

**T.C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN NORMOSPERMİ, OLİGOSPERMİ VE  
ASTENOSPERMİ GRUPLARI ARASINDA NİTRİK OKSİT  
SENTETAZ (NOS) İZOFORMLARININ ETKİSİ**

**Biyolog Hayriye KARAKAYA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2012**

**T.C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN NORMOSPERMİ, OLİGOSPERMİ VE  
ASTENOSPERMİ GRUPLARI ARASINDA NİTRİK OKSİT  
SENTETAZ (NOS) İZOFORMLARININ ETKİSİ**

**Biyolog Hayriye KARAKAYA**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Canan HÜRDAĞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2012**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Adı ve Soyadı



# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
1. ÖZET .....	1
2. SUMMARY .....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	4
4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM .....	4
4.1.1. Testis Histolojisi .....	4
4.1.2. Spermatogenez .....	6
4.1.2.1. Spermatogoniyal Evre .....	7
4.1.2.2. Mayoz Bölünme Evresi .....	8
4.1.2.3. Spermiyogenez Evresi .....	8
4.1.3. Spermin Kapasitesi ve Motilite Kazanması .....	11
4.1.4. Semen .....	11
4.1.4.1. Semen Analizinde Spermatozoanın Mikroskopik İncelenmesi .....	12
4.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS) .....	14
4.3. NİTRİK OKSİT .....	16
4.3.1. Nitrik Oksit Sentezlenmesi .....	17
4.3.2. Nitrik Oksit İzomerleri .....	17
4.3.2.1. Nöral NOS (nNOS, bNOS veya NOS-1) .....	18
4.3.2.2. İndüklenebilir NOS (iNOS veya NOS-2) .....	18
4.3.2.3. Endotelial NOS (eNOS veya NOS-3) .....	19
4.4. ERKEK İNFERTİLİTESİ VE NİTRİK OKSİT İLE İLİŞKİSİ .....	20
4.4.1. ROS'un Spermatozoa Tarafından Üretilmesi .....	21
4.4.2. Yüksek Konsantrasyonda Nitrik Oksit .....	22
4.4.3. Düşük Konsantrasyonda Nitrik Oksit .....	22
4.4.4. Sperm Kapasitesi .....	22
4.4.5. Sperm Motilitesi .....	24
5. MATERYAL VE YÖNTEM .....	26
5.1. HASTA GRUPLARI .....	26
5.2. SEMEN TOPLANMASI .....	26
5.3. SPERM BOYAMA VE MORFOLOJİ DEĞERLENDİRMESİ .....	27

5.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA .....	27
5.5. NİTRİT-NİTRAT ANALİZİ .....	28
5.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....	28
6. BULGULAR .....	29
6.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR .....	29
6.1.1. eNOS Değerlendirmesi .....	29
6.1.2. iNOS Değerlendirmesi .....	38
6.2. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....	42
6.2.1. Yaş Değerlendirmesi .....	42
6.2.2. Nitrit/Nitrat Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi .....	43
7. TARTIŞMA .....	44
8. SONUÇ .....	48
9. TEŞEKKÜR .....	49
10. KAYNAKLAR .....	50

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ADP</b>	: Adenozin Difosfat
<b>ART</b>	: Yardımcı Üreme Teknikleri
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>cAMP</b>	: 3'-5'-Siklik Adenozin Monofosfat
<b>cGMP</b>	: Siklik Guanozin
<b>cNOS</b>	:Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EDRF</b>	: Endotel Kökenli Gevşetici Faktör
<b>eNOS</b>	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
<b>FAD</b>	: Flavin Adenin Dinükleotid
<b>Fe</b>	: Demir
<b>FMN</b>	: Flavin Mononükleotid
<b>G6PDH</b>	: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HO<sub>2</sub></b>	: Hidroperoksil
<b>IVF</b>	: <i>İn Vitro</i> Döllenme
<b>ICSI</b>	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
<b>L-NAME</b>	: Nomega –Nitro-l-Arjinin Metil Ester
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>NONOate</b>	: Diethylamine Nitrik Oksit Kompleksi
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Nitrojen Dioksit
<b>NO<sub>3</sub></b>	: Nitrat
<b>NOS</b>	: Nitrik Oksit Sentaz
<b>nNOS</b>	: Nöral Nitrik Oksit Sentaz
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit Anyon
<b>O<sub>2</sub></b>	: Moleküler Oksijen
<b>OH</b>	: Hidroksil

<b>PDE</b>	: Fosfodiesteraz Proteinkinaz
<b>PKG</b>	: Protein Kinaz G
<b>PTKs</b>	: Protein Tirozin Kinaz
<b>PTPs</b>	: Protein Tirozin Fosfataz
<b>PDEs</b>	: Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RNS</b>	: Reaktif Nitrojen Türleri
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RO<sub>2</sub></b>	: Peroksil
<b>sGC</b>	: Siklik Guanilat Siklaz
<b>SNP</b>	: Sodyum Nitroprusid
<b>SNAP</b>	: S Nitroso N Asetil Penisillamin
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µM</b>	: Mikromolar

**Araştırma Projesi Nosu** : HE/0532010

## 1. ÖZET

Nitrik oksit, birçok fizyolojik sistemler içerisinde çok çeşitli rolü olmasından dolayı son zamanlarda biyomedikal bilimde en çok çalışılmış moleküllerden birisidir. Bununla birlikte nitrik oksit (NO), erkek ürogenital sistemin çeşitli fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alan serbest radikal türüdür. Reaktif oksijen türlerine dahil olması spermin hiperaktivasyon ve kapasitasyon işlemini de içermektedir. Nitrik oksidin dışı ve erkek genital bölge organlarını da içeren hem hücre içi hem de hücre dışı haberci fonksiyonları olduğu bulunmuştur.

Spermatozolar fertilizasyon kapasitesini kazanabilmek için dışı genital sisteminde ilerlerken kapasitasyon sürecini tamamlarlar ve sonuçta motiliteleri artar. Fosfotirozin-kinaz aktivasyonunun kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve dolayısıyla fertilizasyon sürecinde etkili olduğu ve bu süreçte reaktif oksijen türlerinin (ROS) aktivasyonunu etkilediği bildirilmiştir. ROS'lar yüksek oksidasyon potansiyellerinden dolayı, serbest radikaller grubunda yer alırlar. Çalışmamızda NO sentezinden sorumlu olan NOS izoformlarından olan eNOS ve iNOS'un insan sperminde normospermi, oligospermi ve astenospermi grupları arasındaki rolünü belirlemeyi amaçladık.

Belirlemiş olduğumuz üç ana gruptan aldığımız örnekler, 5 µm kalınlığında kesit alınmak üzere parafine gömüldü. Alınan kesitler immünohistokimyasal olarak, eNOS ve iNOS poliklonal antikorları ile işaretlendi. Dokudaki NOS reaksiyonunun dağılımı, ışık mikroskopunda (Olympus Bx53, Japonya) incelendi ve fotoğraflandı. Üç ana gruptan elde edilen semen örneklerinin nitrit/nitrat oranları ölçülerek istatistiksel olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak çalışmamızda, oligospermi ve astenospermi örneklerinde normospermi grubuna kıyasla eNOS reaksiyonunun azaldığı, iNOS'un arttığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak, spermelerde meydana gelen değişikliklerde NO'in önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır.



## 2. SUMMARY

Nitric oxide is currently one of the most studied molecules in biomedical sciences because of the multiplicity of roles it plays in various physiological systems. NO is a free radical species that plays role of regulation of functions on the male genital system. Involvement of reactive O<sub>2</sub> species has been implicated in the process of hyperactivation of sperm. Nitric oxide has recently been found to function both as an intracellular and extra cellular messenger, including male and female genital tract organs. The objective of the present study was to investigate the role of nitric oxide in between human normospermia, asthenospermia and oligospermia groups.

When spermatozoa proceeding through the female genital system they were completed the capacitation stage to gain fertilization ability, in the end, their motilities are increased. Indicated that, activation of phosphotyrosine-kinase effective for the capacitation, acrosome reaction and fertilization, and in this stage ROS effects activation of sperm. Free radical groups include ROSs, because of their oxidation potential. In this study, we aimed that to obtain the role of eNOS and iNOS that are isoforms of NOS and they responsible for NO synthesis, in the human sperm groups that normospermia, oligospermia and asthenospermia.

The 5 µm slides which were taken from three main groups, and they embedded into paraffin. These samples stained with eNOS and iNOS antibodies. Distribution of NOS reaction in the tissue was measured by light microscope (Olympus Bx53, Japan). The three main groups semen samples were istatically evaluated by measuring rate of nitrite/nitrate.

In conclusion our study showed that eNOS reaction was decreased, iNOS reaction was increased in oligospermia and asthenospermia samples compare to the normospermia groups. According to this study we have concluded that NO is play a very important role in these changes in spermatozoa.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Son 15-20 yıldır gonadlar ve sperm fonksiyonları üzerine yapılan çalışmalar, erkek infertilitesinin önemini anlamamıza yol açmaktadır. Sperm fonksiyon bozukluğu ve idiyopatik (sebebi açıklanamayan) erkek infertilitesini çevresel, fizyolojik ve genetik pek çok faktör etkilemektedir (1, 2 , 3). *In vitro* dölllenme (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi yardımcı üreme teknikleri bu soruna önemli bir çözüm sunmaktadır. Bu koşullar altında normal sperm fonksiyonunu etkileyen faktörleri tanımlamak önem teşkil etmektedir. Günümüzde sperm fonksiyon bozukluğu ve infertilite arasındaki ilişkinin açıklanabilmesi için yapılan çalışmalar serbest oksijen radikalleri üzerine odaklanmaktadır ve oksidatif stresin erkek üreme fonksiyonu üzerine olan rölatif etkisi araştırılmaktadır (1, 2).

Serbest oksijen radikallerinden biri olan NO'in, erkek üreme sisteminde birçok fonksiyonun kontrolünde düzenleyici bir görevi vardır (4, 5, 6). NO, endojen L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenmekte olup farklı dokularda, farklı NOS izoformu bulunmaktadır (7). Spermatozoa'nın NOS izoformlarının lokalizasyonları hakkında yeterli bir bilgi bulunmamaktadır.

İnsan spermatozoasındaki NO üretimi üzerindeki çalışmalar, çelişkili ve yetersiz bulgular vermektedir. Nitrik Oksit'in seminal plazmadaki etkileri, konsantrasyonuna göre değişmektedir. Düşük NO konsantrasyonu, kapasitasyon ve zona pellusida'ya bağlanmada anlamlı bir artışa sebep olurken, yüksek konsantrasyonlardaki NO'in ATP (Adenozin Trifosfat) sentezini inhibe ederek sperm konsantrasyonunu ve motilitesini bozduğu düşünülmektedir (5, 8, 9). Fakat yapılan çalışmalarla NO'in sperm motilite ve canlılığının korunmasına olan etkileri tam olarak ortaya konulamamıştır.

