

**BİRÜNİ**  
**ÜNİVERSİTESİ**  
*“Bilimin Geleceği”*

**T.C.**  
**BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**ODORANT VE PROGESTERON UYGULANMIŞ KÜLTÜR**  
**ORTAMLARINDA SPERM KALSİYUM KANALLARI VE**  
**OLFAKTÖR RESEPTÖRLERİNİN ÇEŞİTLİ İNFERTİL**  
**OLGULARDA İNCELENMESİ**

**NESLİHAN KÖPRÜLÜ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Tülay İREZ**

**İSTANBUL**

**2019**



T.C.  
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ODORANT VE PROGESTERON UYGULANMIŞ KÜLTÜR  
ORTAMLARINDA SPERM KALSİYUM KANALLARI VE  
OLFAKTÖR RESEPTÖRLERİNİN ÇEŞİTLİ İNFERTİL  
OLGULARDA İNCELENMESİ

NESLİHAN KÖPRÜLÜ

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Tülay İREZ

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Yasemin MÜŞTERİ OLTULU

İSTANBUL

2019

**Anabilim Dalı:** Histoloji ve Embriyoloji

**Program Adı:** Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

**Öğrencinin Adı Soyadı:** NESLİHAN KÖPRÜLÜ

**Danışman:** Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Neslihan KÖPRÜLÜ tarafından hazırlanan "Odorant ve Progesteron Uygulanmış Kültür Ortamlarında Sperm Kalsiyum Kanalları ve Olfaktor Reseptörlerinin Çeşitli İnfertil Olgularda İncelenmesi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/09/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Zeliha YAZICI

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Melike ERKAN

İstanbul Üniversitesi

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Leman ŞENTURAN  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## I. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı herhangi bir davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, çalışma ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar listesi şeklinde eklediğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

NESLİHAN KÖPRÜLÜ



## II. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın, fikir halinden bu yana somutlaőmasına yaptığı katkılar nedeniyle, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tülay İREZ ve Doç. Dr. Yasemin MÜŞTERİ OLTULU'ya teőekkürü bir borç bilirim. Hocalarıma ders ve proje döneminde akademisyen olmanın yanında iyi bir eğitimci olmanın tarifini davranıőlarıyla göstermeleri, eğitim hayatımda yol gösterici bir sorumluluk üstlenmeleri ve sevgilerini benden esirgememelerine büyük őükran duymaktayım. Araştırma süresi boyunca verdiği destek ve yardımları nedeniyle birlikte çalıőmaktan mutluluk duyduğum yol arkadaőlarıma teőekkürlerimi sunarım. Başarılı olmam için her zaman beni destekleyen, koőulsuz yanımda olan annem Helale KÖPRÜLÜ, babam Halil KÖPRÜLÜ ve kardeőim Nuray KÖPRÜLÜ'ye teşekkür ederim.

Neslihan KÖPRÜLÜ

<b>İçindekiler</b>	<b>Sayfa No</b>
İç Kapak	-
Onay sayfası	-
I.Beyan	iii
II.Teşekkür	iv
III.İçindekiler	v
IV.Simgeler ve Kısaltmalar Listesi	vi
V.Tablo listesi	vii
VI.Grafik listesi	viii
VII.Şekil listesi	ix
1.Özet ve anahtar kelimeler	1
2.Abstract	3
3.Giriş ve Amaç	5
4.Genel Bilgiler	7
5.Gereç ve Yöntem	33
6.Bulgular	38
7.Tartışma	48
8.Sonuç ve Öneriler	52
9.Kaynakça	54
10.Ekler	60
Ek 1.Gönüllü Olur Formu	60
Ek 2.Etik Kurul Onayı	64
11.Özgeçmiş	66
İntihal Raporu	67

## IV. SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>µl</b>	mikrolitre
<b>AB</b>	Anilin Blue
<b>AR</b>	Akrozom Reaksiyonu
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalsiyum
<b>Cc</b>	Cubic Centimetre
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DSÖ-WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü, World Health Organization
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>IVF</b>	İn Vitro Fertilizasyon
<b>LH</b>	Lüteinizan Hormon
<b>ml</b>	Mililitre
<b>OAT</b>	Oligoastenoteratozoospermi
<b>P</b>	Progesteron
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PFA</b>	Paraformaldehyde
<b>pH</b>	Power of Hydrogen
<b>Rpm</b>	Revolutions per minute

## V. TABLO LİSTESİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablonun İsmi</b>	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1	Semen Analizi Normal Referans Değerleri (WHO 5.Baskı ,2010)	28
Tablo 2	Dünya Sağlık Örgütü Semen Analizi Referans Değerleri	32
Tablo 3	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.	41
Tablo 4	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi motilite değerlerinin karşılaştırılması.	41
Tablo 5	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi morfoloji değerlerinin karşılaştırılması.	42
Tablo 6	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında CatSper+ değerlerinin karşılaştırılması.	42
Tablo 7	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında progresif motilite değerlerinin karşılaştırılması.	43
Tablo 8	Catsper+ ve Hiperaktivasyon korelasyon değerleri	43



## VI. GRAFİK LİSTESİ

<b>Grafik No</b>	<b>Grafik İsmi</b>	<b>Sayfa No</b>
Grafik 1	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması	44
Grafik 2	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında progresif motilite değerlerinin karşılaştırılması	44
Grafik 3	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi morfoloji değerlerinin karşılaştırılması	45
Grafik 4	Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında hiperaktivasyon değerlerinin karşılaştırılması	46
Grafik 5	Normospermi oligoastenoteratospermi gruplar arası CatSper+ protein ekspresyonu	47
Grafik 6	Progesteron sonrası Progresif motilite ile CatSper+ ilişkisi	47

## VII. ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil No</b>	<b>Őeklin İsmi</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1	Erkek üreme sistemi anatomisi	7
Şekil 2	Testis yapısı ve seminifer túbüller	9
Şekil 3	Seminifer túbül ve çevresindeki dokunun bir bölümü	15
Şekil 4	Erkek germ hücrelerinin oluşumu	17
Şekil 5	Aktif ve hiperaktivasyonlu sperm	18
Şekil 6	İnsan sperminin kemosenör sinyal yollarında CatSperin rolü	19
Şekil 7	Sperm hücresi hiperaktivasyon hareketliliğinin başlatılması için hipotetik bir model	20
Şekil 8	Yumurtalık fallop túbü içerisindeki kümülüs çevrili insan oositinin ölçeklendirilmesi için çizilen şema	21
Şekil 9	Ca <sup>2+</sup> eksikliğinin erkek kısırlığına etkileri	25
Şekil 10	Makler sayım kamarası	35
Şekil 11	Sperm morfoloji değerlendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermlerin gösterilmesi	39
Şekil 12	Sperm morfolojisi değerlendirilmesi, normal yapıdaki spermlerin gösterimi	39
Şekil 13	Sperm de bulunan pozitif Catsper ekspresyonu	40
Şekil 14	Sperm de bulunan negatif Catsper ekspresyonu	40

## 1. ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER

Yumurtanın ve sperm hücrelerinin birleşimi, spermin sadece mekaniksel süreçlerle yumurtaya sızdığı bir süreç değildir. Bu süreçte, alışılmadık dışında yakın ve özel biyokimyasal bir tepkime başrol oynamaktadır. Sperm koku reseptörleri kalsiyum kanallarında meydana gelen değişiklikler ile kemotaktik davranışın düzenlenmesinde önemli bir faktördür. Ca<sup>2+</sup> akışı, sperm intraselüler kalsiyum konsantrasyonunda yükselişe yol açarak spermlerin daha hızlı hareket etmesini sağlar. Ayrıca, Ca<sup>2+</sup> kanallarının doğurganlık için gerekli olduğu gösterilmiştir. Odorantlar; kemoatraktan olarak görev yaparak, insan sperminde bulunan hor17-4 koku reseptörü ile etkileşerek kemotaksise neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda odorant olarak kullanılan Burjonal, koku reseptörleri için güçlü bir agonist ve kemoatraktanır. Bu kemoatraktan kullanılarak spermde bulunan koku reseptörlerinin etkileşimi hakkında bize önemli bilgiler kazandırmıştır. Bazı araştırmacılar ise tavşanda ki oosit kumulus hücrelerinde bulunan progesteronun burjonal gibi kemotaksis hareketi üzerinde etkili olduğuna dair çalışmalar yapmışlardır fakat sperm odorant reseptörleri ve kalsiyum katyon kanallarının spermlerin yumurtaya ulaşabilmesi ve normal fizyolojisini gerçekleştirmesi konusunda insan çalışmaları eksik bulunmuştur. Çalışma, odorant progesteron uygulanmış kültür ortamlarında, sperm koku reseptörlerinin etkilenmesiyle birlikte kalsiyum kanallarında meydana gelen değişimi, sperm kuyruk hareketine etkisini ele alıp hiperaktivasyonun değerlendirilmesini fertil ve infertil olgularda incelenmesini içermektedir. Çalışma ‘Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul’una sunuldu ve 2018/13-6 sayılı ve 26.02.2018 tarihli etik kurul onayı alındı. Çalışma Ocak 2019-Haziran 2019 tarihleri arasında Biruni Üniversite Hastanesi’ne spermiyogram analizi için başvuran hastalarda uygulandı. Bu çalışmada; Biruni Üniversite Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan normospermi(n:28) ve oligoastenoteratospermi(n:28) WHO kriterlerine uygun standart semen analizi uygulanarak ardından swim up yöntemi ve progesteron ile sperm motilitesi ve immünfloresan yöntemi ile sperm kalsiyum kanalında meydana gelmiş değişiklikler değerlendirilmiştir. Swim-up yöntemi kullanılarak yapılan sperm ayırıştırma sonrası progesteron uygulanarak 37° C ‘de 45 dakika inkübasyon yapılmış olup inkübasyon sonrası motilite değerlendirilerek öncesi ve sonrası değerler karşılaştırılmıştır. Örnekler hastanede dondurulmuş olup sonrasında kalsiyum

kanallarının incelenmesi için Catsper antikorunu kullanılarak İmmünfloresan tekniği ile incelenip değerler yorumlanmıştır. Bu tez çalışmasına göre sperm hazırlama yöntemi olarak kullanılan swim-up ve odorant olarak kullanılan progesteron arasında motil sperm açısından anlamlı farklılık bulunmuş olup motilite parametreleri gözönüne alınarak progesteron uygulanmış spermilerin kalsiyum kanallarında meydana gelen değişiklik hiperaktivasyonu sağlamıştır. Elde edilen bulgular bize sperm odorant reseptörleri ve kalsiyum kanallarının infertil ve fertil olgularda karşılaştırılmasını ve açıklanamayan infertilite grubunda da bu konuda elde edilen bulgular güncel literatüre bir katkı yapması hedeflenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ca<sup>2+</sup>, Catsper, swim-up, immünfloresan, odorant



## 2. ABSTRACT

### **Examination of Sperm Calcium Channels and Olfactor Receptors In Various Infertile Cases In Odorant Progesterone Applied Culture Medium.**

The combination of the egg and the sperm cell is not a process which sperm can only leak into the egg by mechanical processes. In this process, an unusual and special biochemical reaction plays a leading role. Sperm odor receptors are an important factor in the regulation of chemotactic behavior with changes in calcium channels.  $Ca^{2+}$  flow leads to an increase in intracellular calcium concentration and allows sperm to move faster. In addition,  $Ca^{2+}$  channels have been shown to be essential for fertility. Odorant; acting as a chemoattractant, it interacts with the hor17-4 odorant receptor that found in human sperm and causes chemotaxis. Burjonal used as odorant in studies, a strong agonist for odorant receptors and chemoattractants. By using this chemoattractant, we provided important information about the interaction of odor receptors in the sperm.

Some researchers found that progesterone in the rabbit oocyte causes chemotaxis such as bourgeonal, however, human studies were lacking in the ability of sperm odorant receptors and calcium cation channels to reach the egg and perform normal physiology. The aim of this study is investigate the effects of sperm odor receptors on sperm tail movement and to evaluate hyperactivity in fertile and infertile cases in odorant progesterone treated culture media. The study was submitted to the Biruni University Ethics Committee and was approved in 2018/13-6 and dated 26.02.2018. The study was applied to the Biruni University Hospital between January 2019 and June 2019 in patients who applied for spermogram analysis. In study; patients admitted to the Biruni University Hospital Urology outpatient clinic. Standard semen analysis was performed according to WHO criteria in normospermia (n:28) and oligoasthenoteratospermia (n:28) groups, followed by swim up method and by adding progesterone sperm motility examined and with immunofluorescence method changes in sperm calcium channel were evulated. After sperm separation by swim-up method, progesterone was applied and incubation was carried out at 37 ° C for 45 minutes. After incubation, motility was evaluated and pre and post values were compared. The samples were frozen in the hospital and then examined by the immunofluorescence technique for the evaluation of calcium channels by using Catsper antibody and the

pre-values were compared. According to this thesis, there was a significant difference in motile sperm between swim-up and progesterone which was used as a sperm preparation method. Motility parameters were taken into account and the changes in calcium channels of progesterone-treated sperms caused hyperactivation. The findings of this study have aimed to compare sperm odorant receptors and calcium channels in infertile and fertile cases and to make a contribution to the current literature in unexplained infertility group.

**Key words:** Ca<sup>2+</sup>, Catsper, swim-up, immunofluorescence, odorant



### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Döllenme erkek ve dişi gametin füzyonudur. İşlem, tek bir diploid hücre, zigotun oluşması için, bir oositin bir sperm ile füzyonunu içerir, böylece yeni bir bireysel organizmanın gelişeceği bir füzyon içerir (Georgadaki, et al., 2016). Erkek gameti spermatozoanın döllenme kabiliyeti, kalsiyumun ( $Ca^{2+}$ ) hemen hemen her adımda yoğun bir şekilde yer aldığı, hiperaktivasyon, kemotaksi, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun uygun ve zamana bağlı olarak kazanılmasına bağlıdır. CatSper kanal ailesi, yukarıda belirtilen kriterlerin çoğunu karşılayan ve esas olarak hücrelere  $Ca^{2+}$  girişini düzenleyen ve bu nedenle sperm fertilitesi için çok önemli olan  $Ca^{2+}$  kanal ailesidir (Rahman et al., 2014).

Sperm-spesifik iyon kanalı olan sperm katyon kanalı (CatSper), döllenme olaylarının düzenlenmesinde oldukça etkilidir. CatSper, polimodal, kemosensör bir kalsiyum kanalı görevi görür ve sperm hiperaktivasyonunun düzenlenmesinde hayati bir rol oynar. Yapılan çalışmalarda CatSper genindeki mutasyonlar ve delesyonların infertiliteye yol açabileceğini gösterilmiştir. Aslında infertil bireylerde CatSper1 ve 2 mutasyonları belirlenmiştir; Bununla birlikte, CatSper3 ve 4 insan sperminde araştırılmamıştır. CatSper1 ve CatSper2 gibi onlar da spermden ve yalnızca sperm kuyruğunun temel parçasında işlev görürler. İnsan sperminde araştırmalar az olsada Catsper3 ve Catsper4, farelerde sperm hiperaktivasyon motilitesinde ve erkek fertilitesinde önemli bir rol oynadığı gösterilen Catsper1 ve Catsper2'ye yakın homolog testis spesifik genlerdir. Catsper3 ve Catsper4 mutasyonuna sahip erkek farelerin, hızlı hareketlilik kaybı ve kapasitif koşullar altında hiperaktif motilite eksikliği nedeniyle tamamen infertil oldukları bildirilmiştir. CATSPER kanalı aynı zamanda erkek kontraseptifleri için mükemmel bir ilaç hedefi olabilir (Jin, et.al., 2016).

Sperm koku reseptörlerinin kemotaksis hareketinde önemli bir faktör olduğunu ve kalsiyum kanallarında meydana gelen değişiklikleri birçok araştırmacı önceki çalışmalarında göstermiştir. Yumurtayı çevreleyen kümülüs hücreleri tarafından salgılanan steroid hormon progesteron, insan spermelerinin güçlü bir uyarıcısıdır. Spermatozoayı yumurtaya doğru çeker ve yumurtanın koruyucu bölgesine nüfuz etmelerine yardımcı olur. Progesteron, Spermatozoa'ya  $Ca^{2+}$  akışını indükler ve

sperm hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve yumurtaya karşı kemotaksi gibi başarılı dölllenme için gerekli olan çoklu  $Ca^{2+}$  bağımlı fizyolojik tepkileri tetikler. Progesteron, CatSper'i spermin progesteron reseptörü olarak tanımlayan, CatSper kalsiyum taşıma aktivitesini önemli ölçüde artırır (Lishko et al., 2011). Yapılan çalışmalarda kullanılan Burjonal reseptörler için güçlü bir agonist ve kemoatraktandır. Bu kemoatraktan kullanılarak spermde bulunan koku reseptörlerinin etkileşimi hakkında bize önemli bilgiler kazandırmıştır. Bazı araştırmacılar ise tavşanda ki oosit kumulus hücrelerinde bulunan progesteronun burjonal gibi kemotaksis hareketi üzerinde etkili olduğuna dair çalışmalar yapmışlardır fakat sperm odorant reseptörleri ve kalsiyum katyon kanallarının spermlerin yumurtaya ulaşabilmesi ve normal fizyolojisini gerçekleştirilmesi konusunda insan çalışmaları eksik bulunmuştur.

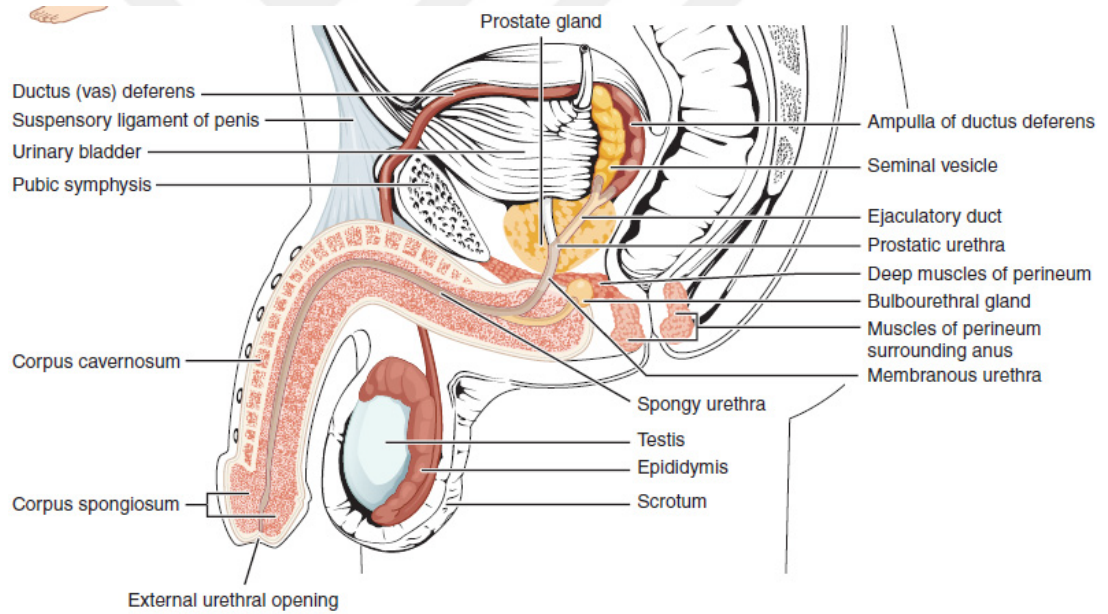
Bu çalışmada spermin yumurtaya doğru yüzme eylemine önemli katkısı olan odorant olarak hasta semenlerine progesteron uygulayarak, CATSPER kanallarına etkisi göz önüne alınarak, spermlerin in vitro performansının geliştirilerek kuyruk hareketinde olumlu yönde bir artış ve fertilizasyona katkı sağlaması için spermin fonksiyonlarının ve kalsiyum kanallarının incelenmesi amaçlanmıştır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Erkek Üreme Sistemi

İnsan üremesindeki rolü için benzersiz olan gamet hücresi, 23 kromozom taşıyan özel bir seks hücresidir. Döllenme sırasında, sperm (veya spermatozoon) olarak adlandırılan bir erkek gametindeki kromozomlar, bir oosit adı verilen bir kadın gametindeki kromozomlarla birleşir. Erkek üreme sisteminin (Şekil 1) işlevi, sperm üretmek ve onları dişi üreme kanalına transfer etmektir. Eşleştirilmiş testisler, erkek üreme fizyolojisini destekleyen hormonlar olan hem sperm hem de androjen ürettikleri için bu süreçte çok önemli bir bileşendir. İnsanlarda en önemli erkek androjen testosterondur. Çeşitli aksesuar organlar ve kanallar, sperm olgunlaşma sürecine yardımcı olur ve spermi ve diğer seminal bileşenleri, spermi dişi üreme sistemine ileten penise taşır.



