.O., Treviño, C.L., Castellano, L.E., José, L., Ocampo, A.Y., Wertheimer, E., Visconti, P.E. and Darszon, A. (2007). Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24397-24406.
80. Escoffier, J., Krapf, D., Navarrete, F., Darszon, A. and Visconti, P.E. (2012). Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *Journal of Cell Science*, 125(2), 473-485.
81. López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C., Darszon, A. and Treviño, C. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 20(7), 619-629.
82. Lishko, P.V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J. and Clapham, D.E. (2012). The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annual Review of Physiology*, 74, 453-475.
83. Calzada, L. and Tellez, J. (1997). Defective function of membrane potential (ψ) on sperm of infertile men. *Archives of Andrology*, 38(2), 151-155.
84. Brown, S.G., Publicover, S.J., Mansell, S.A., Lishko, P.V., Williams, H.L., Ramalingam, M., Wilson, S.M., Barratt, C.L., Sutton, K.A. and Da Silva, S.M. (2016). Depolarization of sperm membrane potential is a common feature of men with subfertility and is associated with low fertilization rate at IVF. *Human Reproduction*, 31(6), 1147-1157.
85. Martinez-Lopez, P., Santi, C.M., Trevino, C.L., Ocampo-Gutierrez, A.Y., Acevedo, J.J., Alisio, A., Salkoff, L.B. and Darszon, A. (2009). Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(2), 204-209.
86. Escoffier, J., Navarrete, F., Haddad, D., Santi, C.M., Darszon, A. and Visconti, P.E. (2015). Flow cytometry analysis reveals that only a subpopulation of mouse sperm undergoes hyperpolarization during capacitation. *Biology of Reproduction*, 92(5), 121.
87. Santi, C.M., Martinez-Lopez, P., de la Vega-Beltran, J.L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A. and Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Letters*, 584(5), 1041-1046.

88. Munoz-Garay, C., De la Vega-Beltran, J.L., Delgado, R., Labarca, P., Felix, R. and Darszon, A. (2001). Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Developmental Biology*, 234(1), 261-274.
89. Acevedo, J.J., Mendoza-Lujambio, I., de la Vega-Beltran, J.L., Trevino, C.L., Felix, R. and Darszon, A. (2006). KATP channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Developmental Biology*, 289(2), 395-405.
90. Chavez, J.C., de la Vega-Beltran, J.L., Escoffier, J., Visconti, P.E., Trevino, C.L., Darszon, A., Salkoff, L. and Santi, C.M. (2013). Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization. *PloS One*, 8(4), e60578.
91. Miller, M.R., Mansell, S.A., Meyers, S.A. and Lishko, P.V. (2015). Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species. *Cell Calcium*, 58(1), 105-113.
92. Kaupp, U.B. and Strunker, T. (2017). Signaling in Sperm: More Different than Similar. *Trends in Cell Biology*, 27(2), 101-109.
93. Mannowetz, N., Naidoo, N.M., Choo, S.A., Smith, J.F. and Lishko, P.V. (2013). Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife*, 2, e01009.
94. Brenker, C., Zhou, Y., Muller, A., Echeverry, F.A., Trotschel, C., Poetsch, A., Xia, X.M., Bonigk, W., Lingle, C.J., Kaupp, U.B. and Strunker, T. (2014). The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife*, 3, e01438.
95. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N. and Lazdunski, M. (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27411-27414.
96. Skou, J.C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 23(2), 394-401.
97. Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sorensen, T.L., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B. and Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*, 450(7172), 1043-1049.
98. Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O. and Karlsh, S.J. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, 65, 817-849.
99. Lutsenko, S. and Kaplan, J.H. (1993). An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry*, 32(26), 6737-6743.
100. Geering, K. (2001). The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(5), 425-438.