İnsanda nitrik oksitin sperm üzerindeki etkisini gösteren çalışmalar yetersizdir. Özellikle normospermi, oligospermi ve astenospermi grupları arasında NOS izoformları ile ilgili araştırmalar bulunmamaktadır. Yaptığımız bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak normospermi, oligospermi ve astenospermi gruplarında eNOS ve iNOS izoformlarını immunohistokimyasal olarak belirlemeyi, bu üç grup arasında nitrit/nitrat değerlerini saptamayı ve aldığımız sonuçlara bağlı olarak, NO'in sperm üzerindeki rolünü belirlemeyi amaçladık.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM

Erkek üreme sistemi; 1) haploid erkek gametin (spermatozoa) devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından, 2) erkek seks hormonlarının sentezi ve sekresyonundan sorumludur.

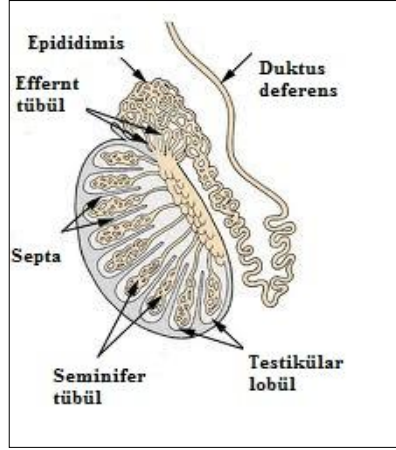
Erkek üreme sistemi 4 birimden oluşur;

- Sperm üreten ve sentezleyen ve androjenleri salgılayan testisler,
- Dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, vaz deferens, ejakülatuar kanal ve erkek üretrasının bir parçası,
- Salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besinler sağlayan aksesuar bezler; seminal vezikül, prostat bezi ve bulbo üretral bezler,
- Erektile dokudan oluşan çiftleşme organı penis (10).

#### 4.1.1. Testis Histolojisi

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alan çift organlardır. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34°C ila 35°C gereklidir (11).

Testisler tunika albuginea adlı sıkı bağ dokusundan oluşan bir kapsülle çevrilidir. Tunika albuginea, arka yüzde kalınlaşarak mediastinum testis denilen, testis kan damarı ve sinirlerin giriş ve çıkış bölgesini oluşturur. Mediastinumdan testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250 ila 300 lopçuğa böler. Her bir lopçuk 1 ila 4 seminifer tübülü içerir (Şekil 1). Spermatozonlar seminifer tübüller içerisinde üretilirler. Tübüller arasında yer alan bağ dokusu içerisinde interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) yer alır. Bu hücreler de testiküler androjenleri salgılar (10).

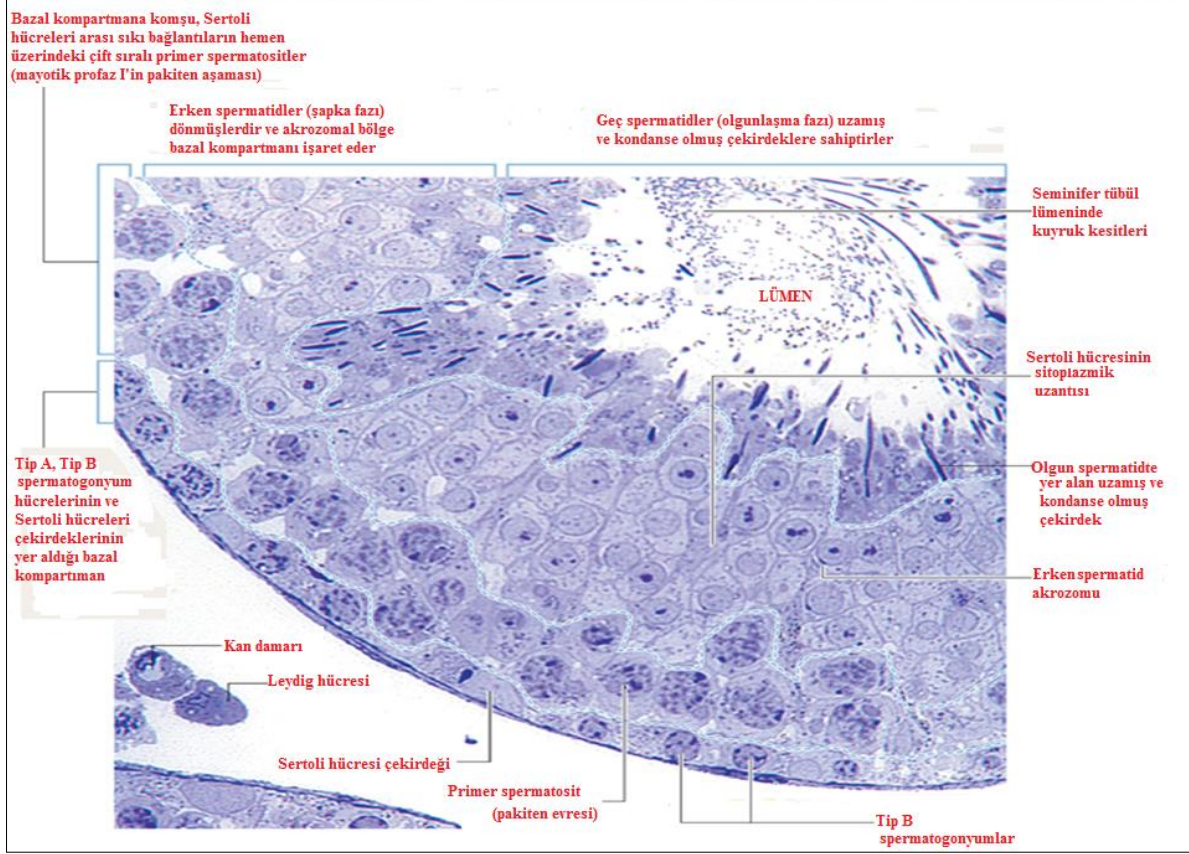


**Şekil 1.** Testis histolojisi (10).

Pubertede başlayan spermatogenez, spermatogoniumların spermatozoa haline dönüşmesini sağlayan olayların tamamını kapsayan bir süreçtir. Erkek germ hücreleri, testisin seks kordonları içinde destek hücreleri tarafından çevrelenmiş büyük ve soluk renkli hücreler şeklinde görülmektedir. Tıpkı folliküler hücreler gibi, testisin yüzey epitelinden köken alan destek hücreleri, Sertoli hücreleri olarak bilinir (10).

Puberteden hemen önce, seks kordonlarının içi boş olarak bir lümen oluşturur ve bu yapılara seminifer tübüller denilir. Aynı zamanda primordiyal germ hücreleri de spermatogonyal kök hücrelere farklıdır. Bu kök hücre popülasyonundan düzenli aralıklarla ayrılan hücreler tip A spermatogonyumları oluşturur (Şekil 2). Tip A spermatogonyum üretiminin başlaması spermatogenezin başlamış olduğunu gösterir. Bu hücreler kısıtlı sayıda mitotik bölünmelerle hücre kümeleri meydana getirir. Son bölünme sonucunda da meydana gelen hücreye tip B spermatogonyum denir. Tip B spermatogonyumun bölünmesiyle de primer spermatozoid oluşur. Primer spermatozoidler oldukça uzun süren bir profaz evresinin ardından 1.mayoz bölünmenin hızla tamamlanmasıyla sekonder spermatozoidlere dönüşür. Bu hücrelerden de 2.mayoz bölünme sırasında 23 haploid kromozom içeren spermatozoidler meydana gelir. A tipi hücrelerin kök hücre topluluğundan ayrılmasından, spermatozoidlerin oluşumuna kadar geçen bir seri olay boyunca sitokinezis tamamlanmış olduğundan, ardışık hücre üretimleri sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı durumdadır. Böylece tek bir spermatogonyum A'ya ait soy, çoğalıp farklılaşmaları sırasında birbiriyle ilişkisini koruyan bir germ hücre topluluğu halindedir. Ayrıca, spermatogonyum ve spermatozoidler gelişme süreleri boyunca Sertoli hücreleri arasındaki derin oyuklar içinde gömülü kalır. Böylece Sertoli hücreleri, germ

hücrelerini, destekler, korur, beslenmelerine katkıda bulunur; spermatozoların olgunlaşım serbest kalmalarına yardımcı olur (12).



Şekil 2. Seminifer epiteldeki hücrelerin dağılımları (10).

#### 4.1.2. Spermatogenez

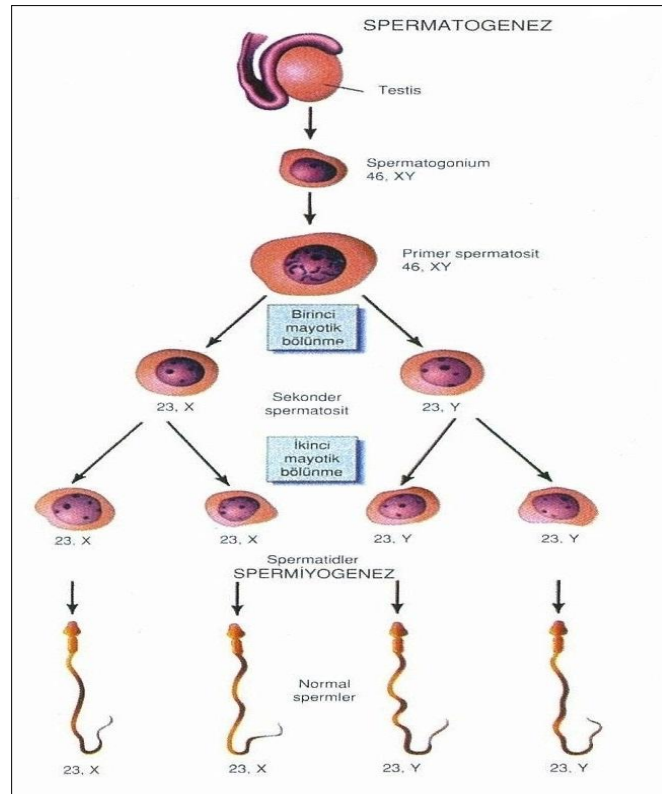
Embriyonik ve fetal gelişim döneminde spermatogonyum hücreleri primordiyal germ hücrelerinden köken alırlar. Yeni doğanda seminifer tübüller, germinal epitelden köken alan Sertoli hücreleri ve daha az olmak üzere spermatogonya ile çevrilidir. Puberteye yaklaşıldıkça, spermatogonyumlar sayıca artar ve gelişme bununla sınırlı kalır. Puberteden itibaren başlayan spermatozoa üretimi 45 yaşına kadar aktif olarak sürer ve 45 yaşından sonra azalarak da olsa, tüm yaşam boyunca devam eder (10).

Spermatogenezis, tam farklılaşmamış diploid (2n) spermatogenetik hücrelerden hayli özelleşmiş haploid (1n) spermatozoonların geliştiği bir olaylar dizisidir. Bu hücrelerin

geçirdiği evreler spermatogonyal evre (spermatogenezis), mayoz bölünme evresi ve spermatid evresi (spermiyogenezis) olmak üzere üç evrede gerçekleşmektedir. Spermiyogenezis sürecini tamamlayan spermatidlerin Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasından serbest kalması ise spermiyasyon olarak isimlendirilir (10).