**Şekil 1:** Erkek Üreme Sistemi. Erkek üreme sisteminin yapıları testisleri, epididimitleri, penisi ve semen üreten ve taşıyan kanalları ve bezleri içerir. Sperm, skrotumdan, spermatik kord içinde bulunan duktus deferens içinden çıkar. Seminal veziküller ve prostat bezi, sperm üzerine semen oluşturmak için sıvı ekler.

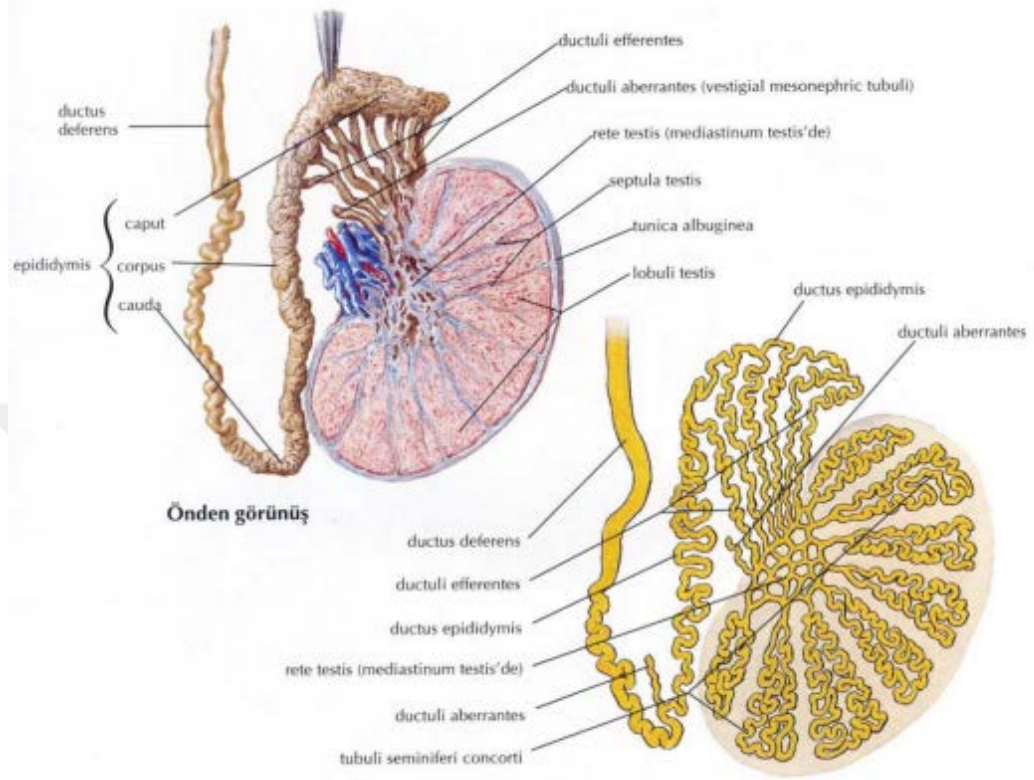
#### 4.1.1. Testis

Testisler glandüler dokudan oluşur ve her testis, yoğun beyaz fibröz bir kapsül olan tunica albuginea'da bulunur (Thibodeau and Patton, 2005). Testisler gevşek deri, yüzeysel fasya ve düz kastan oluşan bir kese olan skrotumda tutulur (Tortora and Derrickson 2013). Testisler, doğumdan yaklaşık iki ay önce karın boşluğundan ve skrotal keseye inerler, böylece vücut dışında uzanırlar (Peate, 2009). Bu önemlidir çünkü testislerin sıcaklığı spermin gelişimi ve hayatta kalması için çok önemlidir ve çekirdek vücut sıcaklığından daha düşük olması gerekir (Thibodeau and Patton, 2005). Dış ortam çok soğuk olursa, skrotal kese içindeki istemsiz kaslar büzülür ve testisleri vücuda yaklaştırır, vücut ısısının emilmesini sağlar ve ısı kaybını azaltır. Dış ortam çok sıcaksa, iskelet kasları gevşer ve testisler daha soğuk havanın dolaştığı yerlerde sıcaklıklarını düşürmek için iner (Tortora and Derrickson, 2013). Testislerin glandüler dokusu, her biri üç adet seminifer tübül içeren 200-300 lobül içerir (Watson, 2005). Sperm, seminifer boruların duvarlarında gelişir ve boruların lümenine salınır. Sertoli hücreleri tarafından, yarım tübüller içerisinde üretilen sıvı, spermin testis kanallarında taşınmasını sağlar (Thibodeau and Patton, 2005). Genç erkeklerde seminifer tüpler tarafından her gün yaklaşık 120 milyon sperm üretilmektedir (Peate, 2009). Sperm üretimi, erkekler yaşlandıkça yavaşlama eğilimindedir (Farley et al., 2011), ancak daha yaşlı erkekler, seksenli ve doksanlı yaşlarda çocuk sahibi olmaya devam edebilir. Lobüller arasında interstisyel denilen küçük özel hücreler veya erkeklik hormonu testosteronu salgılayan Leydig hücreleri bulunur (Thibodeau and Patton, 2005). Testiküler kapsül 3 tabakadan meydana gelmiştir.

1- Tunika Vaginalis: En dışta bulunan ve düzleşmiş mezotelyal hücrelerden oluşan tek bir tabakadır. Kapalı seröz kesenin visseral tabakası peritondan köken alır. Testisin ön ve yan yüzeylerini çevreler. Ayrıca yüzeyde skrotum üzerinde uzanarak T.vaginalisin paryetal tabakasını oluşturur. Tunika vaginalisin visseral tabakası bir bazal lamina üzerine oturmuştur. Visseral ve pariyetal tabakalar arasındaki seröz boşluk testisin serbestçe hareketine izin verir.

2- Tunika Albuginea: En belirgin tabakadır ve bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılmıştır. Tunika albuginea düz kas hücreleri içeren yoğun fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Testisin epididimise komşu olduğu posterior yüzeyde bu düz kas hücreleri daha yoğun halde bulunurlar.

3- Tunika Vasküloza: Testiküler kapsülün en iç tabakası olan tunika vasküloza ince bir areolar bağ dokusu içerisine gömülmüş olan kan damarları ağlarından oluşmuştur.



Şekil 2: Testis yapısı ve seminifer tübüller (Netter F.H. ,2008)

#### 4.1.2.Seminifer tübüller

Yetişkin bir insan testisinin ortalama hacmi 30 mL'dir ve parankiması tunica albuginea'dan kaynaklanan septasyonlarla 200-300 lobüle bölünmüştür. Bu lobüllerin her biri, gerildiği zaman uzunluğu 70-80 cm olan ve testis başına toplam 250 m uzunluğunda olan, her biri bir ila üç döngü STs içerir (Turek, P. J., 2012). ST'ler testisin işlevsel birimidir ve organın üçte ikisini kaplar. Bunlar bazal membrandan, Sertoli hücrelerinden (SC'ler) ve çeşitli olgunlaşma aşamalarındaki germ hücrelerinden oluşur. Şimdiye kadar 13 tip insan germ hücresi (GC) tanımlandı. Bunlar olgunlaşma düzende sınıflandırılmış, karanlık tip A spermatogoniumlar olan, soluk tip A spermatogoniumlar, B tipi spermatogonia, preleptotene, leptoten, zigoten ve primer spermatozoidler, ikincil spermatozoidler pakiten ve Sa, Sb, Sc, Sd1 ve Sd2 spermatidleri (Clermont, Y., 1963). Bir peritübüler doku ST'yi çevrelemektedir ve myoid hücrelerin katmanlarından, fibrosit benzeri adventisyel hücrelerin ve kolajen

matrisinden oluşmaktadır. SC'ler ile birlikte, bu peritübüler doku kan testis bariyerini (BTB) oluşturur (Hermo, L., Lalli, M., and Clermont, Y., 1977).

#### **4.1.3.Sertoli hücreleri**

Uzun, prizmatik şekilli bu hücreler bazal lamina üzerine oturmuştur. Bazal laminadan seminifer tubul lümenine uzanır ve gelişmekte olan spermatogonik hücrelere kriptalar sağladığı için düzensiz apikal ve lateral hücre membranlarına sahiptirler. Ökromatik Sertoli hücre çekirdeği 7-9 nm kalınlığında filamentöz bir kılıfla çevrilmiştir ve hücre tabanının biraz yukarısında yer alır. Oval veya üçgen şekilli büyük soluk çekirdeklerin derin invaginasyonlarla karakterizedir ve 1-2 adet belirgin çekirdekçik içerir. Çekirdeklerin sahip oldukları karakteristik çekirdekçikler bu hücrelerin spermatogonik hücrelerden ayırt edilmesinde oldukça önemli bir kriterdir; çekirdekçik oldukça belirgindir, merkezi asidofil kısmın periferinde bazofil materyal kümeleri görülür. Tespit edilmiş preparatlarda sitoplazma retiküler görünümündedir, içerisinde küçük fibriller, lipid damlacıkları, küçük uzamış mitokondriyonlar bulunur.

Sertoli hücreleri;

1. Spermatik hücreleri için gerekli besini ve fiziksel desteği sağlamak
2. Sitoplazmik artıkları fagosite eder.
3. Fruktozca zengin bir sıvı sentezler ve salgılar.
4. Birbirleriyle yaptıkları sıkı bağlantılarla spermatogonik hücreleri içlerinde muhafaza ederek kandaki savunma hücrelerinin otoimmünitesinden korurlar (Kan Testis Bariyeri)
5. ABP ve inhibin salgılar.
6. Testiküler transferrin ile demir alınımını sağlar.
7. Antimüllerian Hormon (MIF) ile embriyogenezde ovaryum oluşmasını engeller (Kierszenbaum A. L., 2006, Eşrefoğlu M., 2016).

#### **4.1.4.Leydig hücreleri**

Leydig hücreleri, erkek cinsel organlarının ve beyin erilleşmesinin farklılaşması için gerekli olan yüksek androjen düzeylerini (testosteron veya androstenedion) üretir. Androjen üretimi, bu hücrelerin kaybıyla azalır ve doğum sonrası nadir görülür. Testosteron daha sonra kök hücrelerden yetişkin Leydig hücre gelişimi ile kademeli

olarak yüksek seviyelere çıkar. Yetişkinlerde, luteinize edici hormon (LH), Leydig hücresi LH reseptörlerine bağlanma, cAMP üretimini uyararak, kolesterol translokasyon oranını mitokondriye yükseltir. Kolesterol, iç mitokondriyal zardaki CYP11A1 enzimi tarafından pregnenolona ve mitokondri ve pürüzsüz endoplazmik retikulum enzimleriyle testosterona pregnenolona metabolize edilir. İç mitokondriyal membrana kolesterol translokasyonu, kolesterol bağlayıcı translokator protein, gerilime bağlı anyon kanalı ve diğer mitokondriyal ve sitosolik proteinlerden oluşan mitokondriyal temas bölgelerinde oluşan bir protein kompleksi aracılık eder. Steroidojenik akut düzenleyici protein, membranlar boyunca kolesterol hareketlerini arttırmak ve böylece testosteron oluşumunu arttırmak için bu komplekste etki eder. 14-3-3 $\gamma$  ve  $\epsilon$  bağdaştırıcı proteinleri, oluşan azami steroid miktarını kontrol eden, steroidogenezisin negatif düzenleyicileri olarak görev yapar. Testosteron üretimindeki düşüş birçok yaşlanma ve genç erkekte meydana gelir ve bu da metabolik ve yaşam kalitesi değişiklikleriyle sonuçlanır. Testosteron replasman tedavisi, hipogonadal erkeklerde serum testosteron seviyelerini yükseltmek için yaygın olarak kullanılır. Testosteron oluşumunda yer alan mekanizmalardan edinilen bilgiler sayesinde, Leydig hücre stimülasyonu ile serum testosteronu arttırmak için farmakolojik araçlar kullanılması da düşünülebilir.

#### **4.1.2. Erkek Genital Kanal Sistemi**

##### **4.1.2.1. Duktilli eferentes, Epididimis, Ductus Deferens**

Erkek üreme sisteminin kanalları epididimitler, vas deferens, boşalma kanalları ve uretradır. Sperm, seminifer tübüllerden, skrotum içindeki her testisin üstünde ve arkasında uzanan epididimine gider (Watson 2005). Epididim, çoğunlukla altı metre uzunluğundaki sıkıca sarılmış duktus epididiminden oluşur. Sperm epididimde olgunlaşır, daha hareketli hale gelir ve ikincil oositi dölleyebilir. Sperm bu kanal boyunca cinsel uyarılma sırasında güçlü peristaltik kasılmalar ile vas deferens'e ilerleyin (Tortora ve Derrickson 2013). Vas deferens ayrıca sperm için geçici bir depo görevi görür. Epididim, kasık kanalından geçen ve mesanenin arka yüzeyinden geçen pelvik boşluğa giren vas deferens'i oluşturmak için düzeltir ve genişler. Vas deferens ureter üzerinden ve idrar torbasının arkasından geçer ve boşalma kanalını oluşturmak için seminal vezikül kanalına bağlanır (Tortora and Derrickson, 2013). Penise girerken

vas deferens'e kan ve lenfatik damarlar ve otonom sinirler eşlik eder; bunlar ve vas deferens birlikte spermatik kord oluşturur (Tortora and Derrickson, 2013). Boşalma kanalı, prostat bezinden geçer ve spermin üretraya ulaşması için bir yol görevi görür. Üretra, spermin boşalma kanallarından penisin içinden dış üretral orifiste vücudun dışına geçmesi için bir yol sağlar (Thibodeau and Patton, 2005).

#### **4.1.2.2.Penis ve üretra**

Penis başlıca üç silindirik erektil doku kitlesi ile üretrayı içermekte olup, dıştan deri ile sarılmıştır (Junqueira et al., 1998). Üretra penis içinde bulunur ve hem semen boşalması hem de idrar atılımı için bir yol sağlar. Anatomik olarak penis bir kök, vücut ve penis başı penisinden oluşur. Penisin gövdesi üç erektil doku kolonu içerir: üretrayı çevreleyen korpus spongiosum ve iki lateral corpora cavernosa (Thibodeau and Patton, 2005). Bu kolonlar cilt ve deri altı tabaka ile kaplıdır ve mükemmel bir kan kaynağına sahiptir. Korpus spongiosumun distal ucu üçgen bir yapı oluşturacak şekilde genişler, üretranın vücudun dışına çıktığı glans penisini meydana getirir (Tortora and Derrickson, 2013). Glans penisi, sünnet veya sünnet derisi denilen gevşek bir şekilde oturan iki kat ciltle kaplıdır (Watson, 2005).

#### **4.1.3.Erkek Genital Sistemin Yardımcı Bezleri**

Aksesuar cinsiyet bezleri seminal veziküller, prostat bezi ve burbourethral bezleridir. Eşleştirilmiş seminal veziküller, arka duvarda mesanenin tabanında bulunur (Clancy and McVicar, 2009). Seminal veziküller, seminal sıvı hacminin yaklaşık %60'ına katkıda bulunur. Bu viskoz, alkalın salgılama, spermlere enerji sağlamak için fruktoz, spermin sitoplazmasında metabolik reaksiyonlarda rol alan spermin kadın üreme sistemi ve askorbik asit yoluyla hareketini geliştirmek için prostaglandinleri içerir (Clancy and McVicar, 2009). Prostat bezi, idrar yolunu idrar kesesini bıraktığı yerden sayar. Halka şeklindedir ve yaklaşık olarak bir golf topunun büyüklüğündedir (Tortora and Derrickson, 2013). Prostat bezi ergenlik döneminden 30 yaşına kadar stabil hale geldiğinde hızla büyür, ancak 45 yaş civarında erkeklerde tekrar büyümeye başlayabilir (Tortora ve Derrickson 2013). Prostat bezi ince, süt renkli bir sıvı üretir ve semen hacminin%30'unu oluşturur. Bu sıvı spermin aktivitesine katkıda bulunur ve hareketliliğini sürdürmeye yardımcı olur (Thibodeau and Patton, 2005). İki burbourethral rakor şekli ve büyüklüğü bir bezelye ile aynıdır. Prostat bezinin altına

uzanırlar ve alkalın salgılarını üretranın penil kısmına boşaltırlar. Salgıların alkali doğası, spermi idrar yolundaki asidik idrardan (Clancy and McVicar, 2009) ve vajinanın asidik ortamından korur. Mukus benzeri salgılar, penisin ve üretranın yağlanması sağlayarak, boşalma sırasında spermin zarar görmesini azaltır. Semen, sperm ve seminal veziküllerden, prostat bezinden ve burbourethral bezlerden salgılanan seksten oluşur. Semen'in pH değeri 7.2-7.7'dir, bu onu biraz alkalın yapar. Tipik bir boşalma hacmi, 50-150 milyon sperm / mL içeren 3.5-5.0 mL'dir. Çok sayıda sperm gerekir çünkü birkaç sperm sekonder oosite ulaşır (Tortora and Derrickson, 2013).

#### **4.2. Spermatogenez**

Spermiler, gelişim sırasında gonadlara giren ilkel germ hücrelerinden elde edilir. Primordial germ hücreleri, göç ettikleri ve yerleştikleri varsayımsal gonadlardan biraz uzakta ortaya çıkabilir. Germ hattının oluşumu, bu hücrelerin somatik hücrelerden ayrılmalarına neden olan bir sitoplazmik bileşen olan germ-plazmanın varlığına bağlıdır. İlkel germ hücreleri gonadda yerleştiğinde, organizmanın üreme için ihtiyaç duyduğu gamet arzını üretmek için mitoz tarafından bölünen kök hücreler haline gelirler. Gonadlara girdiklerinde, germ hücreleri, onları destekleyen, besleyen ve koruyan spesifik somatik hücrelerle birleşebilir; bu somatik hücreler Sertoli hücreleridir. Proliferatif faz sırasında, germ hücrelerine gonıa (spermatogonia) adı verilir ve organizmanın üreme için ihtiyaç duyduğu gametlerin yaşam arzını üretmek için mitoz tarafından bölünecek bir kök hücre popülasyonu olarak işlev görür. Organizma olgunluğa ulaştığında, germ hücreleri fonksiyonel gametlere farklılaşma yeteneği kazanır ve kromozom sayısını 2n'den 1n'ye düşürmek için mayozdan geçer. Spermiler, spermatogenez işlemi ile üretilir. Spermatogenez dört aşamaya ayrılır: (a) Primordial germ hücrelerinin ekstragonadal orijini, (b) Germ hücrelerinin mitozla çoğalması, (c) Mayoz geçirmesi, (d) Spermatozoanın yapısal ve fonksiyonel olgunlaşması.