101. Blanco, G. and Mercer, R.W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology*, 275(5), F633-650.
102. Jewell, E.A., Shamraj, O.I. and Lingrel, J.B. (1992). Isoforms of the alpha subunit of Na,K-ATPase and their significance. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*, 607, 161-169.
103. Woo, A.L., James, P.F. and Lingrel, J.B. (2000). Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20693-20699.
104. Clausen, M.V., Nissen, P. and Poulsen, H. (2016). The alpha4 isoform of the Na(+),K(+)-ATPase is tuned for changing extracellular environments. *FEBS Journal*, 283(2), 282-293.
105. Sanchez, G., Nguyen, A.N., Timmerberg, B., Tash, J.S. and Blanco, G. (2006). The Na,K-ATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Molecular Human Reproduction*, 12(9), 565-576.
106. McDermott, J.P., Sanchez, G., Chennathukuzhi, V. and Blanco, G. (2012). Green fluorescence protein driven by the Na,K-ATPase alpha4 isoform promoter is expressed only in male germ cells of mouse testis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(12), 1313-1325.
107. McDermott, J., Sanchez, G., Nangia, A.K. and Blanco, G. (2015). Role of human Na,K-ATPase alpha 4 in sperm function, derived from studies in transgenic mice. *Molecular Reproduction and Development*, 82(3), 167-181.
108. Jimenez, T., Sanchez, G. and Blanco, G. (2012). Activity of the Na,K-ATPase alpha4 isoform is regulated during sperm capacitation to support sperm motility. *Journal of Andrology*, 33(5), 1047-1057.
109. Shum, W.W., Da Silva, N., Brown, D. and Breton, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *Journal of Experimental Biology*, 212(Pt 11), 1753-1761.
110. Ng, K.Y.B., Mingels, R., Morgan, H., Macklon, N. and Cheong, Y. (2018). In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 24(1), 15-34.
111. Nishigaki, T., Jose, O., Gonzalez-Cota, A.L., Romero, F., Trevino, C.L. and Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(3), 1149-1158.
112. Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A. and Kirichok, Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*, 140(3), 327-337.

113. Woo, A.L., James, P.F. and Lingrel, J.B. (2002). Roles of the Na,K-ATPase alpha4 isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Molecular Reproduction and Development*, 62(3), 348-356.
114. Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K. and Garbers, D.L. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1117-1122.
115. Zhang, Z., Yang, Y., Wu, H., Zhang, H., Zhang, H., Mao, J., Liu, D., Zhao, L., Lin, H., Tang, W., Hong, K. and Jiang, H. (2017). Sodium-Hydrogen-Exchanger expression in human sperm and its relationship with semen parameters. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(6), 795-801.
116. Garcia, M.A. and Meizel, S. (1999). Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Molecular Reproduction and Development*, 52(2), 189-195.
117. Peralta-Arias, R.D., Vivenes, C.Y., Camejo, M.I., Pinero, S., Proverbio, T., Martinez, E., Marin, R. and Proverbio, F. (2015). ATPases, ion exchangers and human sperm motility. *Reproduction*, 149(5), 475-484.
118. Liu, Y., Wang, D.K. and Chen, L.M. (2012). The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. *Biology of Reproduction*, 86(4), 99, 91-13.
119. Anderson, M.P., Gregory, R.J., Thompson, S., Souza, D.W., Paul, S., Mulligan, R.C., Smith, A.E. and Welsh, M.J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*, 253(5016), 202-205.
120. Ali Akbar, S., Nicolaidis, K.H. and Brown, P.R. (1998). Carbonic anhydrase isoenzymes CAI and CAII in semen, decidua, chorionic villi and various fetal tissues. *Early Human Development*, 51(3), 205-211.
121. Grunze, M., Forst, B. and Deuticke, B. (1980). Dual effect of membrane cholesterol on simple and mediated transport processes in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 600(3), 860-869.
122. Bernardino, R.L., Jesus, T.T., Martins, A.D., Sousa, M., Barros, A., Cavaco, J.E., Socorro, S., Alves, M.G. and Oliveira, P.F. (2013). Molecular basis of bicarbonate membrane transport in the male reproductive tract. *Current Medicinal Chemistry*, 20(32), 4037-4049.
123. Holappa, K., Mustonen, M., Parvinen, M., Vihko, P., Rajaniemi, H. and Kellokumpu, S. (1999). Primary structure of a sperm cell anion exchanger and its messenger ribonucleic acid expression during spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 61(4), 981-986.
124. Medina, J.F., Recalde, S., Prieto, J., Lecanda, J., Saez, E., Funk, C.D., Vecino, P., van Roon, M.A., Ottenhoff, R., Bosma, P.J., Bakker, C.T. and Elferink, R.P. (2003). Anion exchanger 2 is essential for spermiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15847-15852.