#### 4.1.2.1. Spermatogonyal Evre

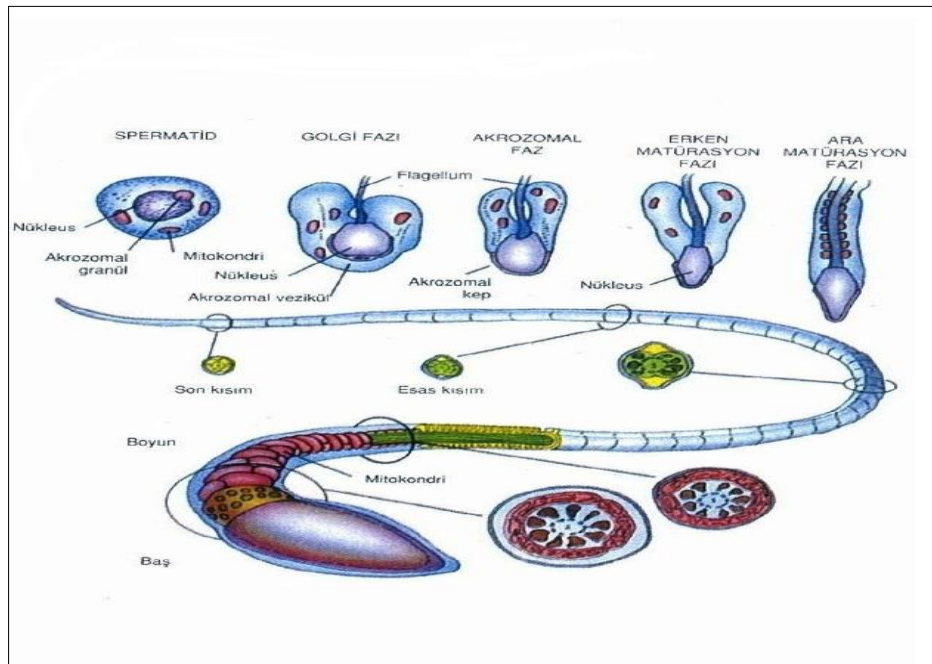
Seminifer epitelde, bazal membran üzerinde bulunan ve diploid olan spermatogonyumlar mitotik aktivite ile birkaç kez çoğalır. Bu çoğalma ile spermatogenezis için yeterli sayıda hücre sağlanırken, bir bölümü de kök hücre olarak işlev görür. Kök hücreler, herhangi bir nedenle spermatogenetik hücrelerin zarar görmesi halinde mitotik aktivite ile yeniden çoğalırlar ve yaşam süreleri oldukça uzundur (10).



Şekil 3: Spermatogenezis: (a) Birinci mayotik bölünme, (b) İkinci mayotik bölünme (11).

#### 4.1.2.2. Mayoz Bölünme Evresi

Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kompartmanların alt bölümlerinde spermatogonya yer alır ve gelişim süreci içinde lümeneye doğru ilerlerler. Bu esnada, hücre hacmi belirgin olarak artar ve çekirdek morfolojisi mayoz bölünmenin profaz evresine (leptoten, zigoten, pakiten ve diptoten) uygun yapısal özellikler gösterir. Spermatogonyumların mitoz bölünme geçirerek meydana getirdikleri yeni hücreler, primer spermatozoid olarak adlandırılır. Primer spermatozoidlerin 1. mayoz bölünmeyi geçirerek meydana getirdikleri yeni hücreler, sekonder spermatozoid adı alır (Şekil 3). Sekonder spermatozoidlerin yaşam süresi 8 saat sürdüğü için histolojik kesitlerde görülmesi zordur. Sekonder spermatozoidler, 2. mayoz bölünme ya da ekvatoryal bölünme ile spermatidleri meydana getirirler ve böylece spermiyogenezis evresi başlar (13).



Şekil 4: Spermatozoid'ten, spermatozoid oluşumu 'Spermiyogenez evresi'(12).

#### 4.1.2.3. Spermiyogenez Evresi

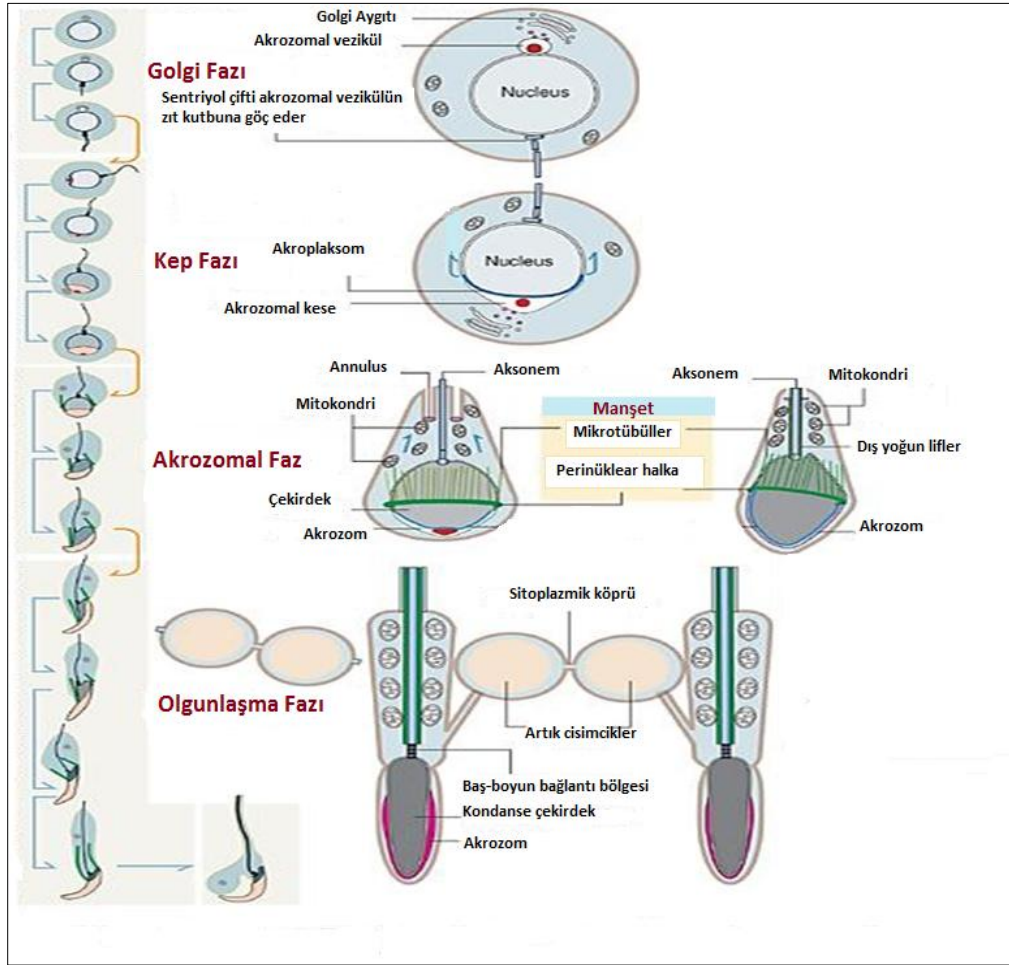
Haploid spermatozoidler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda yerleşmişlerdir. Spermatozoidler, Sertoli hücrelerinin sitoplazma kriptaları içinde gömülmüştür.

Spermatidler, spermiyogenez adı verilen oldukça farklılaşmış bir hücre işlemine uğrar. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır (Şekil 4).

Üç ana olay spermiyogenez karakterize eder.

**a) Kamçının gelişmesi:** Kamçı, distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun lifler ve bir fibröz kılıf ile çevrili bir aksonem'e (eş merkezli dizilimli 9+2 mikrotübül çiftleri) sahiptir. Mitokondriyonlar kuyruğun proksimal bölümü (orta parça) çevresinde sarmalımsı bir kılıf oluşturur.

**b) Akrozom gelişmesi:** Döllenme için gerekli olan hidrolitik enzimlerin (hiyaluronidaz, akrozin, asit fosfataz, proteaz, nöraminidaz, N asetilglukozamidaz ve arilsülfataz) depolanması ve sürekli sentezinin gerçekleştiği akrozomal keseyi içerir. Akrozomun gelişmesi dört ardışık evreden oluşur. Golgi fazı, kep/şapka fazı, akrozomal faz ve olgunlaşma fazı (Şekil 5).



Şekil 5. Akrozom gelişmesinin fazları: golgi fazı, kep fazı, akrozomal faz, olgunlaşma fazı (10).



- **Golgi fazı:** Hidrolitik enzimler Golgi aygıtından akrozomal veziküle aktarılır. Sentriyol çifti akrozomal vezikülün zıt kutbuna göç eder.
- **Kep fazı:** Akrozom kesesi yassılaştır, çekirdek zarına tutunmuş bir kep oluşturur ve çekirdek çevresini sarmaya başlar. Sentriyol çifti akrozomal vezikülün zıt kutbuna ulaşmıştır. Spermatid, akrozomal bölge bazal kompartmana bakacak şekilde döner.
- **Akrozomal faz:** Akrozom, çekirdeğin üst 1/3'lük kısmını örter ve sarmaya devam eder. Manşet gelişir. Distal sentriyol, 9+2 eş merkezli dizilmiş mikrotübül çiftlerinden oluşan aksonemi oluşturur. Mitokondriyonlar gelişen aksonem boyunca göç ederler.
- **Olgunlaşma fazı:** Bir perinükleer halka ve tutunmuş mikrotübüllerden oluşan manşet, kaudale (kuyruğa) ilerler. Keratin içeren dış yoğun lifler gelişir ve aksonem boyunca dizilirler. Mitokondriyonlar, sadece orta parçada dış yoğun liflerin çevresinde dizilir.

**c) Nükleer yoğunlaşma:** Somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizin-zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma oluşur.

Bu somatik histonların protaminlere dönüşümünden sonra, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilir. Spermiyogenezin olgunlaşma aşamasından sonra belirgin bir RNA sentezi yoktur.

Sonucu spermatid olgunlaşma evresi sırasında mitokondriyonlar gelişen kamçı boyunca dizilimlerini tamamlar; kamçı keratin içeren dış yoğun liflerle sarılı bulunan merkezi bir aksonemden (9+2 mikrotübüller) oluşur. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır, ve manşet kaudal yönde göç eder. Olgunlaşma işlemi, çekirdek son uzamış, yoğunlaşmış şeklini aldığı anda, manşet dağılmaya başladığında ve dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda tamamlanır. Kuyruk iki ana parçadan oluşur: 1) mitokondriyonların bulunduğu, orta parça, ve 2) kuyruğun fibröz bir kılıfla sarılı olduğu, esas parça.