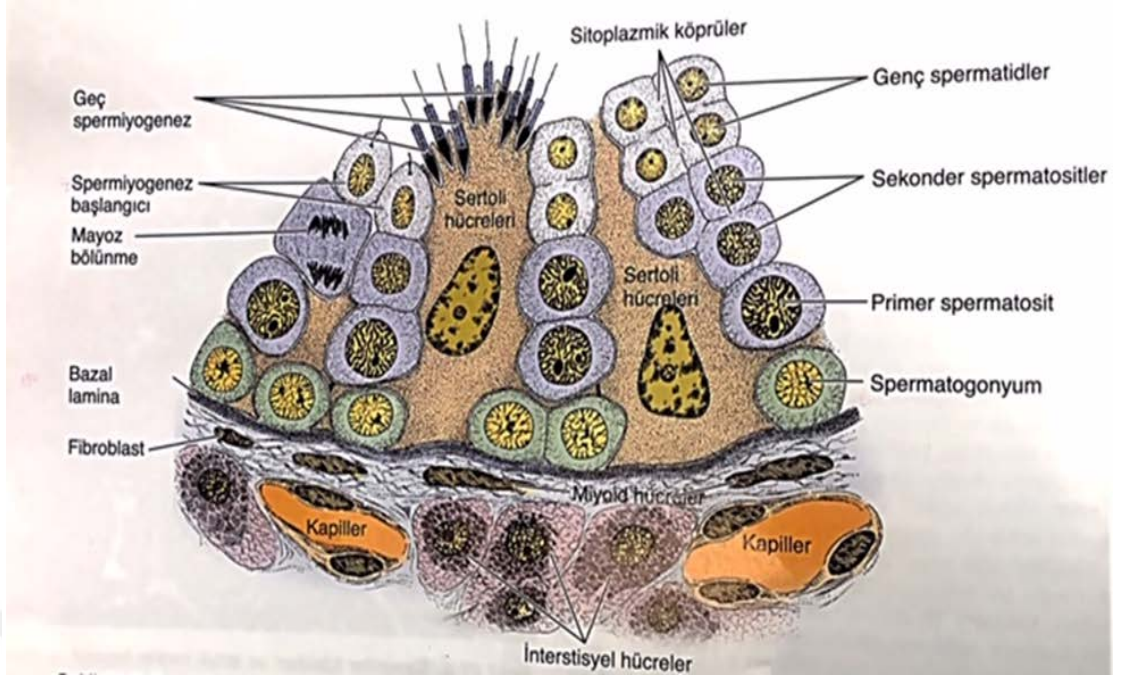
Spermatogenez, spermatidlerin oluştuğu süreçtir. Epitelinin bazal laminasının yanında yer alan ve yaklaşık 12 um çapında nispeten küçük bir ilkel germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Cinsel olgunlukta, spermatogonia, art arda hücre kuşakları üreterek, mitoz bölünmeye başlar. Spermatogenezis, 3 faza ayrılabilir.

1)Spermatogonial faz: Spermatagonia, kök hücreleri ve primer spermlerin oluşması için mitoz bölünür. Spermatogonial faz sırasında Ap tipi spermatogonia (Ad tipindeki kök hücreler), çoklu klonlar üretmek için tekrarlanan mitotik bölünmeye maruz kalır; Bu bölümler sırasındaki sitokinez tamamlanmamış ve kök hücrelerin hepsi bir plazmodyum oluşturan bir sitoplazmik köprü ile bağlanmıştır. Bu sitoplazmik süreklilik, bağlantılı hücrelerin senkron gelişiminden sorumludur. Bu evrenin sonunda bağlı Ap tipi spermatogonya B tipi spermatogonya olarak farklılaşır.

2)Spermatosit fazı: Primer spermler, haploid spermatidler üretmek için iki mayotik bölüme tabi tutulur. Spermatosit fazı sırasında her B tipinin mitotik bölünmesi, spermatogonya, seminifer tübülün lümen kompartmanına göç eden 2 kardeş primer spermi üretir. Mayoz 1 geçirilmeden önce, bu hücreler DNA'larını kopyalar, böylece kromatitler DNA'nın (2d) miktarı kadar iki katına çıkarılır (4N). Mayoz 1 başladığında, üstünden geçme olabilir ve metafaz sırasında maternal ve parental kromozomunun rastgele ayrılır. Mayozun 1 sonunda, iki sekonder sperm (2N, 1d) oluşur. Sekonder spermatozidler, spermatidlerin (1N, 0.5d) oluşmasıyla sonuçlanan DNA sentezi (S fazı) olmadan hızlı bir şekilde mayoz 2'ye geçerler.

3)Spermatid faz: Spermatidler olgun sperm hücrelerine farklılaşır (spermatozoa). Spermatid faz (Spermiogenesis) sırasında Spermatitler (olgunlaşmamış gametler), fiziksel olarak Sertoli hücrelerine bağlı kalırken spermatozoa (olgun gametler) halinde gelişir.





**Şekil 3:** Seminifer tübül ve çevresindeki dokunun bir bölümü (Junqueira et al., 1998).

#### 4.3.Spermiyogenez

Spermiyogenez, spermatozoaların üretiminin son aşamasıdır. Spermiyogenez sırasında spermatitler, erkek DNA'sını yumurtaya vermek için oldukça uzmanlaşmış hücreler olan spermlerin spermatozoalarına dönüşür. Bu işlem sırasında hücre bölünmesi olmaz. Spermiyogenez, akrozomun oluşumunu, yoğunlaşmayı ve çekirdeğin uzamasını, flagellum gelişimini ve sitoplazmanın çoğunun kaybını içeren karmaşık bir işlemdir. Sonuçta olgun spermatozoon, daha sonra seminifer tübülün lümenine salınır. Bu 4 aşamada gerçekleşir: Golgi, cap, akrozom ve olgunlaşma aşamaları (Toshimori, 2009).

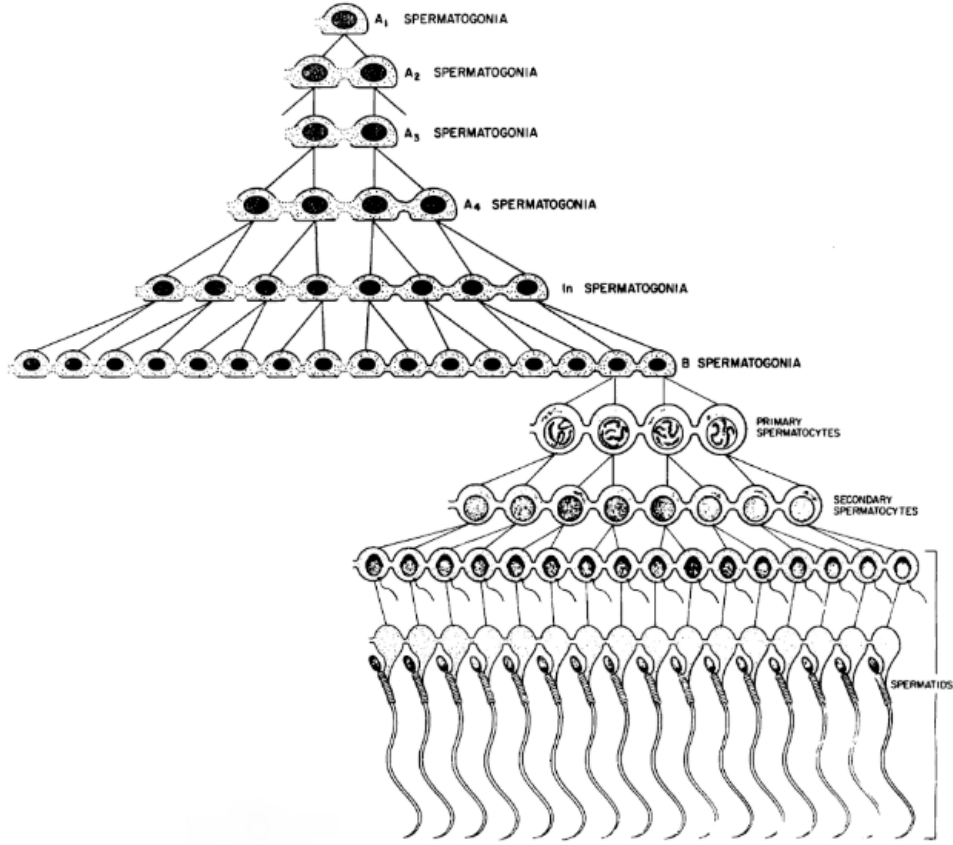
1)Golgi aşaması: Spermatitlerin kutupları kurulur. Trans-Golgi ağından türetilen proakrozomal veziküller, merkezdeki nükleer zarfla ve proksimal kısmıyla yakından ilişkili olan akrozomal granülleri içeren tek bir büyük akrozomal boşluk oluşturmak için birleşir. Bunu takiben, sentrioller flagellum oluşumunu başlatmak için karşı uca göç ederler.

2)Cap aşaması: Spermatitler geliştikçe, akrozomal vezikül (kapak) yavaş yavaş düzleşir ve çekirdek üzerinde yayılırken Golgi cihazı eş zamanlı olarak büyüyen boyun bölgesine doğru göç eder. Bu aşamada, yuvarlak spermatidler 200'den fazla spesifik transkript (gen) eksprese eder. Bununla birlikte, akrozom biyogenezindeki kritik

kontrol noktaları, cap fazından uzama fazına geçiştir. Bu nedenle spermiogenez, bu aşamada gen silme (Herb ve GOPC genleri gibi) ile kolayca bozulur. Bu mutantlarda Golgi'den türetilmiş veziküller kaynaşmaz ve spermatidler büyüdükçe akrozomal granüller çekirdekten tamamen ayrılır.

3)Akrozomal faz: Spermatid yeniden yönlendirilir, böylece flagellum lümene uzanır ve akrozom bazal laminayı gösterir. Çekirdek düzleşir ve uzar ve sitoplazma, flagellum etrafındaki mitokondriye konsantre olmak için posterioral olarak hareket eder. Sentioller çekirdeğe geri göç eder ve bağlantı parçası (boyun) oluşturur. Spermatid sitoplazması incilir, akrozom yavaş yavaş üstteki plazma zarına bakacak şekilde yönlendirilir ve uzayan spermatidlerdeki nükleer halka bölgesinden mançetler gelişmeye başlar. Akrozomal içerikleri yavaş yavaş elektron yoğun bir matriste yoğunlaşırken akrozomal kapağı uzar. Bir sonraki kontrol noktası, uzama (akrozomal) fazından olgunlaşma fazına geçiş dönemidir. IgSF proteinini RA175 kodlayan genin silinmesi, spermiogenezin yaklaşık olarak erken uzayan spermatitler aşamasında bozulmasına ve oligoteratozoospermiye neden olur.

4)Maturasyon fazı: Akrozomal veziküllerdeki yoğun madde (akrozomal granül), akrozomun ön kısmına ve arka akrozomuna nihayetinde farklılaşan akrozomal zarın tamamına yayılır. Bu süre zarfında, temel moleküller ön akrozom ve arka akrozom içine yer değiştirmiş ve düzenlenmiştir. Akrozomal matris proteinlerinin translasyon sonrası modifikasyonları geç spermatitlerde gözlenebilir; Aslında, akrozomal antijen MC41 ekspresyonu geç spermatidlerde aniden görünür hale gelir. Spermiyasyondan hemen önce, spermatidlerin sitoplazmasının ve organellerinin çoğu sitoplazmik damlacıktan atılır ve spermatitler lümen içine spermatozoa veya sperm olarak salınır. Spermatidlerden salınan kalıntı cisimler sonunda Sertoli hücreleri tarafından yutulur.



**Şekil 4:** Erkek Germ Hücrelerinin oluşumu (Fawcett, D. W., 1979).

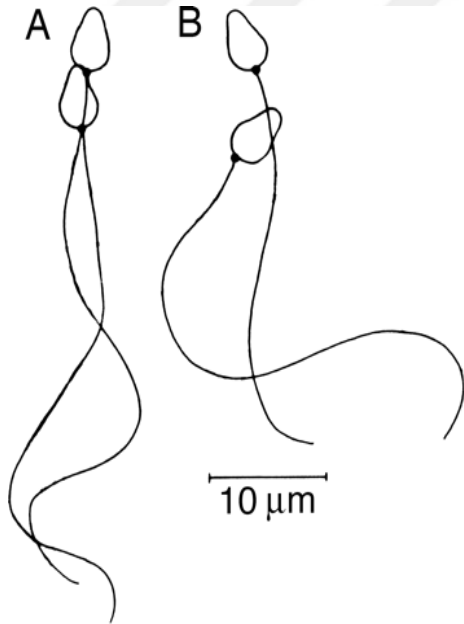
#### 4.4 Spermde Hiperaktivasyon Kontrolü

Sperm hiperaktivasyonu zona pellusida'nın penetrasyonun gerçekleşmesi için döllenmede önemli rol oynar. Hiperaktivasyon ayrıca, oviduktal lümeninden ve cumulus oophorus matrisinden serbest bırakılabilir. Hiperaktivasyon, spermdeki asimetrik flagellar bükülme ile karakterize edilir. Esas olarak CatSper kanallarının plazma membranından akması sonucu ortaya çıkan flagellar  $Ca^{2+}$ 'daki bir artışla ve  $Ca^{2+}$  salınmasıyla tetiklenir. Daha fazla pH ve ATP üretimi gerektirir.  $Ca^{2+}$ 'daki artışı tetikleyen fizyolojik sinyaller belirsiz kalır, ancak artmış  $Ca^{2+}$ 'nın bir calmodulin / calmodulin kinaz yolu boyunca etki ettiğine dair kanıtlar vardır. Hiperaktivasyon, kapasitasyon işleminin bir parçası olarak kabul edilir ve spermi oosit yönünde çevirmek için kemotaktik sinyallerle modüle edilebilir. 1970 yılında Yanagimachi, hamster sperminin, in vitro oositleri dölleme yeteneğini kazandıkça aşırı aktif hale geldiğini bildirdi. Spermin bu şekilde yüzdüğünü, oviduktal ampulla duvarlarından görülebildiğini gözlemledi ve bu 'hiper aktif' hareketin, oosite ulaşmak için veya kümülüs ve zona pellusida'dan geçmek için daha fazla itici güç sağladığını öne sürdü

(Yanagimachi, 1970). İn vitro oviduktal epitel detoksifikasyonu ile insan sperminin hiperaktivize edildiği çalışmalarla gösterilmiştir. (Pacey et al., 1995).

#### 4.4.1 Hiperaktivasyonun Sperm Kuyruk Hareketine Etkisi

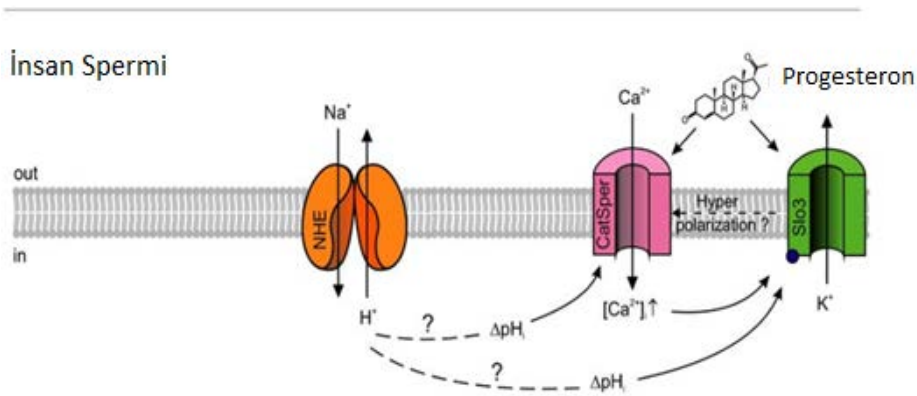
Türlerin çoğunda, olgunlaşmış spermler salınana kadar epididim içerisinde hareketsiz tutulur, bunun üzerine hızla yüzmeye başlarlar. Bu süreç hareketliliğin aktivasyonu olarak bilinir. Aktivasyon sperm kuyruğunun asimetrik bir kamçı hareketi yapmasına sebep olur (Suarez and Dai, 1992). Sperm hiperaktivasyona uğradığında, flagellar kıvrımının genliği, genellikle flagellumun sadece bir tarafında artar. Bu, oldukça asimetrik olan ve genellikle hiperaktivasyonlu sperm yüzmesine neden olan bir vuruş deseni üretir. Son derece asimetrik bükümler, sekiz rakamlı hareket kalıpları oluşturur. Asimetrik flagellar kıvrılma hareketi sırasında, kafanın sabit şekilde yuvarlanması, hiperaktivize edilmiş insan spermi için tarif edilen sarmal izlere yol açabilir (Morales et al., 1988).



**Şekil 5:** (A) Aktif ve (B) Hiperaktivasyonlu Sperm (Morales et al., 1988).

#### 4.5.Sperm CATSPER Kanalı Ve Hiperaktivasyon İlişkisi

Fertilizasyon sırasında  $Ca^{2+}$  sinyalleri, sperm kapasitasyonundan ve hareketliliğinden sperm ve yumurta arasındaki füzyona kadar her adımda merkezi bir rol oynar (Yanagimachi et.al. ,1994). İkincil mesajcı  $Ca^{2+}$  iki kaynaktan gelebilir: plazma membran kanallarından getirilen hücre dışı  $Ca^{2+}$  veya organellerde depolanan  $Ca^{2+}$ . Hiperaktivasyon için baskın  $Ca^{2+}$  kaynağı, CatSper ailesindeki proteinlerin oluşturduğu plazma zarı  $Ca^{2+}$  kanallarından getirilen hücre dışı  $Ca^{2+}$ 'dır (Kirichok et al., 2006). Memeli spermde birkaç  $Ca^{2+}$  geçirgen iyon kanalı proteini bulunmuştur. Bunlar voltaj kapılı  $Ca^{2+}$  kanallarını, geçici reseptör kanallarını, siklik nükleotid kapılı kanalları ve CATSPER kanallarını içerir (Darszon et al., 2005). Bununla birlikte, sadece dört memeli CatSper üyesi (CatSper 1-4) testiste kısıtlayıcı bir şekilde eksprese edilir ve erkek doğurganlığı için gerekli olduğu açıkça gösterilmiştir. Dört CATSPER proteini esas olarak sperm kuyruğunun distal kısmının plazma zarına, ana parçaya yerleştirilir ve heterotetramerik, pH ve voltaja bağlı bir  $Ca^{2+}$  geçirgen kanal oluşturur. CatSper proteinleri sadece erkek germ hücrelerinde eksprese edilir ve olgun spermelerde flagellumun ana parçasına yerleşir (Carlson et al., 2005; Jin et al., 2007).

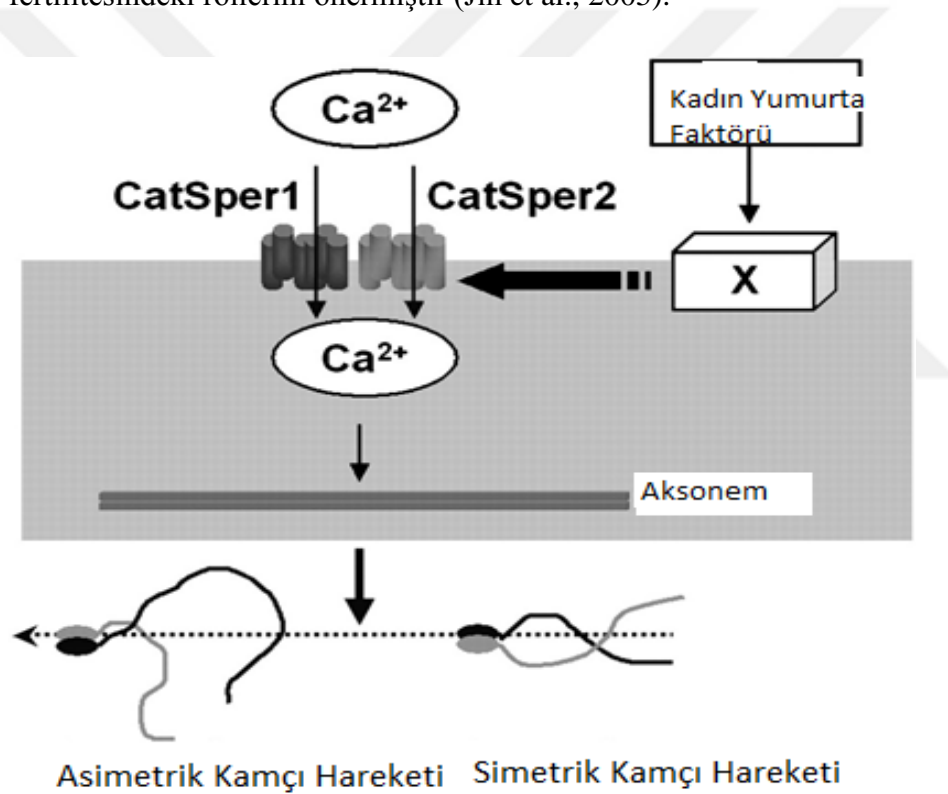


**Şekil 6:** İnsan spermının kemosensör sinyal yollarında CatSper'in rolü

CATSPER kanallarından  $Ca^{2+}$  girişi hiperaktivasyonun tetiklenmesinde rol oynar.  $Ca^{2+}$  girişinin fare spermde kuyruktan baş kısmına doğru  $Ca^{2+}$  yayılmasını tetiklediği gösterilmiştir. 8-Br-cAMP, 8-Br-cGMP veya alkalin depolarizasyonu ile

aktive edildiğinde, hücre içi  $Ca^{2+}$  + konsantrasyonundaki CATSPER'e bağlı bir artış, ana parçada başlar, orta parça boyunca ilerler ve kafaya birkaç saniye içinde ulaşır((Xia et al., 2007).