125. Parkkila, S., Rajaniemi, H. and Kellokumpu, S. (1993). Polarized expression of a band 3-related protein in mammalian sperm cells. *Biology of Reproduction*, 49(2), 326-331.
126. Chen, J.H., Cai, Z. and Sheppard, D.N. (2009). Direct sensing of intracellular pH by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channel. *Journal of Biological Chemistry*, 284(51), 35495-35506.
127. Rode, B., Dirami, T., Bakouh, N., Rizk-Rabin, M., Norez, C., Lhuillier, P., Lores, P., Jollivet, M., Melin, P., Zvetkova, I., Bienvenu, T., Becq, F., Planelles, G., Edelman, A., Gacon, G. and Toure, A. (2012). The testis anion transporter TAT1 (SLC26A8) physically and functionally interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel: a potential role during sperm capacitation. *Human Molecular Genetics*, 21(6), 1287-1298.
128. Xu, W.M., Shi, Q.X., Chen, W.Y., Zhou, C.X., Ni, Y., Rowlands, D.K., Yi Liu, G., Zhu, H., Ma, Z.G., Wang, X.F., Chen, Z.H., Zhou, S.C., Dong, H.S., Zhang, X.H., Chung, Y.W., Yuan, Y.Y., Yang, W.X. and Chan, H.C. (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9816-9821.
129. Li, C.Y., Jiang, L.Y., Chen, W.Y., Li, K., Sheng, H.Q., Ni, Y., Lu, J.X., Xu, W.X., Zhang, S.Y. and Shi, Q.X. (2010). CFTR is essential for sperm fertilizing capacity and is correlated with sperm quality in humans. *Human Reproduction*, 25(2), 317-327.
130. Parkkila, S., Kaunisto, K., Kellokumpu, S. and Rajaniemi, H. (1991). A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry*, 95(5), 477-482.
131. Jose, O., Torres-Rodriguez, P., Forero-Quintero, L.S., Chavez, J.C., De la Vega-Beltran, J.L., Carta, F., Supuran, C.T., Deitmer, J.W. and Trevino, C.L. (2015). Carbonic anhydrases and their functional differences in human and mouse sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), 713-718.
132. Wandernoth, P.M., Raubuch, M., Mannowetz, N., Becker, H.M., Deitmer, J.W., Sly, W.S. and Wennemuth, G. (2010). Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS One*, 5(11), e15061.
133. Cross, N.L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 59(1), 7-11.
134. Lu, J., Stewart, A.J., Sadler, P.J., Pinheiro, T.J. and Blindauer, C.A. (2008). Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 6), 1317-1321.
135. Hanukoglu, I. and Hanukoglu, A. (2016). Epithelial sodium channel (ENaC) family: phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*, 579(2), 95-132.

136. Kleyman, T.R., Kashlan, O.B. and Hughey, R.P. (2018). Epithelial Na⁺ channel regulation by extracellular and intracellular factors. *Annual Review of Physiology*, 80, 263-281.
137. Eladari, D., Chambrey, R., Picard, N. and Hadchouel, J. (2014). Electroneutral absorption of NaCl by the aldosterone-sensitive distal nephron: implication for normal electrolytes homeostasis and blood pressure regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), 2879-2895.
138. Miller, R.L., Denny, G.O., Knuepfer, M.M., Kleyman, T.R., Jackson, E.K., Salkoff, L.B. and Loewy, A.D. (2015). Blockade of ENaCs by amiloride induces c-Fos activation of the area postrema. *Brain Research*, 1601, 40-51.
139. Guo, D., Liang, S., Wang, S., Tang, C., Yao, B., Wan, W., Zhang, H., Jiang, H., Ahmed, A., Zhang, Z. and Gu, Y. (2016). Role of epithelial Na⁺ channels in endothelial function. *Journal of Cell Science*, 129(2), 290-297.
140. Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.A., Hummler, E., Ryba, N.J. and Zuker, C.S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, 464(7286), 297-301.
141. Eaton, D.C., Malik, B., Bao, H.-F., Yu, L. and Jain, L. (2010). Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(1), 54-64.
142. Althaus, M., Bogdan, R., Clauss, W.G. and Fronius, M. (2007). Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *FASEB Journal*, 21(10), 2389-2399.
143. Pochynyuk, O., Bugaj, V. and Stockand, J.D. (2008). Physiologic regulation of the epithelial sodium channel by phosphatidylinositides. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 17(5), 533-540.
144. Mukherjee, A., Wang, Z., Kinlough, C.L., Poland, P.A., Marciszyn, A.L., Montalbetti, N., Carattino, M.D., Butterworth, M.B., Kleyman, T.R. and Hughey, R.P. (2017). Specific Palmitoyltransferases Associate with and Activate the Epithelial Sodium Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4152-4163.
145. Bruns, J.B., Hu, B., Ahn, Y.J., Sheng, S., Hughey, R.P. and Kleyman, T.R. (2003). Multiple epithelial Na⁺ channel domains participate in subunit assembly. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 285(4), F600-609.
146. Goldfarb, S.B., Kashlan, O.B., Watkins, J.N., Suaud, L., Yan, W., Kleyman, T.R. and Rubenstein, R.C. (2006). Differential effects of Hsc70 and Hsp70 on the intracellular trafficking and functional expression of epithelial sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), 5817-5822.
147. Wang, H., Traub, L.M., Weixel, K.M., Hawryluk, M.J., Shah, N., Edinger, R.S., Perry, C.J., Kester, L., Butterworth, M.B., Peters, K.W., Kleyman, T.R., Frizzell, R.A. and Johnson, J.P. (2006). Clathrin-mediated endocytosis of the epithelial