Bir son halka, sperm kuyruğunun orta parça, ana parça geçişinin sınırlarını belirler. Olgun spermatidten bir sitoplazma artığı olan artık cisimcik, sperm meydana (seminifer tübül lümenine olgun spermatidlerin salınımı) gelirken, spermiyogenez sonunda Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Somatik histonların arjinin ve lizin zengin protaminlerle yer değiştirmesi olayı, çekirdek yoğunlaşması, spermiyogenezin son basamağını tanımlar. Bu yer değişimi sperm genomik DNA (Deoksiribonükleik asit)'sını

stabilize eder ve korur. Lümene verilen sperm hücresi henüz fertilizasyon yeteneğine sahip değildir ve hareket yeteneği yoktur (10).

#### **4.1.3. Spermin Kapasitasyonu ve Motilite Kazanması**

Spermin oositi fertilize edebilmesi için dışı genital sistemi içerisinde geçirdiği yapısal ve fonksiyonel değişimler sürecine kapasitasyon denir. Kapasitasyonun sperm üzerindeki genel etkileri 3 aşamada gerçekleşir: 1) Sperm motilitesi (hiperaktivasyon), 2) Sperm yüzey değişiklikleri, 3) Akrozom reaksiyonu ve aktivasyonudur (14).

Ejakülasyon sonrası spermelerin oositi fertilize etme yeteneği bulunmadığından dolayı, yaklaşık 7 saat süren kapasitasyon dönemini geçirmesi gerekir. Bu dönemde spermin akrozom yüzeyinden glikoprotein kılıf ve seminal proteinler uzaklaştırılır. Spermatozooların membran içeriği ve yapısı büyük oranda değişir. Kapasitasyon sonrası spermatozoolarda morfolojik değişiklik gözlenmez, ancak daha aktif (hiperaktivasyon) hale gelirler. Spermatozooların kapasitasyonu uterus ya da uterin tüplerin içinden geçerken buralardan salgılanan maddeler yardımıyla olur (13).

Kapasitasyonun sperm üzerindeki yapısal etkileri;

- Daha önce erkek genital yollarında eklenen ‘stabilize edici faktörler ‘ uzaklaştırılır.
- Akrozom yüzeyindeki glikoprotein kılıf uzaklaştırılır.
- Seminal sıvıdan eklenen proteinler uzaklaştırılır.
- Membran kolesterol / fosfolipid oranı değişir.
- Membran potansiyeli değişir

İnsanda yaklaşık 7-8 saat süren kapasitasyon olayı ile spermin akrozomal yüzeyini kaplayan plazma membranı üzerindeki glikoprotein kılıfları ve seminal plazma proteinleri tamamen ortadan kaldırıldıktan sonra akrozomal reaksiyon başlar. Kapasitasyonun tamamlanması akrozom reaksiyonu için önemlidir (11, 15).

#### **4.1.4. Semen**

Semen sıvısı, spermatozoanın testis ve epididimis salgısının, ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerin salgularının birleşmesiyle oluşur.

Sonuç olarak, oluşan viskozitesi yüksek semen adını alır. Bu salgıda spermatozoa, semen sıvısının %5'ini oluşturur (16).

İnsanda ejakülat miktarı kişisel farklılıklar göstermekle birlikte 2-6 ml. kadardır. Semen pH sı 7.2-8.0 arasında değişkenlik gösterir ve diğer pek çok memeliden farklı olarak insan semeni ejakülasyonun hemen sonrasında koagüle olur ve yaklaşık 20 dk. içinde yeniden çözülerek likefiye olur (13, 16).

#### **4.1.4.1. Semen Analizinde Spermatozoanın Mikroskopik İncelenmesi**

Olgun bir sperm, başlıca baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşur: Sperm başı ortalama 4-5µm uzunlukta, 2,5-3,5µm genişliğindedir. Başın büyük bir kısmını çekirdek oluşturur. Kromatin yoğunlaşır ve hacim olarak küçülür. Çekirdeğin 2/3'lük ön kısmını akrozom oluşturur. Akrozom başlık biçiminde olup zar ile sarılı bir organeldir. Kaudalinde hücre zarı ile çekirdek zarı arasında özelleşmiş postakrozom denilen, hücre zarına sıkıca yapışmış bir bant bulunur (13). Döllenme sırasında spermi saran hücre zarı, sekonder oositin hücre zarı ile bu postakrozom bölgesinden birleşerek erir ve spermin oosit sitoplazması içerisine geçişi sağlanır (17). Spermin boyun kısmı kısa bir parça olup bağlantıyı sağlamaya yönelik segmentli kolonlardan ve proksimal sentriyolden oluşur. Orta parça ise sperm hareketini sağlamak üzere gerekli enerjiyi sağlayan mitokondrileri barındırır. Kuyruk kısmı ise sperme diklik veren fibröz tabaka ve spermin hareketliliğini sağlayan aksonem tabakasından oluşur (13).

##### **a) Konsantrasyon**

Sperm sayısı, direkt olarak semenin ince bir tabaka halinde lam-lamel arasında Makler, hemosimetre, Thoma lamı ve Hoffman sayaçları kullanılarak incelenmesi ile belirlenir. Sperm konsantrasyonu milyon/ml olarak değerlendirilir. WHO standartlarına göre 20 milyon/ml ve daha fazla olması normal kabul edilmektedir (16).

##### **b) Motilite**

Sperm sayımı yapılırken, sperm hareketleri 4 sınıfa ayrılır

- a ) +4 hareketli spermatozoolar; lineer bir şekilde ileri yönde hızlı hareket ederler  
b ) +3 hareketli spermatozoolar; ileri yönde daha yavaş harekete sahiptirler  
c ) +2 hareketli spermatozoolar; oldukları yerde hareket ederler  
d ) +1 hareketli spermatozoolar da immotil şekilde durmaktalar. Motilite hareketlilik anlamına gelmekte olup +4, +3 ve +2 hareketli spermatozooların toplam oranıdır. Hızlı hareketli sperm sayısı (PHSS) sadece +4 ve +3 hareketli spermatozooların oranıdır (16).

### c) Morfoloji

Bir sperm hücrenin normal olarak kabul edilebilmesi için sperm başı, boynu (orta parça), ve kuyruğu normal olmalıdır. Başın şekli oval olmalıdır. Başın boyu 4.0-5.0µm ve genişliği 2.5-3.5µm olmalıdır. Baş bölgesinin %40-%70'ini kapsayan iyi tanımlanmış bir akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım ince uzun ve genişliği 1µm den az, boyu baş uzunluğunun 1.5 katı ve başa aksiyal olarak bağlanmış olmalıdır. Kuyruk düz, düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 45µm uzunlukta olmalıdır. Kruger kriterlerine göre %14 ve üzeri normal sperm olmalıdır (16).

#### • Morfolojik Bozuklukların İnfertiliteye Etkisi

Normal ve normale yakın morfolojiye sahip sperm hücrelerinin seçilmesi, infertilite tedavisinde son derece önemlidir. Örneğin; akrozom, spermin oosite penetrasyonu için gerekli enzimleri içeren önemli bir bölge olduğundan, akrozom anomalileri sperm zona pellusida bağlanmasında sorun yaratmaktadır (18). Nukleus anomalileri, DNA içerik bozukluğu anlamına gelmektedir. Bu da sağlıklı bir embriyo gelişimini engellemektedir (19, 20). Sitoplazmik artık, spermin olgunlaşmadığı anlamına gelmektedir (14). Globozoospermiya, akrozomu olmayan spermatozoadır ve dölleme kabiliyeti yoktur (21). Orta parça, mitokondrilerin olduğu önemli bir kısımdır. Buradaki anomaliler, enerji desteğinin noksanlığına neden olmaktadır. Bu durum motiliteyi direkt etkilemektedir. Spermin non-aksiyel orta parçaya sahip olması, progresif motilitesini düşürmektedir. Kuyruk, spermin hareketliliğini ve dikliğini sağlayan bölge olduğundan kuyruktaki anomaliler, sperm hareketini kısıtlayıcı etkiye sahiptir (22).

**Akrozom:** Sperm penetrasyonu

**Nukleus:** DNA içerik bozukluğu  
**Sitoplazmik artık:** Sperm maturasyonu  
**Orta parça:** Enerji noksanlığı  
**Kuyruk:** Motilite düşüklüğü  
**Non-aksiyel:** Motilite düşüklüğü  
**Globozoospermiya:** Döllenme bozukluğu (16).

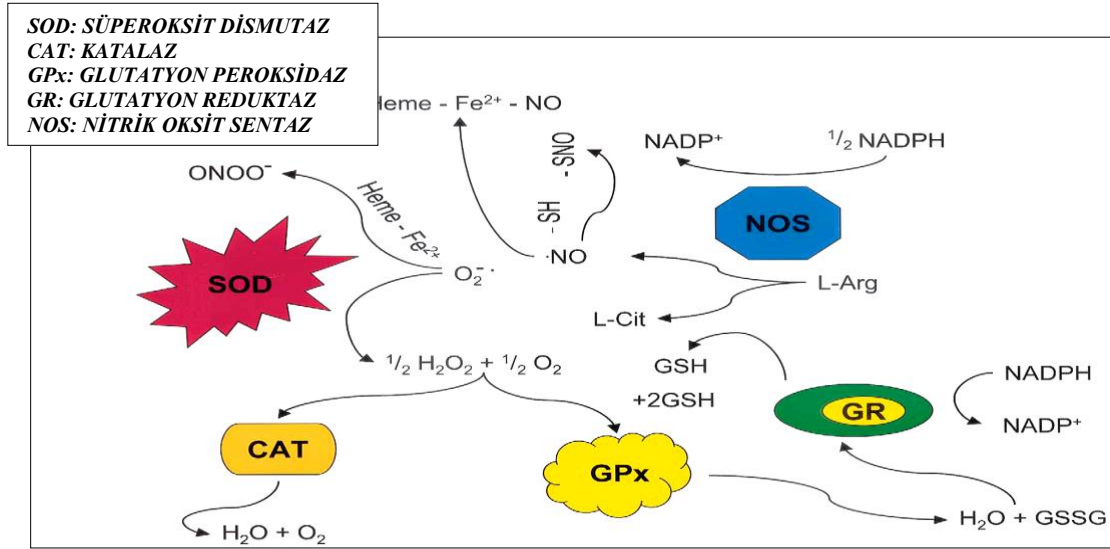
#### d) Terminoloji

**Normospermi:** ml. deki sperm sayısının 20 milyon/ml. ve üzeri olması.  
**Oligospermi:** ml. deki sperm sayısının 20 milyon/ml'den az olması.  
**Polispermi:** ml. deki sperm sayısının 20 milyon/ml. den çok fazla olması.  
**Azospermi:** tüm ejakülatta hiç sperm bulunmaması.  
**Aspermi:** seminal plazma üretiminin olmaması.  
**Nekrospermi:** spermilerin ölü olması.  
**Astenospermi:** motilitenin düşük (%30'dan daha az) olmasıdır.  
**Teratospermi:** morfolojik olarak anormal spermilerin çoğunlukta olması.  
**Lökositospermi:** semende lökositlerin 1 milyon/ml'den daha fazla olması.  
**Hiperspermi:** semen hacminin 6 ml'den daha fazla olması.  
**Hipospemi:** semenin 1 ml veya daha az olması.  
**Globozoospermi:** spermde akrozom yokluğu (16).