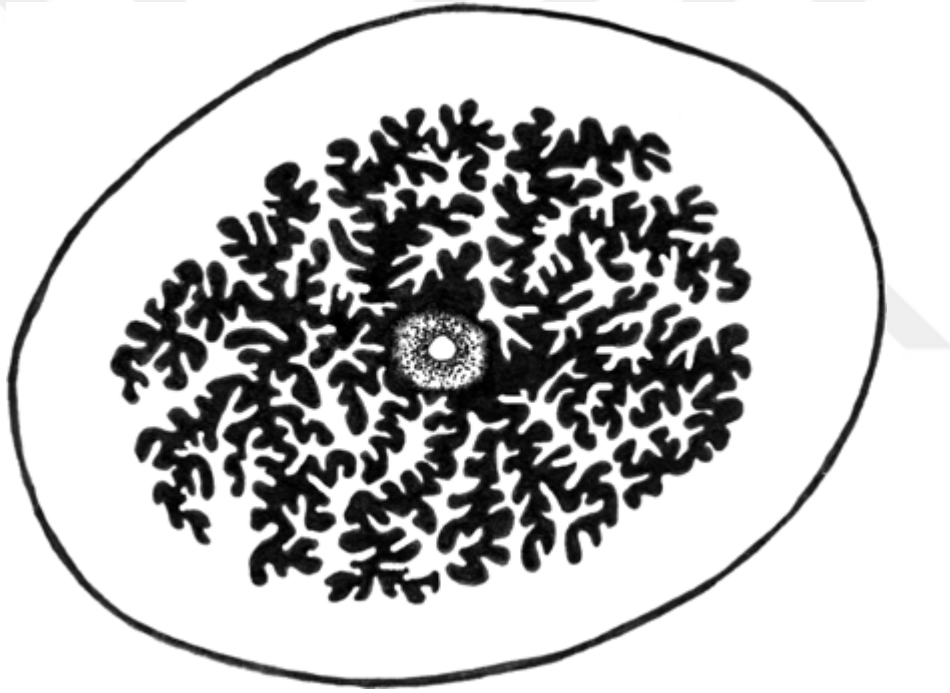
CatSper1 ve CatSper2'nin fare sperm hareketliliği ve erkek fertilitesi için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Carlson et al., 2003, 2005). Son zamanlarda, sperm hücresi kapasitasyonu sırasında alkalileştirme ile  $Ca^{2+}$  + akım aktivasyonu için CatSper1'in gerekli olduğu ortaya çıkmıştır (Kirichok et al., 2006). Primat ve kemirgende CatSper1'in evrimi çalışması, ayrıca sperm rekabetinde önemli fizyolojik rollerini de ortaya koymaktadır (Podlaha et al., 2003; Podlaha et al., 2005). CatSper3 ve CatSper4'e gelince, son zamanlarda yapılan bir çalışma akrozom reaksiyonu ve erkek fertilitesindeki rollerini önermiştir (Jin et al., 2005).



**Şekil 7:** Sperm hücresi hiperaktivasyon hareketliliğinin başlatılması için hipotetik bir model (Quill et al., 2003)

#### 4.6. Progesteron Sperm İlişkisi

Progesteron oositi çevreleyen yumurtalık ve kümülüs hücreleri tarafından salınan foliküler sıvının önemli bir bileşenidir. Foliküler sıvıda yüksek seviyelerde bulunan progesteron, insan spermatozoasında akrozom reaksiyonunun başlatılması için fizyolojik bir uyarıcı olarak gösterilmiştir (Osman et al., 1989). Nanomolar P4 konsantrasyonları, genomik olmayan P4 reseptör yolu boyunca etki eder ve katyon kanalının aktifleştirilmesi yoluyla Catsper kanalında yüksek bir artışa sebep olur. Hücre içi  $[Ca^{2+}]$  'deki bu artış, hiperaktivasyon olarak bilinen sperm hareketliliğinde değişikliklere yol açar ve akrozomal ekzositoz için spermi başlatır.



**Şekil 8:** Yumurtalık fallop tüpü içerisinde kümülüs çevrili insan oositinin (ortada) ölçeklendirilmesi için çizilen bir şema (Suarez and Pacey, 2006).

Progesteron, sperm fonksiyonlarını uyarır, örn. hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu, oosit zona pellusida'ya bağlanma ve hamster oositine penetrasyon oranı. Bu etkilerin fizyolojik önemi, progesteron içeriğine göre sperm fonksiyonunu modüle eden kadın genital sistem sıvıları kullanılarak gösterilmiştir. Progesteron, klasik nükleer reseptörlerin aksine, spermatozoonun plazma membranında bulunan spesifik

sperm bağlanma bölgeleriyle etkileşime girer. Bağlanma çalışmaları, insan spermatozoonunda iki progesteron reseptörü sınıfının varlığını ortaya koymuştur, bir sınıfın yüksek bir afinite sabiti (nanomolar) vardır ve progesteron için spesifiktir, diğer sınıf ise mikromolar aralıkta bir afinite sabiti vardır ve diğerlerine eşit derecede iyi bağlanır. Progesterona maruz kalmanın ardından ana olay, hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunun hızlı (saniyeler içinde) artması ve ardından birkaç dakika devam eden (plato fazı) sürekli bir artıştır. Progesteron ayrıca, tripsin benzeri bir proteolitik aktivite, poliaminin biyosentezi (putresin ve spermidin), fosfolipaz A2 etkinliği ve sperm hücresindeki protein tirozin kinaz aktivitesini uyararak sperm fonksiyonunu da modüle eder. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, klorür iyonu akışının progesteronun akrozom reaksiyonunu arttırması için hayati olduğunu göstermiştir. Bu etki, nöronal GABA (A) reseptörüne benzeyen bir sperm membran reseptörü ile etkileşimle elde edilir. Buna göre, spermatozoon plazma membranında GABA (A) reseptörleri bulunmuştur ve GABA, hiperaktivasyonu uyarmakta ve akrozom reaksiyonunu desteklemektedir.

Steroid hormonları gelişme, metabolizma, iltihaplanma, iyon homeostazı ve üreme gibi temel organizma fonksiyonlarını kontrol eder. Konvansiyonel modele göre, steroid hormonları, bir steroid hormona bağlandıktan sonra hormon reseptör kompleksinin çekirdeğe translokasyonunu başlatan ilgili bir genomik reseptör üzerinden sinyal verir. Orada gen ekspresyonunu değiştirerek transkripsiyon faktörü olarak hareket eder ve böyle bir işlem saatlerce sürebilir (Lösel and Wehling, 2014). Bununla birlikte, hücrenin hücre dışı tarafında membran reseptörüne bağlanan steroid hormonu tarafından başlatılan daha hızlı bir yol daha vardır. İkinci sinyal, genellikle iyon kanallarının aktivasyonu ile sonuçlanan ikinci habercileri ve sinyal iletim basamaklarını içerir. Kadınlık hormonu progesteron (P4) spermin esas kalsiyum kanalı Catsper'i aktive eder ve potasyum kanalı KSper'i genomik olmayan yollar ile bloke eder. İyon kanalı fonksiyonlarının steroid hormonlarla modülasyonu kalpte, nöronlarda, düz kastave pankreas beta hücrelerinde bildirilmiştir (Miller et al., 2016).



#### **4.7.Sperm Kalsiyum İlişkisi**

Kalsiyum (Ca), hücre içi bir ikinci haberci olarak görev yapan önemli bir unsurdur. Spermatozoa'da spermatogenez, sperm hareketliliği, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve dölleme gibi birçok fizyolojik süreç için gereklidir. Her ne kadar Ca eksikliğinin sperm fonksiyonu ve erkek kısırlığı üzerindeki etkileri geniş çapta araştırılmış olsa da, bu anormallikler için mekanizmalar iyi düşünülmemiştir. Kötü sperm hareketliliği, kemotaksin bozulması, kapasitans, akrozom reaksiyonu ve steroidojenez, Ca eksikliğinin erkeklerde infertiliteye neden olduğu başlıca mekanizmalardır. Bu nedenle, sperm fonksiyonunu güçlendirmek ve başarılı bir döllemeye yol açan tüm adımlar için ideal bir seminal Ca konsantrasyonu gerekir. Ayrıca, bu mekanizmaların tanımlanması erkek üreme sistemindeki Ca eksikliğı mekanizmaları ve daha iyi bir klinik yaklaşım geliştirmenin yolu hakkında değerli bilgiler sağlar. Ca, memeli semeninin en kapsamlı çalışılan unsurlarından biridir (Blomberg et al., 2016). Hücre içi ve evrensel bir ikinci haberci olarak Ca'nın, sperm hücrelerinin maksimum hareketliliğı, kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu, kemotaksis ve dölleme süreçleri için çok önemli olduğu bilinmektedir (Valsa et al., 2015). İnsan spermatozoaları, bir kadın üreme sistemi yoluyla olgunlaşmadan önce bir oositi dölleyemez. Dölleme ve olgunlaşma süreci, hücre içi bir ikinci haberci olarak bu süreçte kritik bir dinamik rol oynayan bazı sinyalleşme basamakları ve Ca tarafından sıkı bir şekilde modüle edilir. Bu nedenle, Ca ile insan sperm fonksiyonu ve doğurganlık sonucu arasında yakın bir ilişki olabilir.

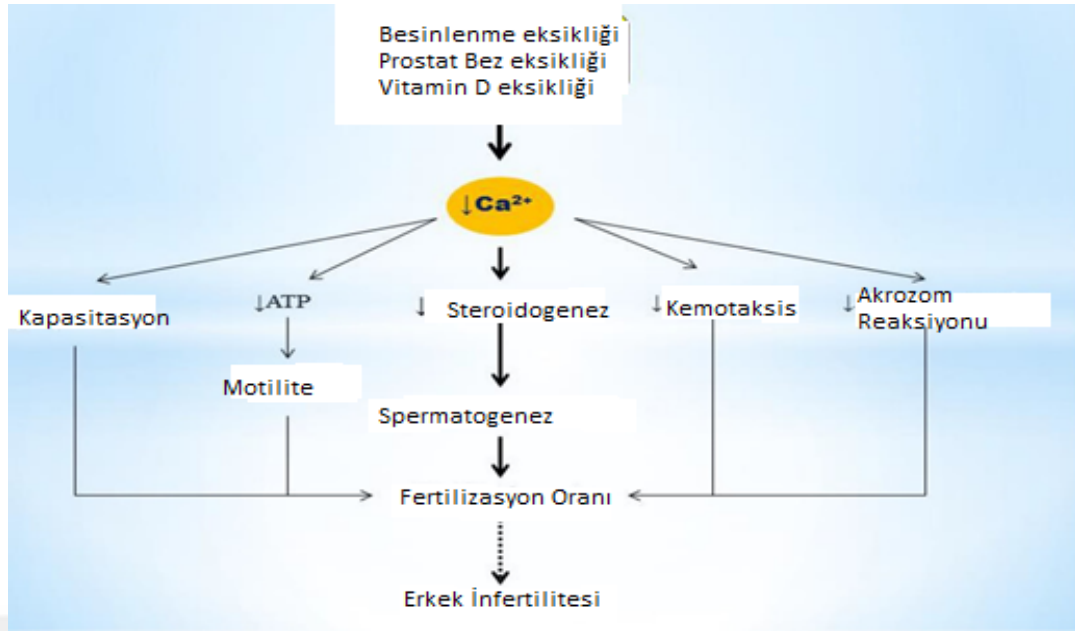
##### **4.7.1.Kalsiyum ve erkek infertilite ilişkisi**

Ca, hücre proliferasyonu, protein salgılanması ve kas kasılması gibi farklı biyolojik işlemlerde düzenleyici bir faktör olarak görev yapar (Valsai et al., 2015). Bu biyolojik olayların çoğı, calmodulin olarak bilinen hücre içi bir Ca reseptörü tarafından modüle edilir. Ca'ya bağlandıktan sonra, kalmodulin farklı enzimleri, özellikle protein kinazları (PK), fosfatazları ve fosfodiesterazları aktive edebilir (Darszon et al., 2011). Na / K-ATPase ve inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü (IP3R), hücre içi bir Ca depo reseptörü olarak, hücreler arası Ca konsantrasyonunu artırır (Costa et al., 2010).

Prostat bezi, insan semeninde Ca'nın ana kaynağıdır (Valsa et al., 2016). Prostatta Ca konsantrasyonu, seminal veziküller ve epididimis çok yüksek olduğundan, çok sayıda çalışma Ca ve erkek kısırlığı arasındaki ilişkiyi araştırmıştır (Hommonai et al.,1978). Birçok çalışma seminal Ca ile erkek kısırlığı arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Ca kanalı blokerlerinin erkek kısırlığı ile ilişkili olduğu da bildirildi. Örneğin, Prien ve ark. hipomotilitesi olan erkeklerin sperminin Ca düzeyinin normal motilitesi olan erkeklere göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi (Prien et al., 1990).

Benzer şekilde, Wong ve ark. (Wong et al., 2001), spermin hipomotilitesi olan hastalarda seminal Ca seviyesinin fertil deneklerden anlamlı derecede düşük olduğunu bildirmiştir. Başka bir çalışmada varikoseli olan ve olmayan infertil erkeklerin seminal plazmalarında fertil erkeklere kıyasla anlamlı derecede düşük Ca olduğu öne sürülmüştür (Hamada et al., 2013). Diğer çalışmalar da erkeklerde yüksek Ca düzeyleri ile doğurganlık arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Logoglu et al., 1997).

Başka bir araştırmada, normozoospermik infertil erkeklerin seminal plazmasında ki Ca konsantrasyonunun fertil erkeklerle karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğu; ancak, infertilite sınıflaması ile ilişkili değildi (normo-oligo ve azospermik), (Abou-Shakra et al., 1989), (Nishida et al., 1996), insan sperminin düşük Ca seviyesine in vitro maruz bırakılmasının döllenme yeteneğini arttırdığını göstermiştir. Bu nedenle, bu veriler azalmış seminal plazma Ca düzeyinin erkeklerde kısırlığa neden olabileceğini düşündürmektedir. Son çalışmalar, D vitamini (VD) ve seminal Ca konsantrasyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir. Blomberg Jensen ve diğ. (Blombergi et al., 2011), VD eksikliğinin hücre içi Ca seviyesinin düşmesinin ve ardından zayıf sperm hareketliliğinin, sperm akrozom reaksiyonunun eksikliğinin ve erkek kısırlık riskinin artması ile ilişkili olabileceğini belirtmiştir. Her ne kadar bu çalışmalar düşük Ca düzeyleri ile erkek kısırlık riski arasındaki ilişkiyi göstermiş olsada, Ca eksikliğinin spermatozoanın döllenme hızını etkilediği mekanizma iyi aydınlatılmamıştır. Bozulmuş spermatogenez, steroidojenez eksikliği, zayıf sperm motilitesi, sperm kemotaksisinde anormallik, üreme ve akrozom reaksiyonu ve düşük fertilizasyon oranı, erkek kısırlığındaki Ca eksikliği etkilerinin olası mekanizmaları olarak düşünülebilir.



**Şekil 9:** Ca<sup>2+</sup> eksikliğinin erkek kısırlığına etkileri için bir şematik (Beigi et al., 2019)

Hücre içi ve seminal plazma Ca'daki değişikliklerin sperm fonksiyonunu ve hareketliliğini etkileyebileceğine dair kanıtlar vardır. Spermatozoa, ortamın pH'ına bağlı olarak hücre içi Ca konsantrasyonundaki bir değişikliğe yanıt olarak hareketlerini modüle eder (Giroux et.al., 1997) . Çok sayıda çalışma Ca ve sperm motilitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Basse et al., 2013). Flagella'yı yönlendirmek için adenozin trifosfat (ATP) tarafından Ca'nın biyokimyasal gereksinimleri göz önüne alındığında, Ca ile sperm hareketliliği arasındaki ilişki mantıklı gibi görünmektedir.

Banjoko ve Adeseolu, hipomotil spermlerli erkeklerin (<%60) normal motiliteye sahip erkeklere göre daha düşük Ca konsantrasyonları gösterdiğini gözlemledi. Ayrıca seminal plazma Ca, sperm motilitesi ve sayısı ile negatif korelasyon gösterdi (Banjoko et al., 2013). Basse ve diğ. (Basse et al., 2013), seminal plazma Ca seviyesinin oligospermik, azospermik ve asthenoligospermik infertil erkeklerde, normal erkeklere göre anlamlı derecede düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Daha yeni bir çalışma, seminal plazma Ca konsantrasyonu ile pH, hacim, sperm sayısı ve% HOST dahil semen parametreleri arasında pozitif bir ilişki bulmuştur. Deneysel kanıtlar, bir Ca şelatörü olarak EDTA'nın kullanılmasının, Ca konsantrasyonunda bir düşüşe ve önemli miktarda sperm hareketliliğine neden olduğunu göstermiştir. Bu, Ca'nın sperm hareketliliği ve EDTA'nın spermatozoa üzerindeki yıkıcı etkisi üzerindeki düzenleyici

etkisini göstermektedir. Başka bir deneysel çalışmada, Uhland ve ark. 1,25 (OH) 2D3 işleminin, insan spermelerinde hücre içi Ca deposundan hücre içi Ca konsantrasyonunu arttırdığını, sperm hareketliliğini arttırdığını ve akrozom reaksiyonunu indüklediğini gösterdi (Uhland et al., 1992).

#### **4.7.2. Kemotaksi kalsiyum ilişkisi**

Sperm kemotaksisi, spermatozoanın yumurtaya doğru çekildiği bir işlemdir (Eisenbach, 1999). Bu döllenme sürecinde önemli bir olaydır ve sperm-yumurta etkileşiminin altında yatan mekanizma hakkında bir fikir verebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar Ca'nın sperm kemotaksisinde merkezi bir rol oynayabileceğini göstermiştir çünkü sperm flagellar atımını düzenler (Yoshida, 2011). Spermatozoon, dişi üreme sistemine boşaldığında, progesteron, hücre dışı boşluklardan spermatozoona Ca girişini uyarır. Hücre içi Ca artması, sperm flagellalarının atılmasına neden olur ve daha sonra kemotaktik dönüş ve "asimetrik kamçı" hareketlerine neden olur (Golpour et al., 2016).

#### **4.7.3. Kapasitasyonda Ca'nın rolü**

Kapasitasyon, sperm hücrelerinin, oositle ulaşmadan ve kaynaşmadan önce dişi üreme sistemi boyunca hareketleri sırasında bir dizi ardışık biyokimyasal ve moleküler olaya maruz kaldığı bir işlemdir. Sperm kapasitasyonu, dişi üreme kanalında bulunan çeşitli moleküller tarafından modüle edilir. Ca şimdi sperm kapasitasyonunu düzenleyen önemli faktörlerden biri olarak kabul edilir. Spermatozoon kapasitasyonu sırasında hücre içi Ca düzeyinin yanı sıra membran hiperpolarizasyonunda artış bildirilmiştir (Geybels et al., 2017). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, Ca'nın sperm cAMP-bağımlı sinyalleme ve tirozin fosforilasyon yollarının iki fazlı bir şekilde düzenlenmesi yoluyla sperm kapasiteyi modüle ettiğini göstermiştir (Golpour et al., 2017). Ayrıca, hücre içi Ca dağılımının, hayvanların erkek gametinde çiftleşme sonrası kapasitasyon sırasında yeniden şekillendiği gösterilmiştir (Niksirat et al., 2016). Ek olarak, yakın tarihli proteomik araştırmaları, ryanodin reseptörü, troponin ve sarkoplazmik Ca-bağlayıcı protein gibi bazı proteinleri, üreme aşamalarında farklı üreme aşamalarında hayvanların erkek gametindeki Ca sinyalizasyon işlemlerine katkıda bulunabilecek proteinleri tanımlamıştır (Niksirat et al., 2014). Ayrıca yapılan çalışmalar kalsiyumun Akrozom reaksiyonu sperm etkileşimi sırasında kritik bir adım

olduğunu belirtmiştir. Bu, spermilerin nüfuz ettiği ve oosit zarı ile kaynaştığı bir işlemdir. Birçok çalışma Ca'nın sperm plazma membranının Ca kanallarından aktığını, akrozomal reaksiyonu ve sperm fertilesini başlatmak için gerekli olduğunu göstermiştir (Santi et al., 2010). Bu işlem sperm-yumurta iletişimi için gerekli olan enzimlerin ve membran modifikasyonlarının salınımı ile ilişkilidir (Zaneveld, et.al., 1991).