- sodium channel. Role of epsin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 14129-14135.
148. Lu, C., Pribanic, S., Debonneville, A., Jiang, C. and Rotin, D. (2007). The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool. *Traffic*, 8(9), 1246-1264.
 149. Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425-479.
 150. Bonifacino, J.S. and Weissman, A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 19-57.
 151. Snyder, P.M., Steines, J.C. and Olson, D.R. (2004). Relative contribution of Nedd4 and Nedd4-2 to ENaC regulation in epithelia determined by RNA interference. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 5042-5046.
 152. Wiemuth, D., Ke, Y., Rohlf, M. and McDonald, F.J. (2007). Epithelial sodium channel (ENaC) is multi-ubiquitinated at the cell surface. *Biochemical Journal*, 405(1), 147-155.
 153. Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J.F., Pratt, J.H., Schild, L., Horisberger, J.D., Rotin, D. and Staub, O. (1999). Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 103(5), 667-673.
 154. Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N. and Cohen, P. (1999). Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochemical Journal*, 344 Pt 1, 189-197.
 155. Mansley, M.K. and Wilson, S.M. (2010). Effects of nominally selective inhibitors of the kinases PI3K, SGK1 and PKB on the insulin-dependent control of epithelial Na⁺ absorption. *British Journal of Pharmacology*, 161(3), 571-588.
 156. Mansley, M.K. and Wilson, S.M. (2010). Dysregulation of epithelial Na⁺ absorption induced by inhibition of the kinases TORC1 and TORC2. *British Journal of Pharmacology*, 161(8), 1778-1792.
 157. Gonzalez-Rodriguez, E., Gaeggeler, H.P. and Rossier, B.C. (2007). IGF-1 vs insulin: respective roles in modulating sodium transport via the PI-3 kinase/Sgk1 pathway in a cortical collecting duct cell line. *Kidney International*, 71(2), 116-125.
 158. Alvarez de la Rosa, D., Canessa, C.M., Fyfe, G.K. and Zhang, P. (2000). Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annual Review of Physiology*, 62, 573-594.
 159. Zhou, R. and Snyder, P.M. (2005). Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4518-4523.
 160. Vasquez, M.M., Castro, R., Seidner, S.R., Henson, B.M., Ashton, D.J. and Mustafa, S.B. (2008). Induction of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 (SGK1) by

- cAMP regulates increases in alpha-ENaC. *Journal of Cellular Physiology*, 217(3), 632-642.
161. Snyder, P.M., Olson, D.R., Kabra, R., Zhou, R. and Steines, J.C. (2004). cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na⁺ channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45753-45758.
 162. Woollhead, A.M. and Baines, D.L. (2006). Forskolin-induced cell shrinkage and apical translocation of functional enhanced green fluorescent protein-human alphaENaC in H441 lung epithelial cell monolayers. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 5158-5168.
 163. Diakov, A., Nesterov, V., Mokrushina, M., Rauh, R. and Korbmacher, C. (2010). Protein kinase B alpha (PKBalpha) stimulates the epithelial sodium channel (ENaC) heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes by two distinct mechanisms. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(6), 913-924.
 164. Lallena, M.J., Diaz-Meco, M.T., Bren, G., Paya, C.V. and Moscat, J. (1999). Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 2180-2188.
 165. Edinger, R.S., Lebowitz, J., Li, H., Alzamora, R., Wang, H., Johnson, J.P. and Hallows, K.R. (2009). Functional regulation of the epithelial Na⁺ channel by IkappaB kinase-beta occurs via phosphorylation of the ubiquitin ligase Nedd4-2. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 150-157.
 166. Booth, R.E. and Stockand, J.D. (2003). Targeted degradation of ENaC in response to PKC activation of the ERK1/2 cascade. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 284(5), F938-947.
 167. Stockand, J.D., Bao, H.F., Schenck, J., Malik, B., Middleton, P., Schlanger, L.E. and Eaton, D.C. (2000). Differential effects of protein kinase C on the levels of epithelial Na⁺ channel subunit proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25760-25765.
 168. Rozengurt, E., Rey, O. and Waldron, R.T. (2005). Protein kinase D signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13205-13208.
 169. McEneaney, V., Dooley, R., Harvey, B.J. and Thomas, W. (2010). Protein kinase D stabilizes aldosterone-induced ERK1/2 MAP kinase activation in M1 renal cortical collecting duct cells to promote cell proliferation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(1-2), 18-28.
 170. Shi, H., Asher, C., Chigaev, A., Yung, Y., Reuveny, E., Seger, R. and Garty, H. (2002). Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13539-13547.
 171. Yan, W., Spruce, L., Rosenblatt, M.M., Kleyman, T.R. and Rubenstein, R.C. (2007). Intracellular trafficking of a polymorphism in the COOH terminus of the alpha-