## 4.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

Tüm hücreler her gün her dakika yüzlerce serbest radikalle karşı karşıya kalır. Bu radikaller, normal hücre metabolizma ürünleri olarak çevremizdeki kimyasallar tarafından oluşturulur, yediğimiz yiyecekte ve soluduğumuz havada bulunur (23). Testiste, gelişmekte olan germ hücreleri, kompleks hücre değişiklikleri ile birlikte seminifer epitelin bazal bölümünden adluminal bölümüne doğru dereceli bir şekilde göç etmektedir. Uzamış olan spermatidler en sonunda tübül lümenine sperm olarak salınmaktadır (10). Bu işlem sonunda; superoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil (OH), peroksil ( $RO_2$ ), hidroperoksil ( $HO_2$ ), NO ve nitrojen dioksit ( $NO_2$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen ürünlerinin

(RNS) üretimine bağlı olarak seminer tübül içerisinde dokunun yeniden yapılanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (23). Kontrol edilmediği takdirde bu serbest radikaller hücre hasarına ve hatta hücre ölümüne (nekroz) neden olabilmektedir. ROS ve RNS'nin yaşlanma, infertilite, kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli şartlardaki patofizyolojisi vurgulanmaktadır (24).



**Şekil 6.** Antioksidan Sistem (24)

Oksidanların üretimleri, aynı zamanda ROS olarak da tanımlanır. Toksik etkilerinden dolayı, özellikle yüksek konsantrasyonlarda spermin kalite ve fonksiyonunu etkilemektedir ve erkek üreme sistemi konusunda kaygılar uyandırmaktadır (25). ROS'lar yüksek oksidasyon potansiyellerinden dolayı, serbest radikaller grubunda yer alır (23). Şu bir gerçektir ki, tüm hücreler oksijensiz ortamda yaşam faaliyetlerini devam ettirmektedir, fakat sperm hücreleri oksijene ihtiyaç duyar. Ne zaman ki oksidanlar, antioksidanlardan fazla miktarda salınmakta, o zaman oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (Şekil 6). Bununla birlikte peroksidasyon ürünlerinin artması ile birlikte patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır (24). Diğer taraftan, çok düşük orandaki ROS, sperm fonksiyonlarının düzenlenmesi için (sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, fertilizasyon gibi) gerekmektedir (9, 26, 27). Semendeki aşırı ROS üretimi, antioksidan mekanizmasını devre dışı bırakmakta ve bu durumda spermatozoa ve seminal plazmada oksidatif stresin oluşmasına sebep olmaktadır (28). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, %25 ile %40 oranındaki infertil erkeğin semen örneklerinde, yüksek oranda ROS saptanmıştır (29).

Spermatozoanın plazma membranı, çoklu doymamış yağ asitleri ve sitoplazmalarındaki tutucu enzimlerin çok az miktarda bulunmasından dolayı, ROS'ların inhibe edici mekanizmalarına karşı savunmasız kalmaktadırlar (30, 31).

### 4.3. NİTRİK OKSİT

1916'da, Mitchell ve ark. tarafından NO'nin memeli hücrelerinde salınımı keşfedildi. 1928'de, Tannenbaum ve ark. memelilerin NO sentezlediklerini doğruladı. 50 yıl sonra, Furchgott ve Zawadski 1980 yılında non prostanooid (EDRF) aracılığıyla damarın asetilkolin ile uyarılmış olduğunu kanıtladı. 1985 yılında, Stuehr ve Marletta tarafından aktif olmuş makrofajların nitrit /nitrat sentezlediği bildirildi. 1987 yılında ise, Hibbs ve ark. L-arginine'nin nitrit/nitratın bir substratı olduğunu yayınladı. Ayrıca, 1987'de Palmer ve Ignarro, birbirlerinden habersiz olarak; NO'nin bir EDRF olduğunu kanıtladı. Bir yıl sonra, Palmer ve ark. 1988'de NO'nin L-arginine'den sentezlendiğini yayınladı, Marletta ve ark. (1988) ise makrofajların, nitrit/nitratı L-arginin'den oluşturduğunu ortaya koydu. Aynı yıl içerisinde Garthwaite ve ark. tarafından (1988) NO'nin beyinde de sentezlendiği ileri sürüldü. 1988-1992, yılları arası, bilim alanındaki gelişmeler ile birlikte, NO'nin fonksiyonları ve görevleri ile ilgili pek çok ilerleme kaydedildi. 1992 yılında ise, D.E Koshland tarafından, NO 'Yılın Molekülü' ilan edildi (5).

NO, insan vücudundaki birçok fizyolojik olayda rol alıyor olmasından dolayı, hiç tartışmasız biyomedikal bilimlerdeki en önemli moleküllerden biridir (3).

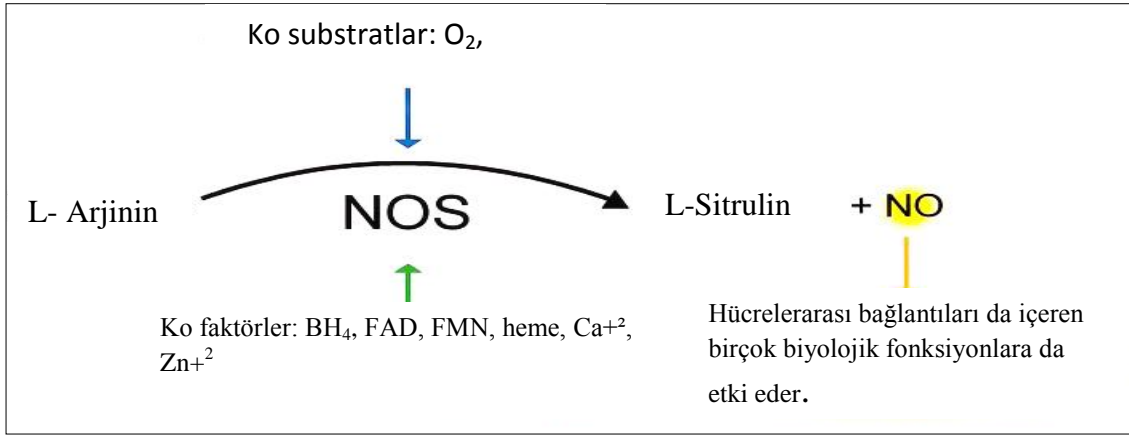
NO, hücre içi ve dışında düzenleyici rolü üstlenen küçük, reaktif bir serbest radikal molekülüdür. Serbest oksijen radikallerinden biri olan NO, vücuttaki birçok hücreden (endotel, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlar) salınmaktadır (1, 4).

Bu basit molekül vücuttaki birçok hayati fonksiyonda rol almaktadır; transkripsiyon işleminde aktive edici faktör olarak, mRNA translasyonunda, Fe (demir) metabolizmasında, mutasyonda, apoptozisde, glikoliz ve mitokondrial elektron transportunda, deoksiniükleotid sentezinde, miyoblastların füzyonunda, nötrofil ve trombositlerin adezyonunda, mide kontraksiyonlarında, uterus ve kalpte, penis ereksiyonunda, toksisite de, bellekte, kan basıncının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (5).

Bununla birlikte, aşırı miktarda NO üretimi, doku tahribatına sebep olabilir; artrit, glomerülonefrit, diabetes, felç, septik şok, boğmaca öksürüğü, viral ve otoimmün beyin iltihabı, ve ülser oluşumunda etkin olabilir (32).

#### 4.3.1. Nitrik Oksit Sentezlenmesi

NO, L- arjininden'den nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenir (Şekil 7). Bu reaksiyona değişik kofaktörler (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat NADPH, flavin monolükleotid FMN, flavin adenin dinükleotid FAD, tetrahidrobiopterin, kalmodulin ve kalsiyum gibi) eşlik etmektedir. Ayrıca, oksijen molekülü bu reaksiyonda rol oynar ve N-hidroksiarjinin sentezinde L-sitrulin ve NO oluşur (5).



Şekil 7. NO sentez mekanizması (8).

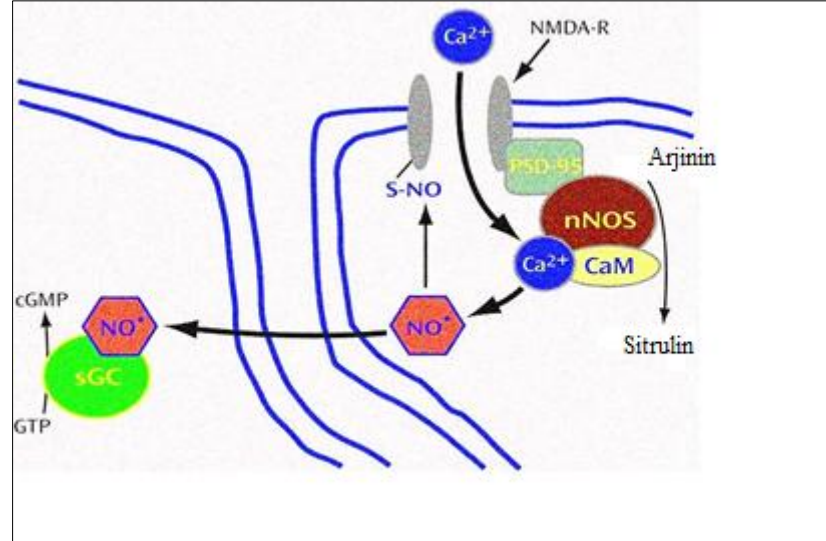
#### 4.3.2. Nitrik Oksit İzofomları

Bu izoenzimler %60 aminoasit yapısındadırlar. Yarı ömrü 2-5 saniye arasındadır. Hızla Nitrit (NO<sub>2</sub>) ve Nitrata ( NO<sub>3</sub> ) okside olur. NOS izoenzimleri, üreme sistemindeki gibi, birçok dokuda da varolan NO biyosentezi için gereklidirler (5, 6). İnsanda eNOS, nNOS, ve iNOS kodlayan genler 7, 12 ve 17. kromozomlarda lokalize olmuş durumdadırlar (4).



#### 4.3.2.1. Nöral NOS (nNOS ,bNOS veya NOS-1)

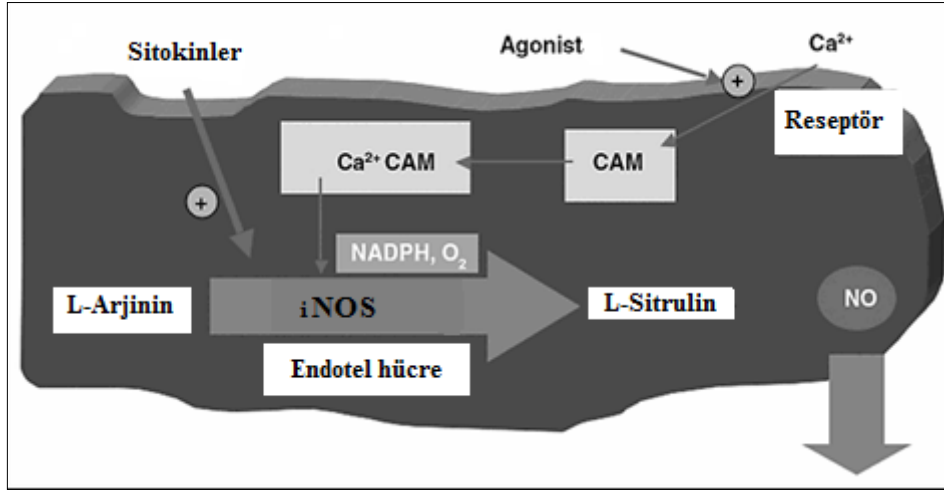
Santral ve periferik sinir sisteminde aktiftir (Şekil 8).  $Ca^{+2}$  ve kalmodulin bağımlı bir enzimdir. Bunun etkisiyle az miktarda da olsa sürekli NO sentezlenir. İskelet kasında, NOS1 proteininin büyük bir kısmı, membran ile kaynaşmış durumdadır (7).