#### **4.8.Sperm Hazırlama Yöntemleri**

Sperm yıkama tekniklerinde yıkama yapılırken kullanılan en yaygın iki teknik Swim- up ve Gradient tekniğidir. Swim-up tekniğinde spermier kendi hareketliliği ile semenden ayrılarak yukarı doğru yüzerken, Gradient tekniğinde normal sperm ve anormal spermilerin yoğunluklarının farklı olması nedeniyle ayırıştırma mümkün hale gelir. Çift faz gradient metodunda en yoğun tabaka alt kısma konulur üzerine daha az yoğunluk tabakası konulur daha sonra en üstte semen olacak şekilde konumlandırılır. Semen içerisindeki atıklar ve anormal spermier daha az yoğun tabakaya göç ederler ve birbirinden ayrılırlar. Swim up ve Gradient yıkama sayesinde hareket göstermeyen, immatür, kromatin hasarı olan anormal spermier ortamdan uzaklaştırılır. (Özkavukçu ve Aras, 2017).

**TABLO 1:** Semen Analizi Normal Referans Değerleri (WHO 5.Baskı, 2010)

PARAMETRE	REFERANS DEĞER
VOLÜM	>1,5 ml
PH	7.2-8.0
VİSKOZİTE	<3
KONSANTRASYON	>15x10 <sup>6</sup> /ml
TOTAL KONSANTRASYON	>39x10 <sup>6</sup> /ml
TOTAL MOTİLİTE (Progresif+Nonprogresif)	>%40
PROGRESİF HAREKETLİLİK	%32
MORFOLOJİ	%4 Normal
VİTALİTE	%58
LÖKOSİT	<1

WHO parametrelerine göre sperm analizi terminolojilerinin tanımları ve nedenleri:

1. **Aspermi:** Hiç ejakülat olmaması durumudur. Aspermi nedenleri arasında retrograd ejakülasyon, vasküler nedenler, hormonal nedenler ve ereksiyon bozuklukları bulunmaktadır.
2. **Azospermi:** Ejakulatta sperm yokluğu anlamına gelmektedir. Azospermi yapan nedenler arasında genetik bozukluklar, hormonal değişiklikler, germinal aplazi, bilateral vas deferens yokluğu ve ejakülatör kanallarda tıkanıklıklar sayılabilir.
3. **Hipospermi:** Ejakulatın hacminin 1,5 ml'den az olması durumudur. Hipospermi nedenleri arasında prostat, seminal vezikül ve vas deferensin enfeksiyonu, travma ve tümörlerinin yanı sıra; androjen eksikliği, ejakülatör kanalların tıkanıklıkları ve retrograd ejakülasyon da bulunmaktadır.
4. **Oligozoospermi:** Sperm sayısının 15 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

- a. Hafif Oligozoospermi: Sperm sayısının 5- 15 milyon/ ml' nin arasında olmasıdır.
- b. Şiddetli Oligozoospermi: Sperm sayısının 5 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

Oligozoospermi idiyopatik olabildiği gibi; sistemik enfeksiyonlar, kromozomal bozukluklar, inmemiş testis, ilaçlar, kronik sistemik hastalıklar ve koit sıklığına bağlı olarak da gelişebilir.

5. **Astenozoospermi:** İleri hareketli spermatozoa' nın <%40 olması ya da ileri hızlı hareketli olanların <%32 olması anlamına gelir. Pek çok konjenital nedenle veya enfeksiyon, ilaç, ısı sebebiyle oluşabilir.
6. **Teratozoospermi:** Normal spermatozoa morfolojisinin <%4 olması durumudur. Teratozoospermi yapan nedenler arasında kromozomal bozukluklar, toksik maddeler, seminal kanallarda deformasyon ve epididim enfeksiyonu bulunmaktadır.
7. **Astenoteratozoospermi:** Spermilerin motilite ve morfolojik incelemesinin her ikisinde normal sınırların altında olmasıdır.
8. **Oligoastenoteratozoospermi:** Spermilerin sayı, motilite ve morfolojik incelemesinde üçünün birden normal sınırların altında olmasıdır.
9. **Nekrozoospermi:** Ejekulatta %25' ten fazla ölü sperm hücresi bulunması anlamına gelir. İdiyopatik olabildiği gibi; toksik maddelerle temas, Kartagener Sendromu ve cinsel ilişki sıklığında azalma nedeniyle de oluşabilir.

#### **4.8.1.Semen toplanması (WHO 5.baskı ,2010)**

Semen numunesi laboratuvarın yakınındaki özel bir odada verilmedir. En az 2 en çok 7 günlük cinsel perhiz sonrası semen numunesi alınır. Semen alındığı steriş kabın sıcaklığı 20°C ilâ 37°C arasındaki ortamda tutulur, üzerine örnek veren hastanın ismi, kod numarası, tarih ve saatin yazılı olduğu bir etiket yapıştırılır. Alınan örnek likefiye olması için inkübatöre(37°C) veya çalışılacak laboratuvar masasına bırakılır. Ejekülasyondan sonra 30 dakika veya 1 saat içinde analiz yapılır.

#### 4.8.1.1.Makroskopik inceleme

**Renk:** Likefiye olmuş semen numunesi homojen, gri-opelesan bir görünümündedir. Sperm konsantrasyonu düşük ise rengi düşük opaklıkta olabilir

**Likefaksiyon:** Alınan semenin tümü genellikle 15 dk içerisinde likefiye olur, likefaksiyon sırasında hareketsiz spermatazoalar hareketli hale geçebilir bu nedenle bekleme süresi önem taşımaktadır. 60 dakika içerisinde likefiye olmuyorsa bu durum kaydedilir.

**Viskozite:** Likefaksiyon sonrası sperm pipet yardımıyla aspire edilerek oluşan iplikçik gözlemlenerek semen vizkozitesi belirlenir ve not edilir. Normal sperm pipetten küçük damlalar şeklinde düşmeyip uzun iplikçik halini alarak 2cm'den fazla ise anormal olarak kaydedilir.

**Hacim:** Semen hacmi alt sınırı 1,5 ml'dir.

**pH:** Likefaksiyon sonrası 1 saat içerisinde PH kağıdı kullanılarak ölçülür. Referans değeri 7,2'dir.

#### 4.8.1.2.Mikroskopik inceleme

**Aglütinasyon:** Hareketli spermatozoanın birbirlerine baş-baş, kuyruk kuyruğa veya karışık yapışmasıyla hareketinin kısıtlanması aglütinasyonun tespitini sağlar.

**Motilite:** Likefasyonda sonra 1 saat içerisinde sperm motilite için numune lam lamel arası ya da sayma kamarasına alınarak faz kontrast mikroskopta incelenir. Spermilleri hareketli(progresif), Progresif olmayan hareketli ve hareketsiz olmak üzere değerlendirilir. Toplam hareketlilik için alt sınır %40, ileri hareketli spermiller içinse alt sınır %32'dir(WHO 5.baskı, 2010).

**Sperm Sayısı ve Konsantrasyon:** Ejekülattaki toplam sperm sayısı gebelik için çok önemli bir faktördür (Bonde ve ark., 1998; Larsen ve ark., 2000). Toplam sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu aynı anlamda değildir. Sperm konsantrasyonu, birim semen hacmindeki spermatozoa sayısını ifade edip, spermatozoa sayısı ve onları seyrelten sıvı hacminin bir fonksiyonudur. Toplam sperm sayısı ejakülattaki toplam



spermatozoa sayısını ifade eder ve sperm konsantrasyonunun semen hacmiyle çarpımı sonucu elde edilir. Doğru sonuçlar almak için Neubauer hemositometre kamarası tercih edilir. Horwell veya Makler sayım kamaraları da kullanılabilir. Sperm sayısı için referans alt sınırı 15 milyon/mL'dir. Toplam sperm sayısı için alt referans değeri 39 milyon/mL'dir.

**Morfoloji:** Sperme morfoloji değerlendirilirken sperm başı düzgün, ve oval şeklinde olmalıdır. Baş alanının %40–70'ini kaplayan iyi tanımlanmış bir akrozom bölgesi bulunmalıdır. Orta parça ince, düzenli sınırlı ve yaklaşık sperm başı uzunluğunda olmalı ve orta parçanın ana eksenini sperm başının ana eksenine aynı hizada bulunmalıdır. Ana parça, uzunluğu boyunca aynı genişlikte olmalı, orta parçadan ince ve yaklaşık 45 µm uzunlukta (baş uzunluğunun yaklaşık 10 katı) olmalıdır. Baş, orta ve ana kısımdaki defektler not edilip, yüzdeler hesaplanıp referans değerlerine göre sonuç yazılır. Normal sperm morfolojisi için alt sınır %4 tür.

**Tablo 2:** Dünya Sağlık Örgütü Semen Analizi Referans Değerleri

<b>Dünya sağlık Örgütü 2010 semen analizi</b>	
<b>Parametreler</b>	<b>En düşük referans değer</b>
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (10 <sup>6</sup> )	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 <sup>6</sup> / ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (10 <sup>6</sup> / ml)	<1.0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	>20

## 5.GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1.Çalışmanın Tasarımı

Bu çalışmada sperm yıkama yöntemi olarak “swim-up” (sperm yüzdürme), odorant(progesteron) eklenmesi ve “immünfloresan” (protein tespiti) teknikleri kullanılarak Normospermi ve Oligoastenoteratozoospermi kriterlerine uyan 56 hastada sperm hiperaktivasyonu ve sperm kalsiyum kanalları değerlendirildi.

Çalışma Ocak 2019-Haziran 2019 tarihleri arasında Biruni Üniversite Hastanesi’ne spermiyogram analizi için başvuran hastalarda uygulandı.

Çalışmada önce ‘Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul’una sunuldu ve 2018/13-6 sayı ve 26.02.2018 tarihli etik kurul onayı alındı.

### 5.2.Hasta Seçimi

Çalışmaya dahil olma kriterleri:

Oligoastenoteratozoospermi Grubu için;

Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre yıkama işlemi öncesi sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml az olması, normal morfolojinin %4 den az olması ve ileri hareketli sperm yüzdesinin %32 den az olması

Normospermi Grubu için;

Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre yıkama işlemi öncesi sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml fazla olması, normal morfolojinin %4 den fazla olması ve ileri hareketli sperm yüzdesinin %32 den fazla olması

Her iki grup için;

-Erkeğin yaşının en az 20 en fazla 45 olması

-Endokrinolojik ve/veya metabolik bozukluklar göstermemesi

-En az 3 en fazla 7 gün cinsel perhiz süresi uygulanması

### **5.3.Çalışmada Kullanılan Yöntemler**

#### **5.3.1.Swim-up yöntemi:**

WHO tarafından önerilen prosedüre göre, infertilite için semen analizine tabi tutulan perhiz süresine uymuş 28 normospermik 28 oligoastenoteratozoospermi hasta mastürbasyon yoluyla Biruni Üniversitesi Hastanesi'nde semen vermiştir.

Likefiye olması sağlanan semen örnekleri, sperm hazırlama işlemine alındı. Bazal semen örneğinde işlem öncesi volüm, konsantrasyon, motilite, lökosit parametreleri değerlendirildi. Ardından hematoksilin boyama yapılarak morfoloji değerlendirilmesi yapıldı.

Swim up mediumu DMEM +%3 FBS ile hazırlandı. Semen yapılan mikroskopik incelemesinin ardından swim-up yöntemi ile yıkandı. Swim-up işlemine, 1cc semen örneği falkon konik tüpe konularak başlandı. Üzerine 1/1 oranında sperm yıkama medyumu eklendi. 1600 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pipet yardımıyla atıldı. Tüp spora 45 derece açı ile yerleştirilip, pellet üzerine 1 ml medyum eklendi. Açı bozulmadan 1 saat 37° C'de inkübe edildi. Supernatant'dan bir miktar alınarak, sperm sayı ve motilitesi tekrar incelendi ve kaydedildi. Son olarak, progesteron eklemek için tüpün açısı bozulmadan 100µl supernatant'dan micropipet ile alınarak eppendorf tüpüne aktarıldı.

#### **5.3.2.Odorant Progesteron eklenmesi:**

5 mg Progesteron (katalog no: SİGMA P8783-1G), 50 µl %96 lık DMSO içerisinde çözdürüldü. PBS ile 10ml'ye tamamlandı. Sonuç olarak 5mg/10ml solüsyon elde edildi ve her hastaya 5 µl progesteron aktarılcak şekilde eppendorf tüpleri hazırlandı. Bu konsantrasyon oranı luteal faz evresinde salgılanan progesteron konsantrasyonu ile(20ng/ml) orantılı olarak seçildi. Swim up yapılmış ve supernatant kısmı alınmış 100 µl örnek içerisine 5 µl progesteron eklendi. 45 dakika 37° C'de inkübe edildi. Micropipet ile 10 µl alınarak makler sayım kamarası ile sperm motilitesi ve hiperaktivasyonu incelendi. İncelenen örnekler sonrasında İmmünfloresan yapılmak için -80 C'de donduruldu.



**ŞEKİL 10:** Makler sayım kamerası

### 5.3.3.İmmünfloresan Yöntemi:

Dondurulmuş Semen örnekleri oda ısısında beklettikten sonra aşağıda verilen protokol uygulandı.

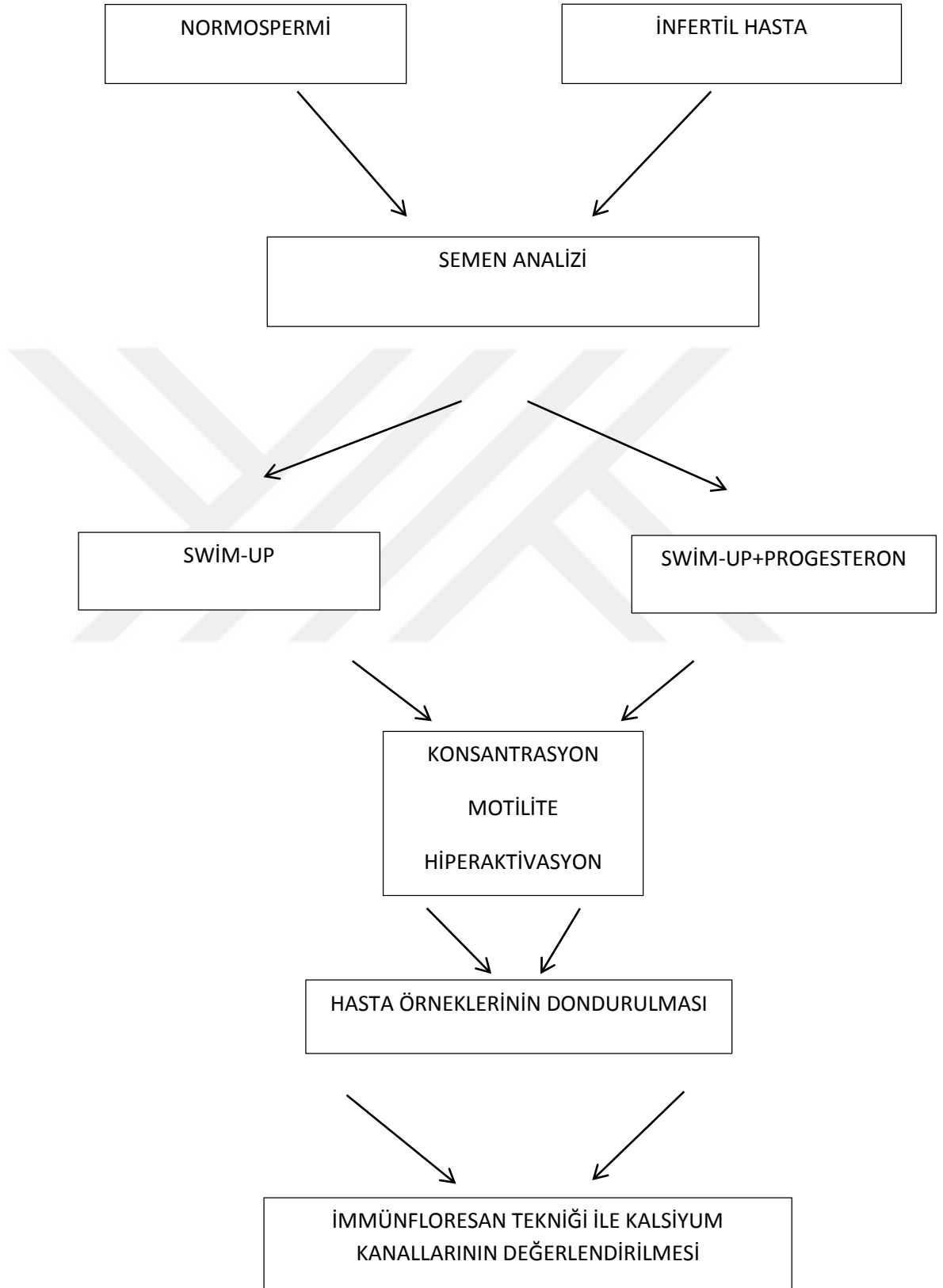
- 1) Alınan semen örneklerine eritme işlemi uygulandıktan sonra ependorfa 150 ul semen örneği ve 37°C de ısıtılmış 150 ul DMEM +%3 FBS eklenerek 1600 rpm'de 8 dk santrifüj edildi.
- 2) Santrifüj devam ederken poly-L-lizini lama pozitif ve negatif droplar belirlenmek üzere PAP-pen ile çizilmiştir
- 3) Preparat kutularına gazlı bezler ıslatılarak uygun nemli ortamı sağlaması için zemine yerleştirildi.
- 4) Lam üzerinde çizilen pozitif (+) ve negatif (-) alanlara pipet yardımıyla damlatılmak üzere PB-Sükroz hazırlanmıştır. Bunun için 20 ml, 0,5 M pH:7 Sodyum Fosfat Buffer içerisinde 22,5 g sükroz çözülüp ddH<sub>2</sub>O ile 500ml'ye tamamlandı ve pipet yardımıyla çizilen alanı aşmayacak şekilde damlatıldı.
- 5) Santrifüjü tamamlanan sperm pelletinden 3 ul alınarak spermin çöktürülmesi için PB-sükroz içerisine bırakıldı ve hafifçe taşmayacak şekilde karıştırıldı.
- 6) Hazırlanan preparatlar 1 gece bekletilmek üzere +4 °C buzdolabına taşındı.

- 7) Ertesi gün preparatlar buzdolabından alınarak 3 defa PBS damlatılarak yıkanır.
- 8) Yıkama sonra %3,5 PFA damlatılarak 15 dk fikse edildi.
- 9) 15 dk sonra preparat 3 defa PBS ile yıkandı ve permeabilize edilmesi için Sigma Triton X 100 damlatılarak 15 dk bekletildi.
- 10) 15 dk sonra yıkama işlemi PBS ile 3 defa tekrarlandı ve Blocking solüsyonu eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- 11) 1 saat sonra yıkama yapılmadan pozitif işaretli çizilen alana 20ul CatSper Primer Antikoru (CatSper $\delta$  Antibody katalog no: Santacruz-393749) eklenerek, negatif çizili alana PBS eklenerek ertesi güne kadar +4°C 'lik buzdolabına konuldu.
- 12) Ertesi gün buzdolabından çıkarılan preparat 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikör olarak 20 ul FITC (Fluorescein (FITC)-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) katalog no:115-095-003) eklenerek 1 saat 37°C etüv de bekletildi.
- 13) 1 saat sonrası PBS ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlanarak Thermo Fisher Hoechst 33342 mediumu ile kapama işlemi yapıp üstüne lamel kapatıldı.
- 14) Kapatılan örnek üzerine immersiyon yağı damlatılarak 100X Floresan mikroskopunda bakıldı ve sonuçlar kaydedildi.