- subunit of the human epithelial sodium channel is modulated by casein kinase 1. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 293(3), F868-876.
172. Shi, H., Asher, C., Yung, Y., Kligman, L., Reuveny, E., Seger, R. and Garty, H. (2002). Casein kinase 2 specifically binds to and phosphorylates the carboxy termini of ENaC subunits. *European Journal of Biochemistry*, 269(18), 4551-4558.
173. Dinudom, A., Fotia, A.B., Lefkowitz, R.J., Young, J.A., Kumar, S. and Cook, D.I. (2004). The kinase Grk2 regulates Nedd4/Nedd4-2-dependent control of epithelial Na⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(32), 11886-11890.
174. Bhalla, V., Oyster, N.M., Fitch, A.C., Wijngaarden, M.A., Neumann, D., Schlattner, U., Pearce, D. and Hallows, K.R. (2006). AMP-activated kinase inhibits the epithelial Na-channel through functional regulation of the ubiquitin ligase Nedd4-2. *Journal of Biological Chemistry*, 26159-26169.
175. Nofziger, C., Kalsi, K., West, T.A., Baines, D. and Blazer-Yost, B.L. (2008). Vasopressin regulates the phosphorylation state of AMP-activated protein kinase (AMPK) in MDCK-C7 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 22(5-6), 487-496.
176. Fraser, S.A., Choy, S.W., Pastor-Soler, N.M., Li, H., Davies, M.R., Cook, N., Katerelos, M., Mount, P.F., Gleich, K., McRae, J.L., Dwyer, K.M., van Denderen, B.J., Hallows, K.R., Kemp, B.E. and Power, D.A. (2013). AMPK couples plasma renin to cellular metabolism by phosphorylation of ACC1. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 305(5), F679-690.
177. Weixel, K.M., Marciszyn, A., Alzamora, R., Li, H., Fischer, O., Edinger, R.S., Hallows, K.R. and Johnson, J.P. (2013). Resveratrol inhibits the epithelial sodium channel via phosphoinositides and AMP-activated protein kinase in kidney collecting duct cells. *PLoS One*, 8(10), e78019.
178. Zheng, W.W., Li, X.Y., Liu, H.B., Wang, Z.R., Hu, Q.Q., Li, Y.X., Song, B.L., Lou, J., Wang, Q.S., Ma, H.P. and Zhang, Z.R. (2016). AMP-Activated Protein Kinase Attenuates High Salt-Induced Activation of Epithelial Sodium Channels (ENaC) in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1531392.
179. Myerburg, M.M., King, J.D., Jr., Oyster, N.M., Fitch, A.C., Magill, A., Baty, C.J., Watkins, S.C., Kolls, J.K., Pilewski, J.M. and Hallows, K.R. (2010). AMPK agonists ameliorate sodium and fluid transport and inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(6), 676-684.
180. Bonny, O. and Hummler, E. (2000). Dysfunction of epithelial sodium transport: from human to mouse. *Kidney International*, 57(4), 1313-1318.
181. Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A. and Hudson, E.R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Letters*, 546(1), 113-120.

182. Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F. and Winderickx, J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS Journal*, 278(21), 3978-3990.
183. Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology*, 13(22), 2004-2008.
184. Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G. and Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, 2(1), 9-19.
185. Xie, M., Zhang, D., Dyck, J.R., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., Mann, D.L., Taffet, G.E., Baldini, A., Khoury, D.S. and Schneider, M.D. (2006). A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17378-17383.
186. Lu, J., Wu, D.M., Zheng, Y.L., Hu, B., Zhang, Z.F., Shan, Q., Zheng, Z.H., Liu, C.M. and Wang, Y.J. (2010). Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol-induced neurotoxicity. *Journal of Pathology*, 222(2), 199-212.
187. Joseph, B.K., Liu, H.Y., Francisco, J., Pandya, D., Donigan, M., Gallo-Ebert, C., Giordano, C., Bata, A. and Nickels, J.T., Jr. (2015). Inhibition of AMP Kinase by the Protein Phosphatase 2A Heterotrimer, PP2A^{pp2r2d}. *Journal of Biological Chemistry*, 290(17), 10588-10598.
188. Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*, 1(1), 15-25.
189. Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T. and Neumann, D. (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32207-32216.
190. Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A. and Hardie, D.G. (2013). AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metabolism*, 18(4), 556-566.
191. Hardie, D.G. (2015). AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 1-7.
192. Tanwar, P.S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L. and Teixeira, J.M. (2012). Altered LKB1/AMPK/TSC1/TSC2/mTOR signaling causes disruption of Sertoli cell polarity and spermatogenesis. *Human Molecular Genetics*, 21(20), 4394-4405.