**Şekil 8.** Santral ve periferik sinir sisteminde nNOS aktiftir. Oluşan NO, nörotransmisyon ve hafıza oluşumunda görevlidir (33).

#### 4.3.2.2. İndüklenebilir NOS (iNOS veya NOS-2)

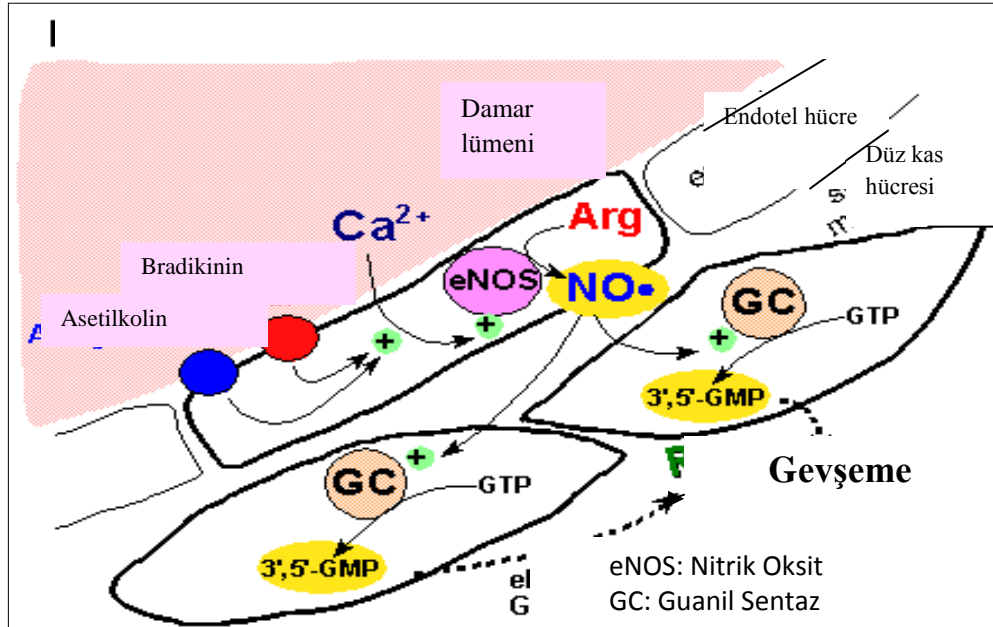
Makrofaj, miyosit, düz kas hücreleri, ve hepatositler de  $NO^-$  üretimini katalizler. İlk olarak, kemirgenlerin makrofajı tarafından izole edilmiştir.  $Ca^{+2}$  bağımlı olmayan izoform çeşididir (Şekil 9). Alveolar makrofajlar bazen NOS2 immünoreaktif olarak gözlenmektedir. Birçok farklı fizyolojik olayda da ( hamilelik, menstrüasyon, doğum gibi ) rol oynamaktadır (7).



**Şekil 9.** Ca<sup>2+</sup> bağımlı olmayan indüklenebilir NOS (iNOS) (7).

#### 4.3.2.3. Endotelial NOS (eNOS veya NOS-3)

Ca<sup>2+</sup> bağımlı bir izoformdur. Endotelial yüzeyde aktiftir. eNOS, arteriyal duvarda, birçok dokudaki venöz hücrede lokalizedir (Şekil 10). İnsan plasentasındaki trofoblast hücrelerinde immün reaktiftir. Böbrek tübüllerindeki epitelyum hücrelerinde bulunmaktadır (7).

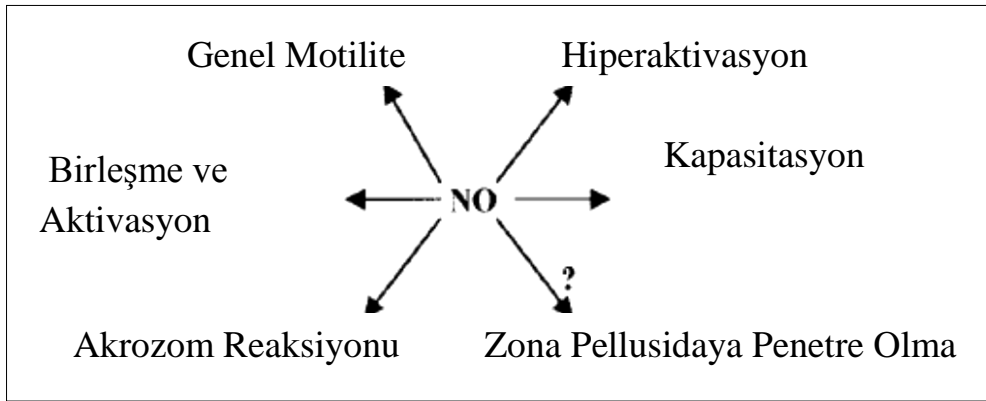


**Şekil 10.** eNOS aracılıklı NO ile, vasküler sistemin düz kas hücrelerinin gevşemesi (34).

#### 4.4 ERKEK İNFERTİLİTESİ VE NİTRİK OKSİT İLE İLİŞKİSİ

İnfertilite, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen, bir yılı aşan süre sonunda çocuk sahibi olamama durumudur. Evli çiftlerde yaklaşık olarak %10-15 oranında infertilite görülmektedir (1). Bu çiftlerin de yaklaşık %50'sinde erkek üreme sistemi disfonksiyonuna rastlanmaktadır (35). Son 15-20 yıldır gonadlar ve sperm fonksiyonları üzerine yapılan çalışmalar erkek infertilitesinin önemini anlamamıza yol açmaktadır (2). Sperm fonksiyonlarındaki hasar idiyopatik erkek infertilitesinin en sık nedenlerinden birisidir ve tedavisi zordur. Sperm fonksiyon bozukluğu ve idiyopatik erkek infertilitesine çevresel, fizyolojik ve genetik pek çok faktör neden olabilmektedir (1, 3).

NO, erkek ürogenital sisteminin çeşitli fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlayan serbest bir radikaldir (Şekil 11). Nöronlar, endotel ve üreme sisteminin epitelyum hücreleri tarafından üretilir. NO penil ereksiyonunu, sperm motilitesini, canlılığını ve metabolizmasını düzenlemektedir (36, 37, 38).



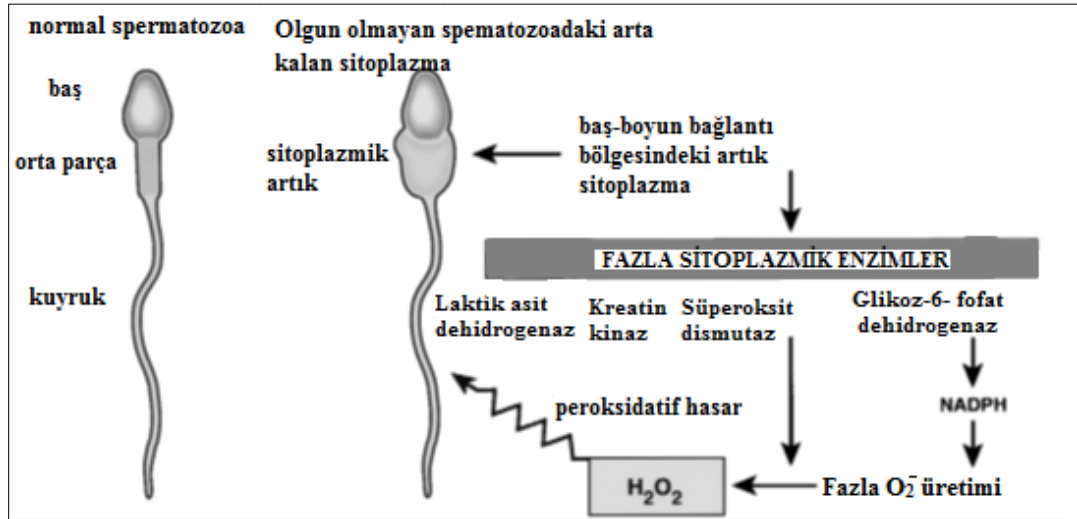
Şekil 11. Nitrik Oksitin birçok sperm fonksiyonunda rolü vardır (6).

İlk olarak 1990'da, Ignarro ve ark. tarafından tavşan korpus kavernozumdan izole edilmiş şeritlere elektriksel uyarının NO'nin endojen oluşumunu ve salınımını teşvik ettiği gösterildi. Bu gözleme dayanarak penil ereksiyonunun nonadrenerjik, nonkolinerjik nörotransmitterlere cevap olarak oluşturulmuş NO tarafından gerçekleştiği düşünüldü. Daha sonra Holmsquist ve ark. 1999'da arjinin/NO yolunun tavşanlarda penil ereksiyonunu teşvik ettiğini *in vivo* olarak gösterdi. Bu bulguları takiben NO düzenlenmesi ve penil ereksiyonu düzenleyen mekanizmalar yoğun bir şekilde araştırma

konusu olmaktadır. NO aktivitesi, sıçan korpora kavernozaı innerve eden nöronlarda, penil arterlerin adventisyal tabakalarındaki nöral pleksuslarında lokalize olmaktadır. NO, erektil fonksiyon için fizyolojik bir mediyatördür (5, 39).

#### 4.4.1. ROS'un Spermatozoa Tarafından Üretilmesi

Düşük konsantrasyonda  $H_2O_2$  ile inkübe edilen sperm hücrelerinin; sperm kapasitasyonunu uyardığı, hiperaktivasyona neden olduğu, akrozom reaksiyonunu oluşturduğu ve oosit birleşmesinde olumlu bir yönde etkili olduğu kanıtlandı (28, 37).  $H_2O_2$ 'den başka reaktif oksijen olarak; NO ve  $O_2$ 'nin de aynı şekilde sperm kapasitasyonunu ve akrozom reaksiyonunu destekledikleri gösterildi (40, 41).



**Şekil 12.** ROS' un immatür spermatozoa tarafından üretilmesi (iri sitoplazmik artığa sahip spermatozoa).  $H_2O_2$ , NADPH,  $O_2^-$  ( süperoksit anyon) (28).