#### **5.3.4.İstatistiksel yöntemler:**

Bu çalışmada Gruplar arasındaki istatistiksel Independent Student T Test kullanılmıştır.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Korelasyon için Pearson Korelasyon kullanılmıştır.

## ÇALIŞMA ŞEMASI

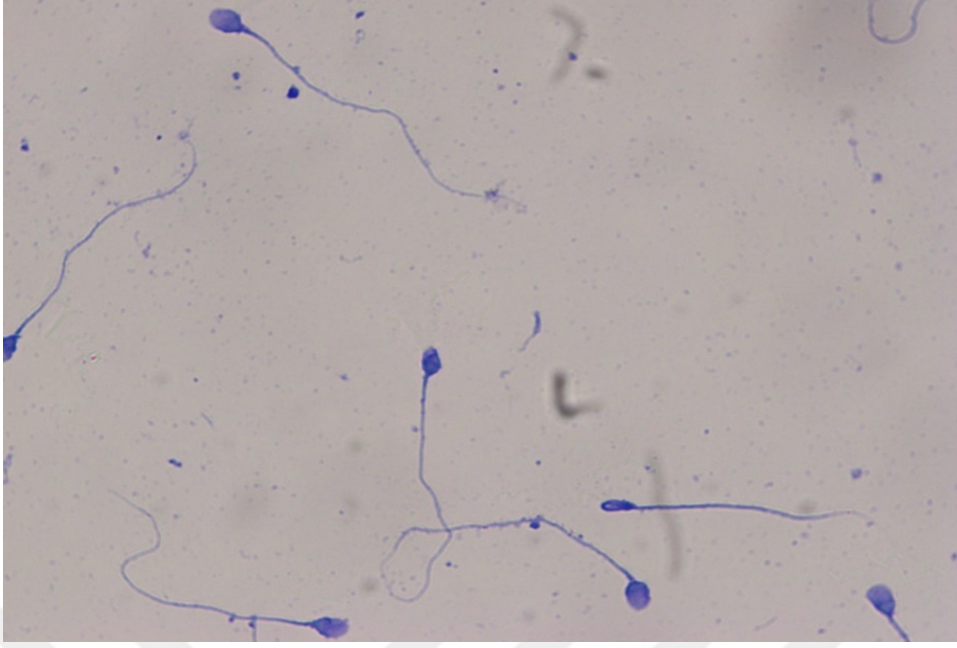


## 6. BULGULAR:

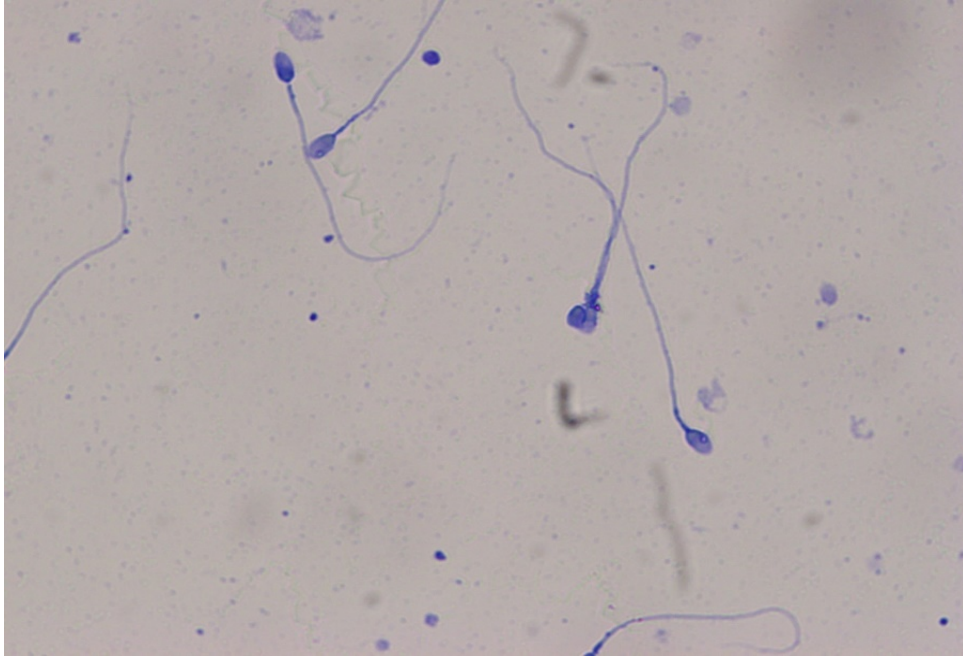
Bu prospektif kontrollü çalışmada, Ocak 2019 ve Haziran 2019 tarihleri arasında 'Biruni Üniversitesi Hastanesi' Üroloji kliniğine başvuran hastalardan çalışma kriterlerine uyan kontrol grubu normospermik (n:28), oligoastenoteratospermi (n:28) tanısı olan toplam 56 hastadan sperm hazırlama yöntemi olan swim-up sonrası ve progesteron uygulanmış spermelerde ki motilite değerlendirilmiş olup sperm kalsiyum kanalı immunfloresan ile değerlendirilmiştir.

56 hastanın yıkama öncesi semen parametreleri, progesteron sonrası progresif motilite ve hiperaktivasyon indeksi hesaplanarak tüm sperm örneklerine swim-up yöntemi ve progesteron ayrı ayrı uygulandı ve tüm hasta gruplarında swim up sonrası progesteron eklenerek 37° C de 45 dakika inkübasyon yapıldı. Swim up sonrası ve progesteron sonrası parametreler değerlendirilerek 2 grup arası farklılıklar karşılaştırıldı. Hasta örnekleri immünfloresan yöntemiyle CatSper antikoru kullanılarak 2 grup arası kalsiyum kanal ekspresyonları değerlendirildi.

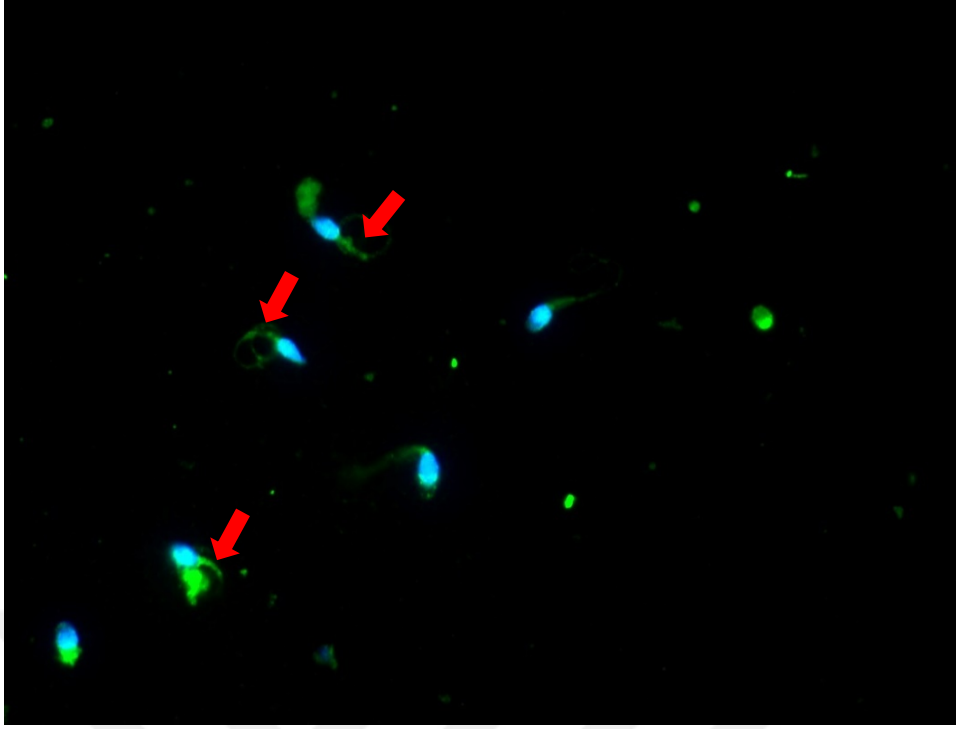




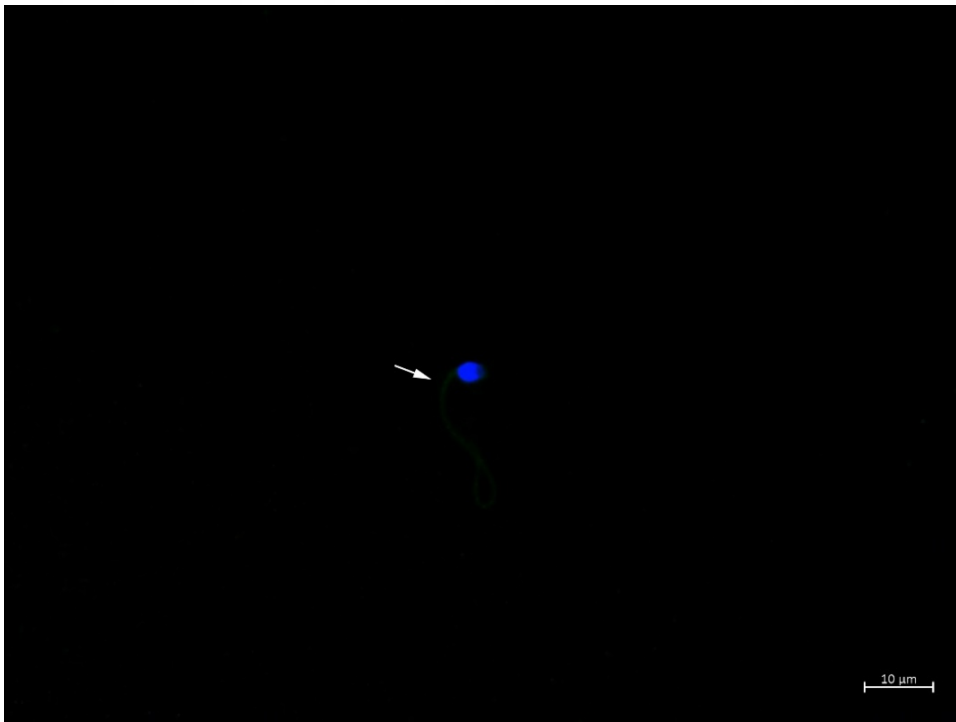
**Şekil 11:** Sperm morfoloji değerlendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)



**Şekil 12:** Sperm morfoloji değerlendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)



**Şekil 13:** Sperm de bulunan pozitif CatSper ekspresyonu (100X floresan mikroskobu görüntüsü, kırmızı oklar pozitif CatSper ekspresyonunu simgeler, Bar: 10  $\mu$ m)



**Şekil 14:** Sperm de bulunan negatif CatSper ekspresyonu (100X floresan mikroskobu görüntüsü, beyaz ok negatif CatSper ekspresyonunu simgeler, Bar: 10  $\mu$ m)

P değeri Yorumu

$p < 0.05$  İstatistiksel anlamlılık \*

$p < 0.01$  Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık \*\*

$p < 0.001$  Çok yüksek istatistiksel anlamlılık \*\*\*

$0.05 \leq p < 0.10$  Anlamlılık eğilimi (sınırdan anlamlılık)

$p > 0.10$  Fark tesadüften ileri gelmiştir (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır)

**Tablo 3:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması

	<b>Normospermi (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>OAT (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
Konsantrasyon (1 cc) %	97,0741 $\pm$ 53,6053	10,250 $\pm$ 3,1578	8,558	<0,001

Tablo 3'te konsantrasyon açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). WHO 2010 kriterleri esas alınarak normospermik örneklerde konsantrasyon 15 milyon/ml'nin üzerinde görülürken, oligoastenoteratospermik örneklerde konsantrasyon değeri 15 milyon/ml'nin altında görülmektedir.

**Tablo 4:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi motilite değerlerinin karşılaştırılması.

<b>Motilite%</b>	<b>Normospermi (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>OAT (<math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
İleri hareketli	44,0741 $\pm$ 10,6117	23,7143 $\pm$ 5,3253	9,042	<0,001
Yerinde hareketli	18,2593 $\pm$ 6,7230	19,8571 $\pm$ 8,2807	0,784	0,437
Hareketsiz	37,0370 $\pm$ 13,0162	56,4286 $\pm$ 9,6587	-6,290	<0,001

Tablo 4'te ileri hareket ve hareketsiz değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Yerinde hareketli motilite

yüzdesi değişkeni açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. WHO 2010 kriterlerine göre beklenildiği gibi 1.grup normospermik örneklerde beklenildiği gibi %32 in üzerinde ileri hareket görülürken, oligoastenoteratospermik örneklerde ileri hareket değeri %32'in altında görülmektedir.

**Tablo 5:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi morfoloji değerlerinin karşılaştırılması

Morfoloji %	Normospermi ( $\bar{x}\pm SD$ )	OAT ( $\bar{x}\pm SD$ )	t	p
Normal	4,66 $\pm$ 1,00	2,10 $\pm$ 0,7859	10,575	<0,001
Baş	53,29 $\pm$ 9,510	53,53 $\pm$ 12,08	-0,081	0,935
Orta kısım	24,814 $\pm$ 7,6963	24,8571 $\pm$ 10,006	-0,018	0,986
Kuyruk	17,259 $\pm$ 6,048	19,50 $\pm$ 7,099	-1,258	0,214

Tablo 5'te normal değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Baş, orta kısım ve kuyruk morfoloji değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,10$ ). WHO 2010 kriterlerine göre beklenildiği gibi 1.grup normospermik örneklerde beklenildiği gibi %4'ün üzerinde normal morfolojiye sahip sperm değeri görülürken, OAT hasta örneklerinde %4'ün altında görülmektedir.

**Tablo 6:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında CatSper+ değerlerinin karşılaştırılması.

	Normospermi ( $\bar{x}\pm SD$ )	Oligoastenoteratospermi ( $\bar{x}\pm SD$ )	t	p
CatSper + %	66,481 $\pm$ 18,612	13,357 $\pm$ 4,407	14,687	<0,001

Tablo 6'da normospermi ve OAT hastalarda CatSper değişkeni açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Beklenildiği gibi normospermi hastalarda CatSper ekspresyonu OAT hastalara oranla daha fazla olduğu görülmektedir.

**Tablo 7:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında progresif motilite değerlerinin karşılaştırılması.

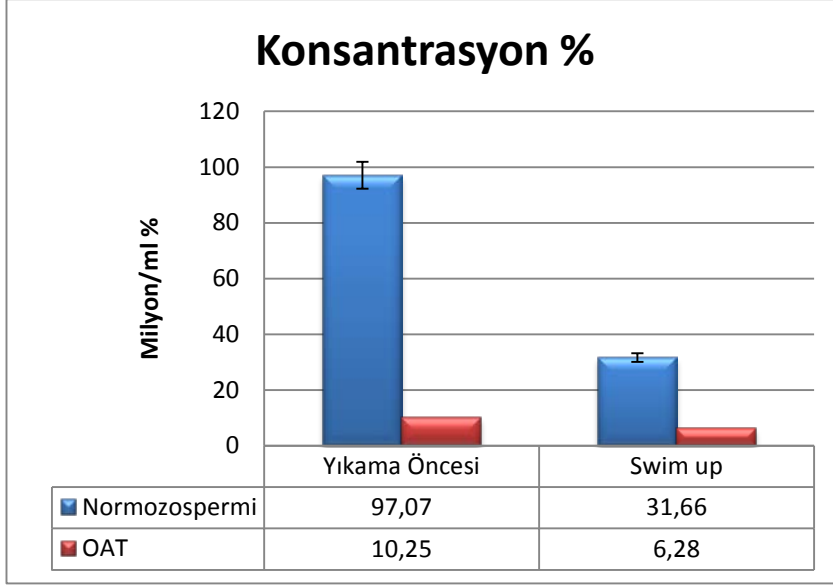
<b>Progresif Motilite %</b>	<b>Normospermi (x±SD)</b>	<b>Oligoastenoteratospermi (x±SD)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
Yıkama öncesi	44,07±10,61	23,71±5,325	9,042	<0,001
Swim-up	81,92±10,38	67,64±14,61	4,163	<0,001
Progesteron	93,74±7,320	89,75±11,46	1,532	<0,001
Hiperaktivasyon	84,48±9,337	68,71±13,928	4,913	<0,001

Tablo 7’de yıkama öncesi, swim-up ve progesteron yöntemi sonrası progresif motilite değerleri değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur(p<0,001). Swim up yöntemine kıyasla progesteron eklenmiş hasta örneklerinde her iki grupta da daha yüksek progresif motilite değeri elde edilmiştir. Normospermi hastalar OAT hastalara göre daha fazla hiperaktivasyon göstermiştir

**Tablo 8:** Catsper+ ve Hiperaktivasyon korelasyon değerleri

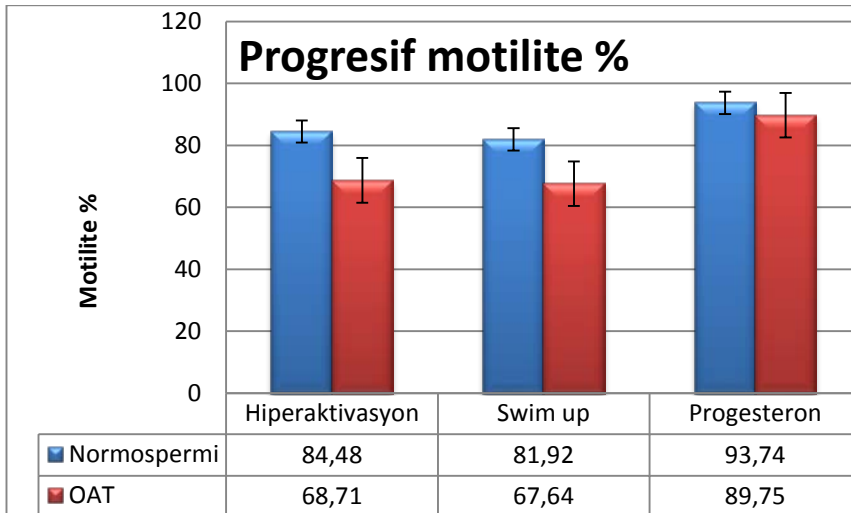
		<b>Hiperaktivasyon</b>	<b>Catsper+</b>
Hiperaktivasyon	Pearson Correlation	1	0,518
	Sig. (2-tailed)		<0,001
	N	55	55
CatSper +	Pearson Correlation	0,518	1
	Sig. (2-tailed)	<0,001	
	N	55	55

Tablo 8’de hastalarda ki Catsper+ ve Hiperaktivasyon ilişkisinde yüksek anlamlı farklılık bulunmaktadır(p<0.001). Hiperaktivasyon artışı ile birlikte CatSper+ ekspresyonu artış göstermiştir.



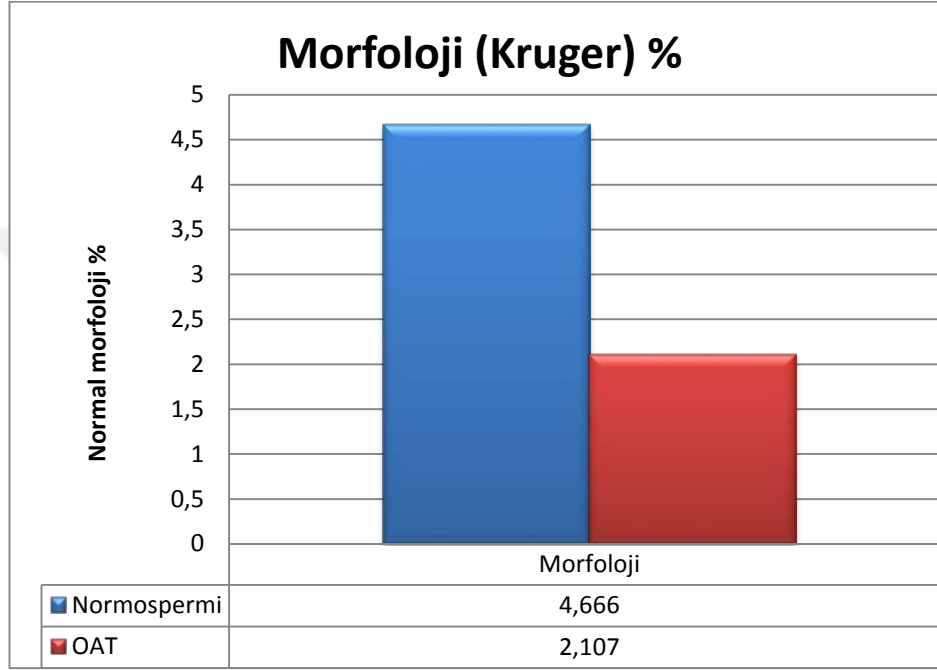
**Grafik 1:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması

Grafik 1’de Normospermi ve OAT hasta grupları arasında yıkama öncesi konsantrasyon açısından beklenildiği gibi anlamlı bir fark görülmektedir. Her iki grupta da swim up sonrası konsantrasyon değerleri düşmüştür. OAT ve normospermi hasta grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde swim up sonrası konsantrasyon OAT hastalarda daha düşüktür ( $p < 0,001$ ).