193. Riera, M.F., Regueira, M., Galardo, M.N., Pellizzari, E.H., Meroni, S.B. and Cigorruga, S.B. (2012). Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 302(8), E914-923.
194. Tartarin, P., Moison, D., Guibert, E., Dupont, J., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., Frydman, N., Pozzi, S., Frydman, R., Lecureuil, C. and Froment, P. (2012). Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Human Reproduction*, 27(11), 3304-3314.
195. Yang, W.R., Liao, T.T., Bao, Z.Q., Zhou, C.Q., Luo, H.Y., Lu, C., Pan, M.H. and Wang, X.Z. (2018). Role of AMPK in the expression of tight junction proteins in heat-treated porcine Sertoli cells. *Theriogenology*, 121, 42-52.
196. Galardo, M.N., Riera, M.F., Pellizzari, E.H., Sobarzo, C., Scarcelli, R., Denduchis, B., Lustig, L., Cigorruga, S.B. and Meroni, S.B. (2010). Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 330(1-2), 49-58.
197. Bertoldo, M.J., Guibert, E., Faure, M., Guillou, F., Rame, C., Nadal-Desbarats, L., Foretz, M., Viollet, B., Dupont, J. and Froment, P. (2016). Specific deletion of AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) in mouse Sertoli cells modifies germ cell quality. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 423, 96-112.
198. Abdou, H.S., Bergeron, F. and Tremblay, J.J. (2014). A cell-autonomous molecular cascade initiated by AMP-activated protein kinase represses steroidogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 34(23), 4257-4271.
199. Ham, S., Meachem, S.J., Choong, C.S., Charles, A.K., Baynam, G.S., Jones, T.W., Samarajeewa, N.U., Simpson, E.R. and Brown, K.A. (2013). Overexpression of aromatase associated with loss of heterozygosity of the STK11 gene accounts for prepubertal gynecomastia in boys with Peutz-Jeghers syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(12), E1979-1987.
200. Calle-Guisado, V., de Llera, A.H., Martin-Hidalgo, D., Mijares, J., Gil, M.C., Alvarez, I.S., Bragado, M.J. and Garcia-Marin, L.J. (2017). AMP-activated kinase in human spermatozoa: identification, intracellular localization, and key function in the regulation of sperm motility. *Asian journal of andrology*, 19(6), 707-714.
201. Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Gil, M.C., Garcia-Marin, L.J. and Bragado, M.J. (2012). AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PloS One*, 7(6), e38840.
202. Bertoldo, M.J., Locatelli, Y., O'Neill, C. and Mermillod, P. (2015). Impacts of and interactions between environmental stress and epigenetic programming during early embryo development. *Reproduction Fertility and Development*, 27(8), 1125-1136.
203. Cordova, A., Strobel, P., Vallejo, A., Valenzuela, P., Ulloa, O., Burgos, R.A., Menarim, B., Rodriguez-Gil, J.E., Ratto, M. and Ramirez-Reveco, A. (2014). Use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm: presence and sensitivity of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cryobiology*, 69(3), 473-481.

204. Nguyen, T.M., Alves, S., Grasseau, I., Metayer-Coustard, S., Praud, C., Froment, P. and Blesbois, E. (2014). Central role of 5'-AMP-activated protein kinase in chicken sperm functions. *Biology of Reproduction*, 91(5), 121, 121-115.
205. Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Rodriguez-Gil, J.E., Gil, M.C., Garcia-Marin, L.J. and Bragado, M.J. (2013). AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(9), 2143-2151.
206. Martin-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Yeste, M., Cruz Gil, M., Bragado, M.J. and Garcia-Marin, L.J. (2013). Adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, 80(4), 285-294.
207. Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Gil, M.C., Garcia-Marin, L.J. and Bragado, M.J. (2015). AMPK up-activation reduces motility and regulates other functions of boar spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 21(1), 31-45.
208. Towler, M.C., Fogarty, S., Hawley, S.A., Pan, D.A., Martin, D.M., Morrice, N.A., McCarthy, A., Galardo, M.N., Meroni, S.B., Cigorraga, S.B., Ashworth, A., Sakamoto, K. and Hardie, D.G. (2008). A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochemical Journal*, 416(1), 1-14.
209. Shabani Nashtaei, M., Amidi, F., Sedighi Gilani, M.A., Aleyasin, A., Bakhshalizadeh, S., Naji, M. and Nekoonam, S. (2017). Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5' AMP-activated protein kinase activation. *Andrology*, 5(2), 313-326.
210. Zhu, Z., Li, R., Ma, G., Bai, W., Fan, X., Lv, Y., Luo, J. and Zeng, W. (2018). 5'-AMP-Activated Protein Kinase Regulates Goat Sperm Functions via Energy Metabolism In Vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(6), 2420-2431.
211. Miki, K. (2007). Energy metabolism and sperm function. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, 309-325.
212. Bertoldo, M.J., Guibert, E., Tartarin, P., Guillory, V. and Froment, P. (2014). Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 68(2), 262-268.
213. Calle-Guisado, V., Hurtado de Llera, A., Gonzalez-Fernandez, L., Bragado, M.J. and Garcia-Marin, L.J. (2017). Human sperm motility is downregulated by the AMPK activator A769662. *Andrology*, 5(6), 1131-1140.
214. Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Gil, M.C., Garcia-Marin, L.J. and Bragado, M.J. (2014). The calcium/CaMKKalpha/beta and the cAMP/PKA pathways are essential upstream regulators of AMPK activity in boar spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 90(2), 29, 21-10.
215. Nguyen, T.M.D., Combarous, Y., Praud, C., Duittoz, A. and Blesbois, E. (2016). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases (CaMKKs) effects on AMP-activated protein kinase (AMPK) regulation of chicken sperm functions. *PloS One*, 11(1), e0147559.