Kapasitasyonun ilk evrelerinde, intrasellüler bölgedeki kalsiyum oranı artmaya başlar. Bununla birlikte ROS'ların üretimi başlar, siklik adenzin monofosfat (cAMP) konsantrasyonu artar ve böylece spermatozoa daha hareketli bir forma dönüşür. Bu duruma hiperaktivasyon formu denir. Spermatozoanın oosite ulaşması ile birlikte, progesteronun etkisi altında, ekstrasellüler kalsiyum ani bir şekilde, spermin baş kısmında bulunan akrozomal bölgeye akın eder. Sonuç olarak, spermatozoa akrozom reaksiyonunu geçirmek ve oositi fertilize etmek üzere hazır duruma gelir.

İnsan semeni, ROS'ların ürünlerini, peroksidaz-oksidadif lökositleri ve morfolojik olarak anormal spermatozoaları ihtiva etmektedir. Her semendeki birçok sperm hücresi, oksidadif hasara uğramaktadır ve beraberinde birçok fonksiyonunu kaybetmektedir (42). Bu hasarın sebebi olarak, sadece ROS'ları sorumlu tutmamak gerekir (Şekil 12). Oksijen konsantrasyonu, sıcaklık, iyon içeriği, proteinler ve ROS tutucular gibi faktörler de etkili olmaktadır (28, 42).

#### **4.4.2. Yüksek Konsantrasyonda NO**

NO'un hücre konsantrasyonu  $1\mu\text{M}$ 'den yüksek olduğunda, baskın olan NO ya da superoksit radikaller, DNA deaminasyonu, oksidasyonu veya nitrasyonunu içeren etkilere aracılık etmektedir. Böylece NO'nun etkileri yüksek konsantrasyonlarda çoğunlukla öldürücü olmaktadır (6, 8, 40).

#### **4.4.3. Düşük Konsantrasyonda NO**

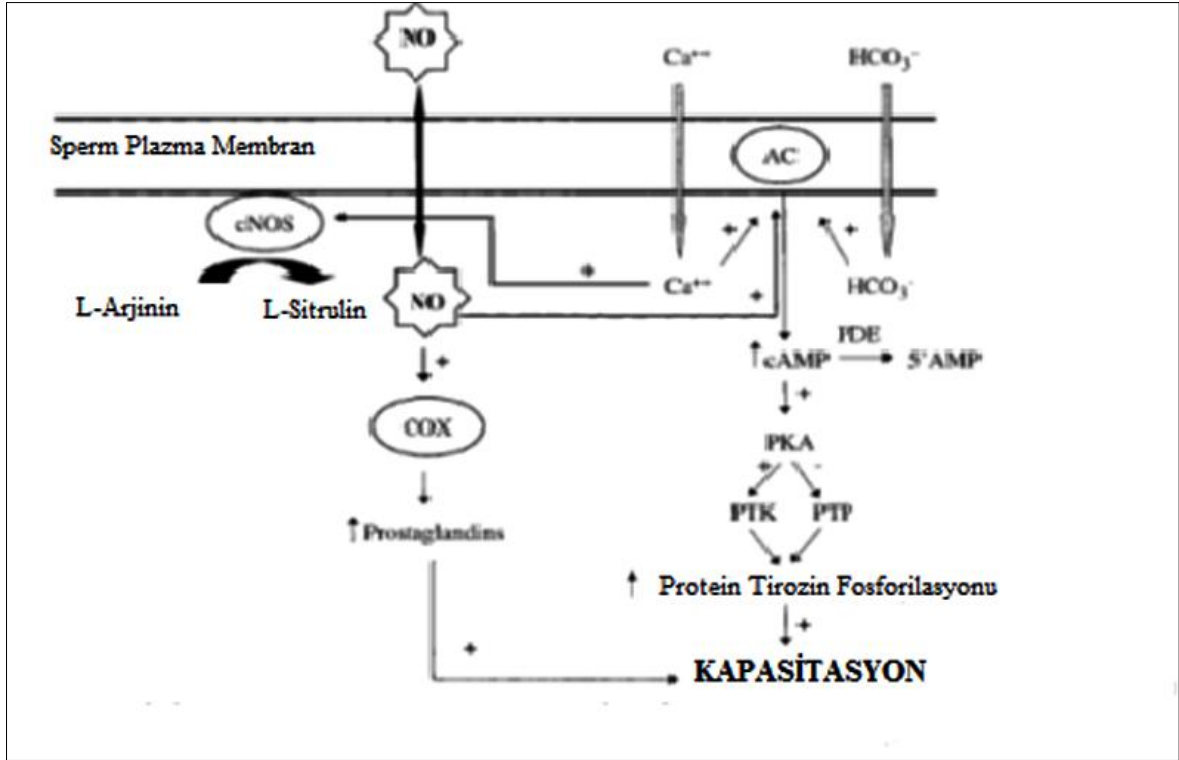
Yüksek konsantrasyonlardaki NO'in dolaylı etkilerinin aksine, konsantrasyonu  $1\mu\text{M}$  dan daha az olan NO,  $\text{O}_2$  veya superoksit radikalleri ile doğrudan etkilidir. Örneğin, NO, sGC ile siklik nükleotid kapı kanalları ve cGMP-düzenleyici fosfodiesteraz (PDE) protein kinaz G (PKG) 'yi aktive eden cGMP'yi sentezler (6, 8, 40).

#### **4.4.4. Sperm Kapasitasyonu**

İnsan spermatozoası, ejakülasyondan hemen sonra, doğal şartlarda fertilizasyon yeteneğine sahip değildir. Oositleri fertilize edebilmeleri için olgunlaşma sürecini tamamlamaları gerekmektedir (13). Kapasitasyon olarak tanımlanan bu olgu 50 yıldan daha fazla bir süre önce, hem Austin ve ark. (43) hem de Chang ve ark. (17) tarafından ilk olarak tanımlanmıştır. Motil spermatozoa, kadın genital sisteminde servikal mukus içerisinde aktif olarak ilerlerken kendisini seminal plazma ve immotil spermatozoadan ayırmaktadır (13). Bu ileri yönde hızlı ilerleyiş, çok hızlı bir şekilde ilerleyen spermatozoanın seçimini ve kapasitasyonunu tamamlamasını sağlamaktadır (44).

NO'nun ilk olarak kapasitasyon olayında yer almasının deneysel olarak kanıtlanması, onun insan spermatozoasında düşük konsantrasyonda inkübe edilmesi ve lizofosfatidilkolin ile akrozom reaksiyonunda ölçülmesi ile gözlemlendi (9). Bunun yanında, NO bileşiklerinin salınımı (Sodyum Nitroprusid ve dietilamin-NONOate) ile birlikte, kapasitasyon olayının ciddi bir ivme kazandığı ve akrozom olayında da rol aldığı saptandı (14, 41, 45, 46). Kapasitasyon işlem hızı, NO bileşiklerine göre farklılık göstermektedir. Sodyum Nitroprusid, NO'nun çok ani (3-10 sn) bir şekilde salınmasını sağlar. Dietilamin-NONOate (Dietilamin Nitrik Oksit Kompleksi) ise NO'nun çok daha uzun sürede (15-30dk) salınmasını sağlar. Böylece, NO'nun kısa bir süre içerisinde, gerçekleştirmesi gereken işlemleri sağlaması mümkün olmaktadır. Belki de diğer birçok sistemde olduğu gibi NO salgılatıcı bileşenler (SNP ve Dietilamin-NONOate), olaylar zincirini başlatarak, cAMP yolunu kullanıp sperm kapasitasyonuna neden olmaktadır (6, 47). Bununla birlikte, inkübasyonun başlangıç safhasında eklenen NOS inhibitörlerinin, kapasitasyon sürecinde ciddi oranda ivme kaybına neden olduğu gözlemlenmiştir (6, 40). Spermatozoanın kapasitasyonunu tamamlayıp, fertilizasyon yeteneğini tamamiyle kazanması için, belli bir oranda endojen NO'ya ihtiyaç duymaktadır (14).

NO'nun, sperm kapasitasyonundaki bir diğer önemli noktası ise, tirozin fosforilasyonunun değişik basamaklarında yer alan iki sperm proteindir (p81 ve p105). Kapasitasyonda hızlandırıcı etkiye sahip, NO bileşiklerinin salınımı ile birlikte, tirozin-fosforilasyonunda artış gözlemlenmektedir. Kapasitasyon olayında inhibitör etkiye sahip L-NAME'nin devreye girmesiyle birlikte, tirozin-fosforilasyonu ve bu iki sperm protein oranlarında azalma gözlemlenmektedir. Bu yüzden tirozin-fosforilasyonu ve burada yer alan bu iki sperm proteinin, NO tarafından düzenlendiği açıkça görülmektedir. Bir diğer önemli nokta ise, bu iki sperm proteinin  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  tarafından düzenleniyor olmasıdır. Böylece, tirozin fosforilasyonunun en az 2 protein tarafından düzenlendiği aşıkardır. Bu iki protein de 3 farklı ROS tarafından etkilenmekte ve sperm kapasitasyon olayının ne kadar değişken dengelerde düzenlendiğini göstermektedir (6, 14, 40).



**Şekil 13.** NO'nun kapasitasyon olayında yer aldığı transdüksiyon sinyal yolu şeması. Memeli spermatozoasının kapasitasyon boyunca, nitrik oksit stimülasyonu, cNOS (eNOS ve nNOS) tarafından aktive edilmektedir. İlk olarak,  $Ca^{2+}$ , membrandan içeriye ani bir şekilde girer ve cNOS'u aktive eder. NO üretiminin artmasıyla dolaylı veya dolaysız olarak sperm, adenil siklaz'ı (AC) ve cAMP oranını artırır. Ayrıca NO, prostoglandin üretiminin artmasına neden olan COX (siklooksijenaz)'u aktive eder. Kapasitasyon sırasında, NO, yağları transforme eder veya siklik nükleotid fosfodiesteraz (PDEs), protein tirozin kinaz (PTKs), fosfataz (PTPs) gibi enzimleri düzenler. Bu enzimlerin oksidasyona karşı duyarlılığı vardır (6).

#### 4.4.5 Sperm Motilitesi

NO'nin salgıladığı bileşikler, sperm motilitesini ve canlılığını etkilemektedir (6). Düşük konsantrasyondaki NO, sperm motilite ve canlılığını devam ettirmesi açısından faydalıdır (9). Ancak yüksek konsantrasyondaki NO salınımı, sperm motilitesini inhibe etmektedir (6, 48).

ROS'lar ve yüksek konsantrasyonda NO'nin, motilite üzerindeki olumsuz etkisi, ardışık olaylar sonucunda, protein fosforilasyondaki azalma olarak açıklanabilir. Sonuç

olarak sperm hücresi' immobilizasyon'a uğrar (49). Bir başka hipotezde ise,  $H_2O_2$  sperm membranından geçerek, hücre içerisine nüfuz eder ve G6PDH gibi enzimlerin işleyişini baskılamaktadır. Bu da NADPH'n hücre içerisindeki konsantrasyonunu azaltmaktadır. Beraberinde okside glutatyonun birikmesine ve azalmış glutatyona sebep olur. Bu olaylar sonucunda sperm antioksidanların savunması ciddi oranda azalmaktadır (28, 41, 42,).