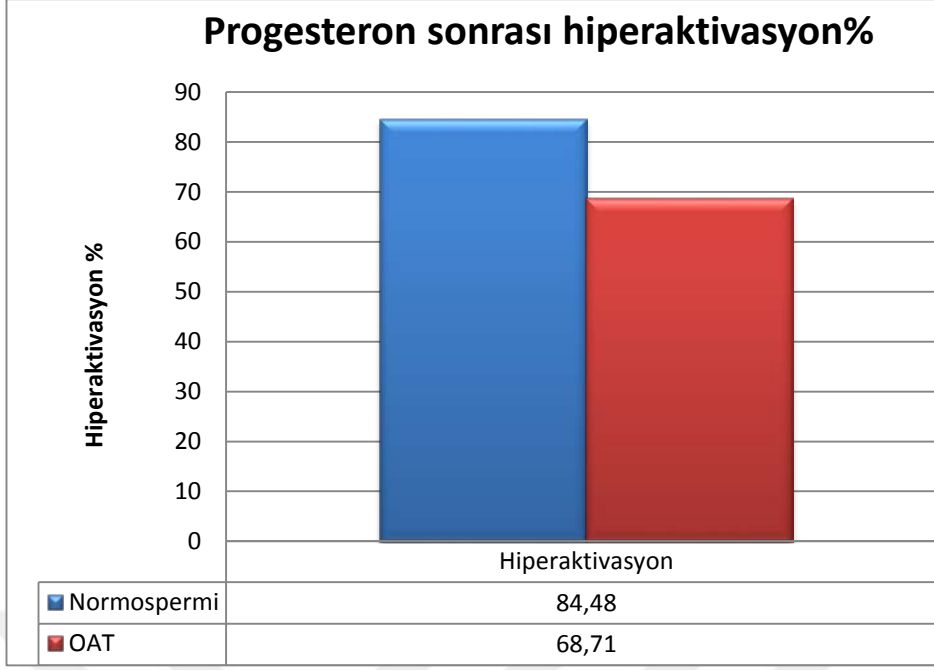
**Grafik 2:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında progresif motilite değerlerinin karşılaştırılması

Grafik 2’de Progesteron sonrası Normospermi hastalarda görülen progresif motilite swim up yıkama sonrasına oranla artış göstermiştir. Normospermi hastalarda görülen hiperaktivasyon OAT hastalara oranla daha fazladır. ( $p<0,001$ ). Hastalar kendi içlerinde değerlendirildiğinde Progesteron sonrası progresif motilite swim up a oranla ciddi anlamda artmıştır.



**Grafik 3:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi morfoloji değerlerinin karşılaştırılması

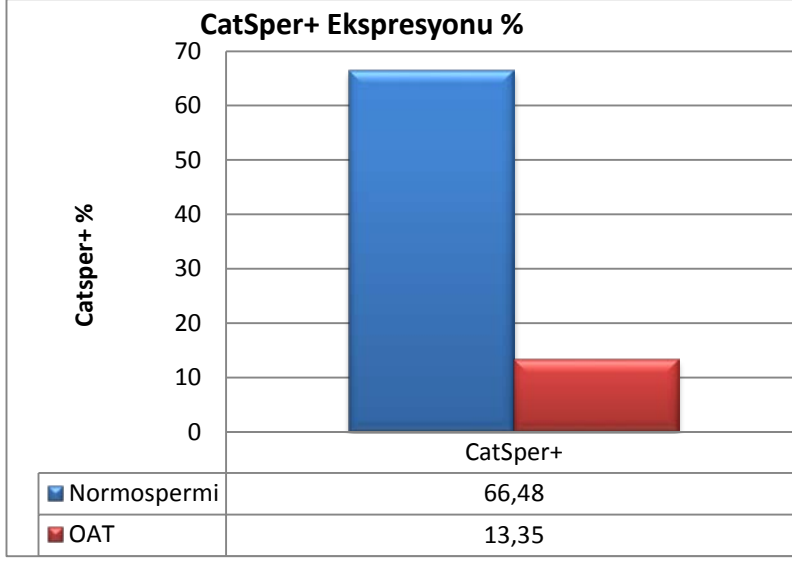
Normospermi ve oligoastenoteratospermi grupları arasında yıkama öncesi morfoloji açısından anlamlı bir fark görülmektedir ( $p<0,001$ ).



**Grafik 4:** Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında hiperaktivasyon değerlerinin karşılaştırılması

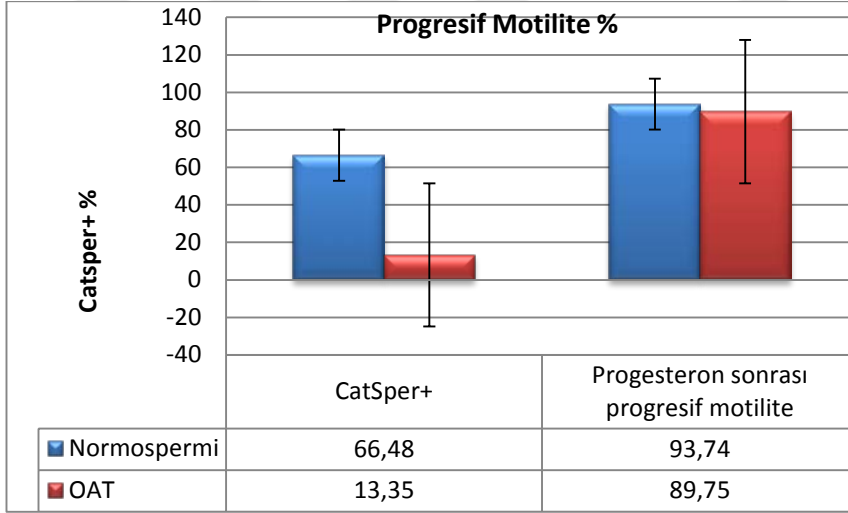
Progesteron sonrası hiperaktivasyon değerlerinde farklılıklar mevcuttur. Yıkama öncesi, swim up ve progesteron sonrası hiperaktivasyon değerlendirildiğinde progesteron uygulanmış mediumda yüksek bir artış gözlemlenmiştir. Normospermi ve OAT hasta grupları arasında hiperaktivasyon yüzdelerinde ciddi farklılıklar vardır. Normospermi hasta grupları daha fazla hiperaktivasyon göstermiştir.





**Grafik 5:** Normospermi OAT hastalarda ki CatSper+ protein ekspresyonu

İmmünfloresan sonrası kalsiyum kanallarındaki artış normospermik grupta daha fazla gözlemlenirken OAT hasta grubunda daha azdır. Progesteronla uyarılmış kalsiyum kanalları 45dk sonrası sperm motilitesiyle korelasyon göstermiştir



**Grafik 6:** Progesteron sonrası Progresif motilite ile CatSper+ ilişkisi

Grafik 6'da Progresif motilite ve Hiperaktivasyon arasında ciddi anlamlılık vardır ( $p < 0.001$ ). Hiperaktivasyon gösteren hastalar CatSper+ ekspresyonunda artış göstermiştir.

## 7. TARTIŞMA:

Son zamanlarda, CatSper ailesinin klonlanması ve karakterizasyonu, erkek üreme ve kısırlık çalışmalarında önemli bir konudur. Bu ailenin dört üyesinin sadece testiste ifade edildiği ve spermde farklı şekilde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Sperm hareketinde ve erkek fertilitesinde önemli rol oynamaktadırlar. Spermdeki birkaç aday kalsiyum kanalı arasında, şimdiye kadar erkek fertilitesi için yalnızca CatSper1 ve CatSper2 gerekli olduğu tespit edildi. Kısıtlı ekspresyon paternlerine ve sperm fonksiyonlarındaki hayati rollerine dayanarak, CatSper ailesi üyelerinin erkek kısırlık taraması için potansiyel hedefler ve doğum kontrolü için ideal hedefler olduğu tahmin edilmektedir (Nikpoor, et al., 2004). Morton ve arkadaşları azalmış seminal Ca konsantrasyonlarının, epididimdeki azalmış insan sperm hareketliliği ile pozitif ilişkili olduğunu göstermiştir. Spermde ki hücre içi Ca seviyesinin düşmesinin, erkek yaşından bağımsız olarak artan sperm motilitesi riskleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bildirmiştir (Morton, et al., 1978).

Ca<sup>2+</sup>, hiperaktivasyonlu hareketliliği tetikleyen birincil ikinci habercidir. Spermin Ca<sup>2+</sup> iyonofor A23187 veya iyonominin ile işlenmesi hiperaktivasyona neden olur (Suarez, et al., 1987). Suarez ve ark. yaptığı çalışmada; Floresan Ca<sup>2+</sup> göstergesi indo-1 kullanılarak, hiperaktivize edilmiş hamster sperminin flagella'sında sitoplazmik Ca<sup>2+</sup> seviyeleri ölçülmüş ve aktif spermde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Suarez, et al., 1993). Diğer floresan Ca<sup>2+</sup> göstergeleri, hiperaktivasyonun uyarılması sırasında hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışlarını da saptamıştır (Ho ve Suarez, 2001; Xia. et al., 2007). Yapılan çalışmalarda CatSper-1, -2, -3 veya -4 mutanti olan erkek farelerin, kısır olduğu ve bu kısırlık, hiperaktivasyon başarısızlığı ile ilişkilendirilmiştir. Catsper mutantına sahip spermde anormal kamçı hareketi görülmektedir. Bu, spermin normal aktif hareketliliği desteklemek için gereken düşük Ca<sup>2+</sup> seviyelerini bile koruyamadığını ve bu açığın da kısırlığa katkıda bulunabileceğini gösterir. Li ve arkadaşları yüksek sperm hareketliliğine sahip erkeklerde ki transkript Catsper genlerinin düşük motilite gösteren spermlere oranla daha fazla olduğunu göstermiştir. 3 homozigot hastayla yaptığı çalışma sayesinde CatSper 2 exonunda mutasyona sahip olan düşük motilite gösteren hastanın, normal motilide gösteren hastadan daha az catsper ekspresyonuna sahip olduğunu bulmuştur (Li, et al., 2007). Xia ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; sperm de orta parça boyunca

Ca<sup>2+</sup> + yayılımının, NADH floresansında Ca<sup>2+</sup>'ya bağılı bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, ana parçadaki CATSPER kanallarından geçen bir Ca<sup>2+</sup> + akışı sadece hiperaktivasyonlu hareketliliği başlatamaz, aynı zamanda [NADH] 'de bir artışa neden olan ve ATP homeostazisini düzenleyen kuyruktan başa Ca<sup>2+</sup> + yayılımını tetikleyebilir (Xia, et al. ,2007). Yao ve arkadaşları foliküler sıvısının sperm kamçı hareketine ve hiperaktivasyonuna doza bağılı etkisi olduğu üzerine çalışmalar yapmıştır (Yao, et al., 2000). Oositte ki kümülüs hücreleri, hiperaktivasyon için sinyal salgılayabilir. Kümülüs oophorus hücrelerinin süpernatanı, insan sperminin başlarının kavisli hızını ve yan yana hareketini arttırmıştır (Fetterolf, et al., 1994).

Bu çalışmada CatSperin spermatozoadaki varlıkları incelenmiştir. CatSper swim up sonrası progesteron uygulanmış spermde orta parçada saptanmıştır. (Li, et al., 2006). Ancak bu çalışmada, swim up yıkama sonrası CatSper yalnızca bazı numunelerde tespit edilmiştir. Spermin yıkanmasının, transkripsiyon seviyesini RNA bozunması ve / veya yuvarlak hücreleri ve sitoplazmik damlacıkları uzaklaştırması yoluyla düşürmesi mümkündür. Normospermik ve oligoastenoteratospermik hasta numunesinden izole edilen yüksek ve düşük hareketli spermelerde CatSper seviyelerini karşılaştırdık. Neredeyse tüm semen numunelerinde, yüksek hareketli fraksiyonlarda düşük hareketli fraksiyonlardan daha yüksek normalize CatSper gözlenmiştir. Tutarsızlıklar, düşük motilitenin, sperm motilitesinde ve diğer fonksiyonlarda yer alan molekülleri kodlayan bazı genlerin kusurlu transkripsiyonunun sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Bu genlerin biri veya bir kısmı, düşük hareketli bazı spermelerde kusurlu bir şekilde kopyalanmış olabilir ve farklı spermelerde, kusurlu bir şekilde transkripsiyon yapılmış genler olabilir. Düşük hareketli kısım, farklı genlerin kusurlu bir şekilde kopyalandığı, heterojen altkümelerden oluşabilir.

Quill ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CatSper 2 mutantına sahip sperm hücreleri, hiperaktivasyonlu bir hareketliliğin elde edilememesi, spermatozoanın yumurtanın hücre dışı matrisinin delinmesi için gereken "gücü" üretememesini mümkün kılan bir başarısızlık olduğunu belirtmiştir. Yüksek viskoziteli bir ortamda, CatSper2 mutasyonlu spermatozoa ileri yüzebilme yeteneğini kaybetmiştir, oysa normal spermatozalar ilerlemeye devam etmiştir (Quill, et al., 2003). Bu çalışmada motilitesi yüksek olan progesteronla etkilenmiş sperm hücrelerinde CatSper değeri yüksekken düşük hiperaktivasyon gösteren sperm hücrelerinde bu değer düşüktür. Bu bulgular, oligoastenoteratozoospermik erkek spermatozoanın fizyolojik bir uyarana

cevaben akrozom reaksiyonunu başlatma kabiliyetinde fonksiyonel bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Spermatozoanın fizyolojiksel rolünün kendi genetik materyalini bir yumurta hücresine aktarması olduğunu biliyoruz. Spermeler yumurtaya ulaşmaya çalışırken bir takım yollar ile yüzüş şeklini değiştirmektedir. Bu süreçte potansiyel rehberlik mekanizmasına etki eden birtakım kimyasal sensörlerin etkisi ön planda olup koku reseptörlerinin de yardımı belirlenmiştir. Spermdeki koku reseptörlerini anlamak için bakmak gereken iki çalışma vardır. Bunlardan biri insandaki koku reseptör ekspresyonu diğeri ise fare spermatozoasına bakmak olacaktır. Spermde bulunan bazı koku reseptör kümeleri (G proteins, G protein reseptör kinaz 3, Betha arrestin gibi) göz önüne alındığında, bu cascade proteinleri koku reseptörünü hücre içindeki kalsiyum kanallarıyla ilişkilendirip flagella hareketinde önemli değişiklikler kazanmasını sağlamaktadır. Bu hiperaktivasyonlu hareketliliğin yönlendirilmesinde Catsper sorumludur ve mutasyon durumu oldukça aktif hareketlilik formunun yokluğunda döllenme mümkün değildir. Öte yandan, yüksek ve düşük hareketli spermatozoalar arasındaki tutarsızlıklar aynı zamanda, CatSperin sperm hareketliliğinin kazanılmasıyla ilgilenebileceğini göstermektedir. İleri yüzme kabiliyetinin kaybı ve CatSper mutantlı spermin hiperaktivasyonunun başarısızlığı, CatSperin sperm ileri hızlarından sorumlu olduğunu ve hiperaktivize edilmiş bir hareketlilik formunun oluşması için gerekli olduğunu doğrulamıştır.

Hiperaktivasyon kemotaktik faktörler tarafından modüle edilebilir. Kemotaksis, bazı deniz omurgasızlarının spermelerinde iyi belgelenmiştir. Deniz kestanesi oositleri tarafından salgılanan çok düşük spesifik peptid konsantrasyonları spermeleri çeker. Kısaca, peptidin sperme bağlanması, hücre içi siklik nükleotit seviyelerini artırır, ardından hücre içi  $Ca^{2+}$ , flagellar büküm asimetrisini ve yüzme yolu eğrisini artırır (Kaupp, et al., 2008). Memelilerde deniz kestanesi oositleri gibi peptid ligandları tespit edilmemiştir, ancak koku benzeri moleküllerin memeli spermine kemoatraktanlar olarak işlev gördüğüne dair kanıtlar vardır. Koku reseptörlerinin korunmuş amino asit dizilerine karşı antikolarlar, özellikle olgun köpek ve fare sperminin flagellar orta kısmını, ayrıca olgun sıçan sperminin flagellum tabanını etiketlemiştir (Vanderhaeghen, et al., 1993; Walensky et al., 1995). Bu antikoların bazıları ayrıca hamster ve insan sperminin protein ekstraktlarında koku alıcı reseptörleri tespit etmiştir (Walensky, et al., 1995).

İnsan spermleri, çiçek kokusu burjonale  $Ca^{2+}$  + sinyalleri üreterek ve kokunun gradyanına yönelterek tepki verir (Spehr, et al., 2003, 2004). Bu nedenle, burjonale benzeyen bir molekülün insan spermini in vivo oosit içerisine yönlendirdiği düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada insan sperminin progesteronada bu şekilde tepki verdiği gözlemlenmiştir. İnsan sperminin,  $Ca^{2+}$ 'da artışla progesteron gradyanlarına yanıt verdiği de gözlemlenmiştir. Yanıt veren spermin flagelası, kalsiyum kanallarındaki artışla sperm kuyruk hareketindeki değişiklik bize hiperaktivasyonu göstermiştir. De Jonge, yoğunlaşmış spermatozoanın progesterona maruz kalmasının, hücre dışından hücre içi boşluğa  $Ca^{2+}$  akışına ve sperm akrozom reaksiyonunun başlamasına neden olduğunu bildirmiştir (De Jonge, 1999). İnsan sperminde P etki mekanizması hala tartışılmaktadır. Progesteron bağlanma bölgeleri, sperm yüzeyinde bulunur (Chang, et al., 1981), ancak klasik nükleer P reseptörlerinden farklı gibi görünmektedir (Baldi, et al., 1991). Öte yandan, insan spermindeki P-uyarılmış  $[Ca^{2+}]_i$  artışına, yakın zamanda BSA-konjüge P (Meizel and Turner, 1991) kullanılarak gösterildiği gibi sperm yüzeyi ile etkileşime aracılık eder ve EGTA varlığında tamamen ortadan kaldırılır (Thomas and Meizel, 1989). Birlikte ele alındığında, bu veriler, reseptörle çalışan bir  $Ca^{2+}$  kanalının P'si ile aktivasyonu veya alternatif olarak  $Ca^{2+}$  iyonlarına geçirgenliğin P-aracılı geçirgenliğini arttırdığını gösterir. Kümüllüs hücreleri progesteron salgıladığından dolayı, yumurtalıktaki kümülüs kütlesi civarında bir gradyan gelişebilir. Koku oluşturuucu burjonalin cevabında tespit edilen  $Ca^{2+}$  yükselmesi, insan sperminin orta kısmında ortaya çıkar (Spehr, et al., 2004). Bu anlamda çalışmamızda, Burjonal gibi kemoatraktan olarak hareket eden Progesteronu kullanarak 2 hasta grubunda da Hiperaktivasyon ve CatSper ekspresyonuna bağlı anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda sperm CatSper ekspresyonu çoğunlukla sperm flagellasında iken çalışma sonucumuzda sperm orta kısımda (mid-piece) bölgesinde CatSper ekspresyonu gözlemlenmiştir. Çeşitli türlerde yapılan çok sayıda araştırma, hiperaktivasyonlu hareketliliğin in vivo dölleme için kritik olduğunu göstermiştir, çünkü spermin oositin mukus dolgulu lümeninden oosite ulaşmasına yardımcı olur ve spermin zona pellusidaya nüfuz etmesini sağlar. Bu nedenle, in vitro fertilizasyon da dahil insan sperminin fizyolojik uyaranlara cevap olarak hiperaktivasyon kabiliyetini ölçmek, infertilite için yapılan testlere yararlı bir tahlil olabilir.

## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER:

Bu çalışmanın spesifik amacı, odorant olarak kullandığımız progesteronun insan sperm hiperaktivasyonu ve CatSper kanalları üzerindeki etkilerini belirlemektir. Eğer P in vivo, sperm dölleme kabiliyetinin doğal bir aracı ise, o zaman uygun bir zamanda ve uygun sperm tepkilerini uyarmak için yeterli miktarlarda yumurtalıkta bulunmalıdır. Oligoastenoteratozoospermi deneklerden gelen spermlerde azalmış duyarlılık, sperm yüzeyindeki P-bağlama bölgelerinin azalması  $Ca^{2+}$  iyonlarına indirgenmiş geçirgenlikten kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte, bazal  $[Ca^{2+}]_i$ , sperm plazma membranının  $Ca^{2+}$  ile benzer geçirgenliğini gösteren iki grupta benzerdi. Son zamanlarda, yüksek konsantrasyonda foliküler sıvıda ve kümülüs matrisinde mevcut olan progesteronun, insanla kaplanmış spermatozoada akrozom reaksiyonunun başlatılması için olası bir fizyolojik uyarıcı olduğu gösterilmiştir (Osman ve diğerleri, 1989). Gerçekten de, P insan foliküler sıvısında bulunanlara benzer konsantrasyonlarda insan sperminde kalsiyum (Thomas ve Meizel, 1989; Blackmore ve diğerleri, 1990; Baldi ve diğerleri, 1991) motilite artışına neden olur (Thomas ve Meizel, 1989). Şimdi hem normospermik hastalarla karşılaştırıldığında oligoastenoteratozoospermi hastalardan alınan spermatozoada ölçülen P'ye karşı duyarlılığın azaldığını bildirmekteyiz. Dahası, P'ye cevaben hücre içi  $Ca^{2+}$ 'nin artışı, sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve sperm morfolojisi ile anlamlı şekilde korele idi. Bu bulgular, oligoastenoteratozoospermi erkek spermatozoanın fizyolojik bir uyarana cevaben akrozom reaksiyonunu başlatma kabiliyetinde fonksiyonel bir değişiklik olduğunu göstermektedir.

Şaşırtıcı bir şekilde, elimizde OAT hasta spermatozoası, P ile uyarıldığında progresif motilite de bir artış gösterdi. Progesterona verilen duyarlılığın azalması, spermatozoanın OAT hastalardan gelen sitoplazmik volüm karakteristiğindeki artmış özelliği ile açıklanamaz, çünkü P eylemi daha sonra tartışıldığı gibi sperm yüzeyiyle etkileşime bağlı olduğundan sitoplazmayı içermez. Gerçekten de, P'ye verilen azalmanın, spermatozoanın, azalan dölleme kapasitesi ile ilişkili olabilecek etkili bir biyokimyasal değişim olduğuna inanıyoruz, ileriki zamanlarda yapılacak çalışmalar, progesterona cevap verme ile dölleme kapasitesi arasındaki ilişki tanımlayıp infertiliteye katkı sağlayabilir. Alternatif olarak, sperm odorant reseptörleri genel olarak bütün spermler için yumurtaya doğru kemotaksi kazandırabilir veya daha

spesifik olarak yalnızca yumurta kokusuna uyan belirli odorant reseptörüne sahip olan spermleri çekebilir. İleriki zamanlarda Progesteron yerine Burjonal gibi kemoatraktan odorantlar kullanılarak yapılacak çalışmalar sperm hareketliliği ve kalsiyum kanallarıyla ilişkisi hakkında çalışmamıza destek sağlayabilir.

İnsanlar da CatSper kanal mutasyonları infertilite ile ilişkilendirilmiştir. Buna sahip spermler de yumurtaya yapışır fakat hiperaktive motilite eksikliğinden dolayı oosite penetre olmazlar. Kalsiyumun progesterona karşı tepkisi, açıklanamayan kısırlığı olan hastaların spermlerinde azalmakta, bu da kalsiyum akısından sorumlu genomik olmayan sperm zarı progesteron reseptöründe fonksiyonel bir kusur olduğunu göstermektedir. Hücreleri progesteron ortamında inkübe ederek CatSper'in P ile genetik olmayan bir şekilde aktive edildiğini gösterdik. Normozospermi hastalarda CatSper yüzdesi OAT hastalara oranla daha az görülmüştür. Bu aktivasyon iki senaryo altında gerçekleşebilir: P ya doğrudan CatSper'e bağlanır ya da sperm plazma zarı içinde lipit sinyalini başlatan ve sonuçta CatSper aktivasyonuna yol açan ayrı bir hedefe bağlanır. Bu nedenle, in vitro fertilizasyon da dahil insan sperminin fizyolojik uyarılara cevap olarak hiperaktivasyon kabiliyetini ölçmek, infertilite için yapılan testlere yararlı bir tahlil olabilir. İnsan sperminin progesteron eklenmiş ortamda inkübe edilmesi, genellikle hiperaktivasyon insidansında kademeli bir artışa yol açmıştır. İnsan sperminde hızlı ve daha önemli bir tepki üretmek için kullanılacak model türlerinde hiperaktivasyon için spesifik fizyolojik tetikleyiciler bulunmuşsa, bu, bir numunenin doğurganlık seviyesinin daha yüksek çözünürlüğünü sağlayacak bir doğurganlık analizinin geliştirilmesini mümkün kılacaktır. Sonuç olarak, yaptığımız çalışma da kemoatraktan olarak uyguladığımız Progesteron, kalsiyum kanalına etki ederek progresif motiliteyi arttırmış ve hastalarda ki kalsiyum kanalını etkileyerek hiperaktivasyon sağlamıştır. Progesteron ile uyarılan spermlerin göstermiş olduğu hiperaktivasyon ve CatSper ekspresyonu, dölleme için kritiktir ve insan sperm numunelerinin normalde hiperaktivasyona maruz kalma yeteneğini değerlendirmek için güvenilir testlere ihtiyaç vardır. Çalışmamız bu alanda yapılacak çalışmalara destek sağlamaktadır.

## 9. KAYNAKÇA

Banjoko SO, Adeseolu FO. Seminal Plasma pH, Inorganic Phosphate, Total and Ionized Ca Concentrations In The Assessment of Human Spermatozoa Function. *J Clin Diagn Res.* 2013; 7(11): 2483-2486.

Basseye IE, Essien OE, Udoh AE, Imo IU, Effiong IO. Seminal plasma, selenium, magnesium and zinc levels in infertile men. *J Med Sci.* 2013; 13: 483-487.

Bonde JP et al. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 352:1172-1177.

Bouin, P., & Ancel, P. (1903). Recherches sur les cellules interstitielles du testicule des mammiferes. *Arch de Zool Exp Gen*, 1, 437-523.

Carlson, A. E., Quill, T. A., Westenbroek, R. E., Schuh, S. M., Hille, B., & Babcock, D. F. (2005). Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32238-32244.

Clancy J, McVicar AJ (2009) *Physiology and Anatomy for Nurses and Healthcare Practitioners. A Homeostatic Approach.* Third edition. Hodder Arnold, London.

Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, 112(1), 35-51.

Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C. L., Felix, R., & Beltrán, C. (2005). Calcium channels and Ca<sup>2+</sup> fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol*, 243, 79-172.

DE JONGE, C. H. R. I. S. T. O. P. H. E. R. (1999). Attributes of fertile spermatozoa: an update. *Journal of andrology*, 20(4), 463-473.

Eisenbach M. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod.* 1999; 4(1): 56-66.

Farley A, McLafferty E, Hendry C (2011) *The Physiological Effects of Ageing. Implications for Nursing Practice.* Wiley-Blackwell, Chichester.

Fawcett, D. W. (1979). The cell biology of gametogenesis in the male. *Perspectives in biology and medicine*, 22(2), S56-S73.



Fetterolf, P. M., Jurisicova, A., Tyson, J. E., & Casper, R. F. (1994). Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biology of reproduction*, 51(2), 184-192.

Gartner P. L., Hiatt L.J., Çeviri Ed.Canan Hürdağ, Hücre Biyolojisi ve Histolojisi, 7.Baskı, İstanbul Tıp Kitabevi,2016

Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International journal of molecular medicine*, 38(4), 979–986. doi:10.3892/ijmm.2016.2723

Geybels MS, McCloskey KD, Mills IG, Stanford JL. Ca Channel Blocker Use and Risk of Prostate Cancer by TMPRSS2:ERG Gene Fusion Status. *Prostate*. 2017; 77(3): 282-290.

Giroux-Widemann V, Jouannet P, Pignot-Paintrand I, Feneux D. Effects of pH on the reactivation of human spermatozoa demembrated with Triton X-100. *Mol Reprod Dev*. 1991; 29(2): 157-162.

Golpour A, Pšenička M, Niksirat H. Subcellular distribution of Ca during spermatogenesis of zebrafish, *Danio rerio*. *J Morphol*. 2017; 278(8): 1149-1159.

Ho, H. C., & Suarez, S. S. (2001). An inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca<sup>2+</sup> store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biology of reproduction*, 65(5), 1606-1615.

Jin, J., Jin, N., Zheng, H., Ro, S., Tafolla, D., Sanders, K. M., & Yan, W. (2007). *Catsper3* and *Catsper4* are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biology of reproduction*, 77(1), 37-44.

Kaupp, U. B., Kashikar, N. D., & Weyand, I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 93-117.

Kierszenbaum A. L, (2006), 'Bölüm 20:Spermatogenez', 'Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş', Çev.Ed. Demir R., Palme Yayıncılık, Ankara

Kirichok, Y., Navarro, B., & Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature*, 439(7077), 737.

Larsen L et al. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction*, 15:1562-1567.

Li, H. G., Liao, A. H., Ding, X. F., Zhou, H., & Xiong, C. L. (2006). The expression and significance of CATSPER1 in human testis and ejaculated spermatozoa. *Asian journal of andrology*, 8(3), 301-306.

Li, H. G., Ding, X. F., Liao, A. H., Kong, X. B., & Xiong, C. L. (2007). Expression of CatSper family transcripts in the mouse testis during post-natal development and human ejaculated spermatozoa: relationship to sperm motility. *Molecular human reproduction*, 13(5), 299-306.

Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387.

Lösel R, Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:46–56.

Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., ... Lishko, P. V. (2016). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 555–559.

Morales, P., Overstreet, J. W., & Katz, D. F. (1988). Changes in human sperm motion during capacitation in vitro. *Reproduction*, 83(1), 119-128.

Morton, B. E., Sagadraca, R., & Fraser, C. (1978). Sperm motility within the mammalian epididymis: species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma. *Fertility and sterility*, 29(6), 695-698.

Niksirat H, Andersson L, James P, Kouba A, Kozák P. Proteomic profiling of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* egg and spermatophore. *Anim Reprod Sci*. 2014; 149(3-4): 335-344.

Niksirat H, Kouba A. Subcellular localization of Ca deposits in the noble crayfish *Astacus astacus* spermatophore: Implications for post-mating spermatophore hardening and spermatozoon maturation. *J Morphol*. 2016; 277(4): 445-452.

Osman RA, Andria ML, Jones AD. Steroid induces exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:828-833.

Özkavukçu S., Aras D., (2017), Sperm Preparation Methods for IUI and IVF, *TJRMS*2017;1(2)

Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., ... & Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1219-1223.

Quill, T. A., Sugden, S. A., Rossi, K. L., Doolittle, L. K., Hammer, R. E., & Garbers, D. L. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14869-14874.

Pacey, A. A., Davies, N., Warren, M. A., Barratt, C. L. R., & Cooke, L. D. (1995). Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Human reproduction*, 10(10), 2603-2609.

Peate I (2009) The reproductive systems and associated disorders. In Nair M, Peate I (Eds) *Fundamentals of Applied Pathophysiology. An Essential Guide for Nursing Students*. Wiley-Blackwell, Chichester, 349-379.

Rahman, M. S., Kwon, W. S., & Pang, M. G. (2014). Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update. *BioMed research international*, 2014, 841615.

Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., ... & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603.

Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL, Butler A, Alisio A, Darszon A. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett*. 2010; 584(5): 1041-1046.

Spehr, M., Schwane, K., Riffell, J. A., Barbour, J., Zimmer, R. K., Neuhaus, E. M., & Hatt, H. (2004). Particulate adenylate cyclase plays a key role in human sperm

olfactory receptor-mediated chemotaxis. *Journal of biological chemistry*, 279(38), 40194-40203.

Suarez, S. S., Varosi, S. M., & Dai, X. (1993). Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4660-4664.

Suarez, S. S., & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human reproduction update*, 12(1), 23-37.

Thibodeau GA, Patton KT (2005) *The Human Body in Health & Disease*. Fourth edition. Elsevier Mosby, St. Louis MO.

Tortora GJ, Derrickson BH (2013) *Essentials of Anatomy and Physiology*. International Student Version. Ninth edition. John Wiley and Sons, Hoboken NJ.

Toshimori, K. (2009). Dynamics of the mammalian sperm head. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Ed K. Toshimori. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Turek, P. J. (2012). Male reproductive physiology. *Campbell-Walsh Urology*, 1, 591-615.

Uhland AM, Kwiecinski GG, DeLuca HF. Normalization of serum Ca restores fertility in vitamin D-deficient male rats. *J Nutr*. 1992; 122(6): 1338-1344.

Watson R (2005) *Anatomy and Physiology for Nurses*. 12th edition. Elsevier, London.

Whirledge, S., & Cidlowski, J. A. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva endocrinologica*, 35(2), 109–125.

Xia, J., Reigada, D., Mitchell, C. H., & Ren, D. (2007). CATSPER channel-mediated Ca<sup>2+</sup> entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biology of reproduction*, 77(3), 551-559.

Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Reproduction*, 23(1), 193-196.

Yanagimachi, R. (1994). *Mammalian fertilization. The physiology of reproduction*.

Yao, Y. Q., Ho, P. C., & Yeung, W. S. B. (2000). Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertility and sterility*, 73(4), 680-686.

Yoshida M, Yoshida K. Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by  $Ca^{2+}$ . *Mol Hum Reprod*. 2011; 17(8): 457-465.

Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod*. 1991; 6(9): 1265-1274.



## 10.EKLER

### EK 1

#### BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

#### “GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

**Araştırma Projesinin Adı:** Odorant ve progesteron uygulanmış kültür ortamlarında sperm kalsiyum kanalları ve olfaktör reseptörlerinin çeşitli infertil olgularda incelenmesi ‘‘

Sizi, ‘Odorant ve progesteron uygulanmış kültür ortamlarında sperm kalsiyum kanalları ve olfaktör reseptörlerinin çeşitli infertil olgularda incelenmesi’ başlıklı bir araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Bu anket çalışmasına katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama hakkına sahipsiniz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

**Sorumlu Araştırmacı:** Prof. Dr. Tülay İREZ

### **Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?**

İnfertil ve fertil bireylerden alınacak sperm örnekleri invitro ortamda kemotaktik ajan kullanılarak inkübe edilecek ve immünfloresan tekniği ile Kontrol olarak (28) fertil gönüllü spermi, oligoastenoteratospermia (28) hastalarda analiz yapılacaktır. Normal koşullarda atık materyal olarak değerlendirilen bu spermiler üzerinde yapılacak çalışmanın 'Gönüllü' açısından ister tedavi içeriği ve süreci ister ortaya çıkacak olan etki açısından herhangi bir riski bulunmamaktadır. Elde edilen sonuçlar istendiği durumda hasta ile paylaşılacak, sonuçlara dayalı bir tedavi öngörülmecektir. Yaklaşık 56 kişi kadar 'Gönüllü'nün onayıyla elde edilecek olan spermilerle yapılacak bu tez çalışması spermin yumurtaya doğru yüzme eylemine önemli katkısı olan koku reseptörleri, progesteron ve odorantların, kalsiyum kanallarına etkisi göz önüne alınarak, spermilerin in vitro performansının geliştirilerek kuyruk hareketinde olumlu yönde bir artış ve fertilizasyona katkı sağlaması için spermin fonksiyonlarının ve koku reseptör proteinlerinin ve kalsiyum kanallarının döllenebilirlik etkilere ışık tutarak ileriki yıllarda yapılacak çalışmalar için bilime katkıda bulunacaktır.

### **Bu çalışmaya katılmamalı mıyım?**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, vermiş olduğunuz doku örneğinin analiziyle ilgili süreç rutin olarak devam edecek ve işlem sonucunuzu yine planlanan tarihte almış olabileceksiniz. Kısacası bu çalışmaya katılıp katılmamanız analiz sürecini pozitif ya da negatif herhangi bir şekilde etkilemeyecektir.

### **Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?**

Bu çalışmaya katılmanız halinde herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

### **Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?**

Araştırma sorumlusu, kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde,

sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde yalnızca bu araştırmada olmak üzere tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

### **Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?**

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : NESLİHAN KÖPRÜLÜ

GÖREVİ : Biyolog

TELEFON : 05384250552

Biruni Üniversitesi'nde Biyolog Neslihan KÖPRÜLÜ tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim*). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.



Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sorun ile karşılaştığımda; Bio. Neslihan KÖPRÜLÜ'y 05384250552 nolu telefonda arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:

**EK 2**

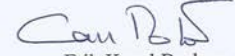
**ETİK KURUL ONAYI**

**Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu**

26.02.2018

*Sayın:* Prof.Dr.Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda **“Odorant Ve Progesteron Uygulanmış Kültür Ortamlarında Sperm Kalsiyum Kanalları Ve Olfaktör Reseptörlerinin Çeşitli İnfertil Olgularda İncelenmesi”** isimli araştırmanızın kurulumuzun **06.02.2018** tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.



Etik Kurul Başkanı  
**Prof.Dr.Can Polat EYİGÜN**

T.C.  
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

	Karar No: 2018/13-16
Tarih: 26.02.2018 Toplantı Sayısı:13	Araştırmacı Prof.Dr.Tülay İREZ'in planladığı "Odorant Ve Progesteron Uygulanmış Kültür Ortamlarında Sperm Kalsiyum Kanalları Ve Olfaktör Reseptörlerinin Çeşitli İnfertil Olgularda İncelenmesi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.

ÜYELER

Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN	Tıp Fakültesi	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D	Etik Kurul Başkanı	
Doç.Dr.Leman ŞENTURAN	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik Bölümü	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof.Dr.Fatma ÇELİK	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik Bölümü	Üye	
Doç.Dr.Şölen HİMMETOĞLU	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya A.D.	Raportör	
Doç.Dr.Burcu KARADUMAN	Diş Hekimliği Fakültesi	Periodontoloji A.D.	Üye	
Yrd.Doç.Dr.Ayşe Tuba CEYHUN	Eğitim Fakültesi	Zihin Engelliler Bölümü	Üye	
Yrd.Doç.Dr.Yonca ZENGİNLER	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü	Üye	

## 11.ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** NESLİHAN KÖPRÜLÜ

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 30/01/1995

**Mail Adresi:** neslihankoprulu@gmail.com

**Unvanı:** Biyolog

**Öğrenim Durumu:** Lisans

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji (İngilizce)	2016

## İNTİHAL RAPORU

### ODORANT VE PROGESTERON UYGULANMIŞ KÜLTÜR ORTAMLARINDA SPERM KALSİYUM KANALLARI VE OLFAKTÖR RESEPTÖRLERİNİN ÇEŞİTLİ İNFERTİL OLGULARDA İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%9

BENZERLİK ENDEKSİ

%8

İNTERNET  
KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%6

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.dicle.edu.tr  
İnternet Kaynağı

%3

2

www.norbil.hacettepe.edu.tr  
İnternet Kaynağı

%2

3

apps.who.int  
İnternet Kaynağı

%1

4

docplayer.biz.tr  
İnternet Kaynağı

%1

5

acikerisim.deu.edu.tr  
İnternet Kaynağı

%1

6

www.toraks.org.tr  
İnternet Kaynağı

<%1

7

Submitted to Inonu University  
Öğrenci Ödevi

<%1

8

Submitted to Harran Üniversitesi

Öğrenci Ödevi	<%1
9 utcd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
10 Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
11 acikerisim.baskent.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
12 Submitted to Suleyman Sah University Öğrenci Ödevi	<%1
13 www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart Kapat  
Bibliyografyayı Çıkart Kapat

Eşleştirmeleri çıkar Kapat