216. Lee, D., Moawad, A.R., Morielli, T., Fernandez, M.C. and O'flaherty, C. (2017). Peroxiredoxins prevent oxidative stress during human sperm capacitation. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 23(2), 106-115.
217. Martin-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Calle-Guisado, V., Gonzalez-Fernandez, L., Garcia-Marin, L. and Bragado, M.J. (2018). AMPK Function in Mammalian Spermatozoa. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11).
218. Kumar, L., Yadav, S.K., Kushwaha, B., Pandey, A., Sharma, V., Verma, V., Maikhuri, J.P., Rajender, S., Sharma, V.L. and Gupta, G. (2016). Energy Utilization for Survival and Fertilization-Parsimonious Quiescent Sperm Turn Extravagant on Motility Activation in Rat. *Biology of Reproduction*, 94(4), 96.
219. Morrow, V.A., Foufelle, F., Connell, J.M., Petrie, J.R., Gould, G.W. and Salt, I.P. (2003). Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31629-31639.
220. Mace, O.J., Woollhead, A.M. and Baines, D.L. (2008). AICAR activates AMPK and alters PIP2 association with the epithelial sodium channel ENaC to inhibit Na⁺ transport in H441 lung epithelial cells. *Journal of Physiology*, 586(18), 4541-4557.
221. Kleyman, T.R., Kashlan, O.B. and Hughey, R.P. (2018). Epithelial Na⁽⁺⁾ Channel Regulation by Extracellular and Intracellular Factors. *Annual Review of Physiology*, 80, 263-281.
222. Berdiev, B.K., Qadri, Y.J. and Benos, D.J. (2009). Assessment of the CFTR and ENaC association. *Molecular Biosystems*, 5(2), 123-127.
223. Jin, S.-K. and Yang, W.-X. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*, 8(2), 3600-3627.
224. Liu, D.Y., Liu, M.L. and Baker, H.W. (2013). Defective protein kinase A and C pathways are common causes of disordered zona pellucida (ZP)--induced acrosome reaction in normozoospermic infertile men with normal sperm-ZP binding. *Fertility and Sterility*, 99(1), 86-91.
225. Signorelli, J., Diaz, E.S. and Morales, P. (2012). Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell and Tissue Research*, 349(3), 765-782.
226. Buffone, M.G., Verstraeten, S.V., Calamera, J.C. and Doncel, G.F. (2009). High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *Journal of Andrology*, 30(5), 552-558.
227. Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P. and Kopf, G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129-1137.
228. Stone, J.D., Narine, A., Shaver, P.R., Fox, J.C., Vuncannon, J.R. and Tulis, D.A. (2013). AMP-activated protein kinase inhibits vascular smooth muscle cell


proliferation and migration and vascular remodeling following injury. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 304(3), H369-381.



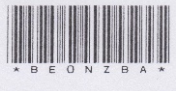


EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı



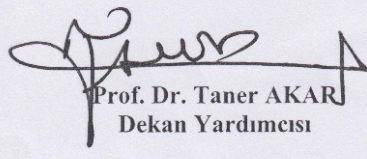
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı



* B E O N Z B A *

Sayı : 24074710-- 38
Konu : Toplantı Kararları

Sayın *Prof. Dr. Gülnur Toke Kaplanlı*
Proje Yürütücüsü

Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **24 Eylül 2018** tarihinde yapmış olduğu toplantı kararları ekte sunulmuştur.
Bilgilerinizi rica ederim.

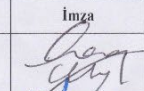
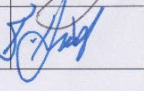

Prof. Dr. Taner AKAR
Dekan Yardımcısı



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Birimi 06500 Beşevler/ANKARA
Tel:0 312 202 69 58 Faks:0 312 202 46 73
e-Posta :tip@gazi.edu.tr İnternet Adresi :www.med.gazi.edu.tr

Bilgi için :Şerife Çiçek
Bilgisayar İşletmeni

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU									
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu							
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara							
	TELEFON	0312 202 69 58							
	FAKS	0312 202 46 73							
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr								
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Epitelyal Sodyum Kanallarının (ENaC) İnsan Sperm Kapasitasyonu ve Akrozom Reaksiyonu ile İlişkisinin İncelenmesi							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Histoloji -Embriyoloji AD. / G.Ü.T.F.							
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)								
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar-Doktora tezi							
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>					
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili					
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	14.09.2018	1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>			
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	14.09.2018	1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>			
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>							
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>							
	DİĞER	<input type="checkbox"/>							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 679	Toplantı tarihi: 24.09.2018							
	<p>Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.</p> <p>Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.</p>								
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu								
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Canan ULUOĞLU								
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza		
Prof. Dr. Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.T.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Birol DEMİREL BAŞKAN YARD.	Adli Tıp AD.	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Prof. Dr. Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji AD.	G.Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Gu</i>
Prof. Dr. Bülent BOYACI ÜYE	Kardiyoloji AD.	G.Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Uly</i>
Prof. Dr. Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji AD.	G.Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Öznur</i>
Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya A.D	G.Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>MK</i>
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik AD.	G.Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Nesrin</i>
Prof. Dr. Ashı KURUOĞLU ÜYE	Psikiyatri AD.	G.Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Ashı</i>
Doç. Dr. Hakan KAYIR ÜYE	Tıbbi Farmakoloji	COMMAT Ltd.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç. Dr. Mutlu DOĞAN ÜYE	İç Hast. AD. Tıbbi Onkoloji BD.	Ank.Numune Egt. ve Araşt.Hast.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Mutlu</i>
Doç. Dr. N.Arda DEMIRKAN ÜYE	Genel Cerrahi AD.	A.Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç. Dr. Anıl TAPISIZ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hast.AD.Ç.Nor. BD.	G.Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Anıl</i>
Doç. Dr. Pınar ÖZDEMİR ÜYE	Biyoistatistik AD.	H.Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Katılmadı
Doktor Öğr.Üyesi Mustafa GÖKSU ÜYE	Hukukçu	A.H.B.V.Ü Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Mustafa</i>
Aysel ÖZER ÜYE	Sivil Temsilci	Emekli Öğr. Uyesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Aysel</i>

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇAKIR GÜNDOĞDU, Ayşe
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 17.03.1986 Muğla
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05442663921
 e-mail : aysecakirgundogdu@gmail.com



Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Histoloji-Embriyoloji ABD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Histoloji-Embriyoloji ABD	2015
Yüksek Lisans	Anadolu Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ABD	2012
Lisans	Anadolu Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Dalaman Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

- Seymen, C.M., Çakır Gündoğdu, A., Bulut, D.İ., Yılmaz Demirtaş, C. and Elmas, Ç. (2019). Royal jelly increased map-2 expression in hippocampal neurons of hypothyroid rats: an immunohistochemical study. *Biotechnic & Histochemistry*, DOI: 10.1080/10520295.2019.1632486.
- Çakır Gündoğdu, A., Take Kaplanoğlu, G., Sivas, H., Varol, R. and Seymen, C.M. (2019). Niclosamide Suppresses Proliferation, Induces Apoptosis and Inhibits Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. *Gazi Medical Journal*, 30(2): 178-183.

3. Öcal, Ö., Börçek, A.Ö., Paşaoğlu Asaoğlu, Ö.T., Çakır Gündoğdu, A., Take Kaplanoğlu, G. and Baykaner, M.K. (2018). Can quercetin be an option for treatment of spinal cord injury?: an experimental study. *Turkish Neurosurgery*, 29(2): 247-253.
4. Akarca, O., Öcal, Ö., Bulduk, E.B., Paşaoğlu, Ö.T., Çakır Gündoğdu, A., Take Kaplanoğlu, G. and Paşaoğlu, A. (2017). Protective Effects of Resveratrol in a Rat Model of Ischemia-Reperfusion Injury of Sciatic Nerve. *Gazi Medical Journal*, 28(4): 260-265.
5. Oztetik, E. and Cakir, A. (2013). New Food for an old mouth: new enzyme for an ancient archaea. *Enzyme and Microbial Technology*, 55, 58-64.





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