## **5. MATERİYAL VE YÖNTEM**

### **5.1. HASTA GRUPLARI**

Bu çalışmaya infertilite merkezine başvurmuş olan yaşları 24-44 arasında değişen Normospermi (sayı 20 milyon/ml ve üzeri, motilite %50 ve üzeri, n=20), Oligospermi (20 milyon/ml ve altı, motilite %50 ve üzeri, n=20) ve Astenospermi (20 milyon/ml ve üzeri motilite %30 ve altı, n=20) olmak üzere 3 grup semen örneği dahil edildi.

### **5.2. SEMEN TOPLANMASI**

Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle kliniğe gelen hastalardan, hastanın adının, soyadının yazılı olduğu steril kaplara, mastürbasyon yöntemi ile alındı. Semen alındığı saat not edildi. Oda ısısında yarım saat likefiye olması için bekletildi. Turnusol kağıdı ile pH (7.2-8.0) değerlendirmesi yapıldı. Cinsel perhiz süresi, vizkosite (normal), hacim (2-6ml.), renk (opak) ve hastaya özel likefaksiyon zamanı (30 dk.) kaydedildi. Mililitredeki sperm sayısını belirlemek üzere, Makler sayma kamarasına (Counting Chamber Makler, Sefi Medikal Instruments, İsrail) küçük bir damla semen örneği konuldu. Toplam sperm sayısı ve progresif hareketli ve immotil sperm sayısı ile motilite değerlendirmesi yapıldı (16).

Sperm konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi için standart manuel teknikler uygulandı. Motilite ve konsantrasyon ışık mikroskopunda X20 büyütmede WHO (World Health Organization) kriterlerine göre en az 100 sperm sayılarak yapıldı. Makler sayma kamarasına (Makler Chamber ,Sefi Medikal Instr.İsrail) 10µl semen koyularak ve X20 büyütme altında 10 kare sayılarak konsantrasyon ve motilite belirlendi (16).

Morfolojik skorlama için lam üzerine yayılarak hazırlanan semen preparatları Spermac boyama yöntemi ile boyandı. Morfoloji, faz kontrast mikroskopta, X100 büyütmede Kruger kriterlerine göre değerlendirildi.

### **5.3. SPERM BOYAMA VE MORFOLOJİ DEĞERLENDİRMESİ**

Morfolojik değerlendirme için bir lama bir damla semen örneğinden damlatıldı. Damlatılan semenin miktarını sperm sayısına bağlı olarak ayarlandı. İkinci bir lam aracılığı ile bu damlayı slayt üzerine yayılıp hava ile kurutuldu. İstenilen boyama, Spermac boyama (Ferti Pro NV, Industriepark Noord, Belçika) yöntemi ile boyandı.

Lam üzerine yayılıp kurutulan preparatlar, fiksatif solüsyonunda 10 dk. bekletildi. Fiksatif su ile arandıktan sonra suyu süzülerek A,B,C (Ferti Pro NV, Industriepark Noord, Belçika) solüsyonlarından 1,5 dk. olacak şekilde sırayla boyama işlemi yapıldı. Kuruması için beklendi. İmmersiyon yağı kullanılarak x100 büyütmede incelendi. Morfoloji değerlendirmesi yaparken 100 sperm dikkate alındı. Her anomali ayrı ayrı not edildi.

### **5.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA**

Viskoz bir yapıda olan semen örneklerini, parafin takibi yapabilmemiz amacı ile 'collection fluid' maddesi ile homojen bir şekilde muamele edildi. Santrifüj işlemi sonrası, dip kısmındaki (semen+collection fluid) pellet, kasetlere (Cytoblock Kit, Thermo Scientific, Amerika) hapsedildi (sandviç modeli). Bir saatlik fiksasyon sonrası (% 4'lük paraformaldehit), alkol serilerinden geçirildi (dehidratasyon) ve parafine gömme işlemi uygulandı. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında alınan kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirildi. Sitrat tamponu (pH 6.0) (Lab Vision AP-9003-500) içerisinde mikrodalgada 10 dakika tutularak antijen iyileştirilmesi yapılan kesitler, 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda % 0.3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'de endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 10 dakika tutulduktan sonra, distile suyla çalkalanıp fosfat tamponu (PBS)'na (pH 7.2) alındı. Daha sonra, oda sıcaklığında 5 dakika Ultra V blok (Lab vision, TA-60-UB) uygulandı. Kesitler, eNOS (eNOS rabbit Pab Neomarker, RB-1711-P) ve iNOS (iNOS rabbit Pab Neomarker, RB-1605-P) antikolarında, +4 °C'de bir gece tutuldu. Antikorlar, Ultra Ab Diluent (Lab vision, TA-125-UD)'de 1:100 oranında sulandırıldı. Kesitler, PBS' de 3 kez yıkandıktan sonra, 30 dakika oda sıcaklığında, biyotinlenmiş anti-rabbit sekonder antikor

(Lab vision, TR-060-BN) ile inkübe edildi. Daha sonra PBS' de yıkandı ve peroksidaz ile işaretli streptavidin (Lab vision,TS-060-HR)'de oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için 10 dakika AEC (3-amino-9-etilkarbazol) (Lab vision, TA-004-HAC) ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkanarak, Mayer hematoksilen zıt boyaması yapıldı ve gliserol jelatin ile kapatıldı. Dokudaki NOS reaksiyonunun dağılımı, ışık mikroskobu (Olympus Bx53, Japonya) ile incelenip, x40 büyütmede fotoğrafları çekildi.

## **5.5. NİTRİT-NİTRAT ANALİZİ**

Farklı gruplara ait seminal plazma örnekleri NO, stabil metabolitleri olan nitrit ve nitrat iyonlarının konsantrasyonlarıyla tayin edildi (Roche, Nitrik Oksit Kolorimetrik Metot, 11746081). Bu yöntemde, plazmada bulunan nitrat, nitrat redüktaz (10 U/ml), NADPH (1 mM) ve FAD (0.1 mM) varlığında nitrite indirildi. NADPH fazlası, piruvat (100 mM) ve laktat dehidrogenaz (1500 U/ml) etkinliğinde uzaklaştırılarak, ortamdaki total nitrit, Griess reaktifi (%2 sülfanilamid ve %0.2 N-naftil etilendiamin) ile reaksiyona sokuldu. Oluşan pembe renkli diazo bileşiği 550 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında (Perkin Elmer Victor/Amerika) okundu.

## **5.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için INSTAT İstatistiksel Paket Programı (Instat GraphPad Software, San Diego, CA, Amerika) kullanıldı. Sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. Grupların dağılımlarının normal dağılıma uygunluğu test edildikten sonra, deney grupları tek yönlü varyans analizi uygulanarak, Tukey'in çoklu karşılaştırma testi (Tukey's Multiple Comparison Test) ile değerlendirildi.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## **6. BULGULAR**

Çalışmamızda 60 gönüllüden alınmış olan normospermi (n=20), oligospermi (n=20) ve astenospermi (n=20) semen örneklerin immünohistokimyasal olarak eNOS ve iNOS izoformları değerlendirmeye alındı. Bununla birlikte farklı gruplara ait seminal plazmadaki nitrit/nitrat konsantrasyonları hesaplandı.

### **6.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR**

Donörlardan alınarak hazırlanan normospermi, oligospermi, astenospermi gruplarına ait sperm örneklerinden elde edilen kesitler, ışık mikroskopuyla incelendiğinde, boyanması açısından incelendiğinde eNOS ve iNOS reaksiyonunun olduğu gözlemlendi.

O'Bryan ve ark.'ının (1998) (50) yapmış olduğu sınıflandırmaya dayanarak immünohistokimya incelemelerimiz 4 tip sınıflandırma şeklinde belirlendi.

Tip I: soluk postakrozomal ve ekvatoryal boyanma

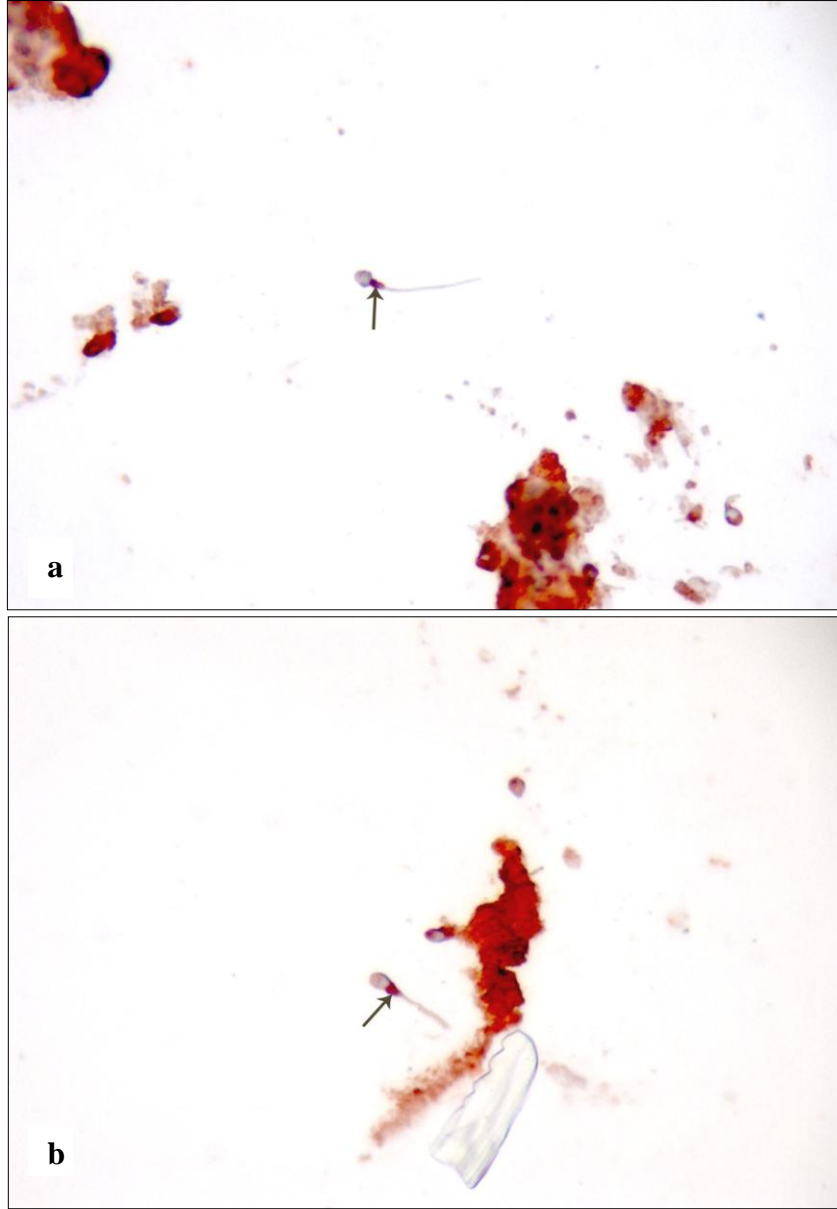
Tip II: yoğun postakrozomal ve ekvatoryal boyanma

Tip III: sperm baş boyanması

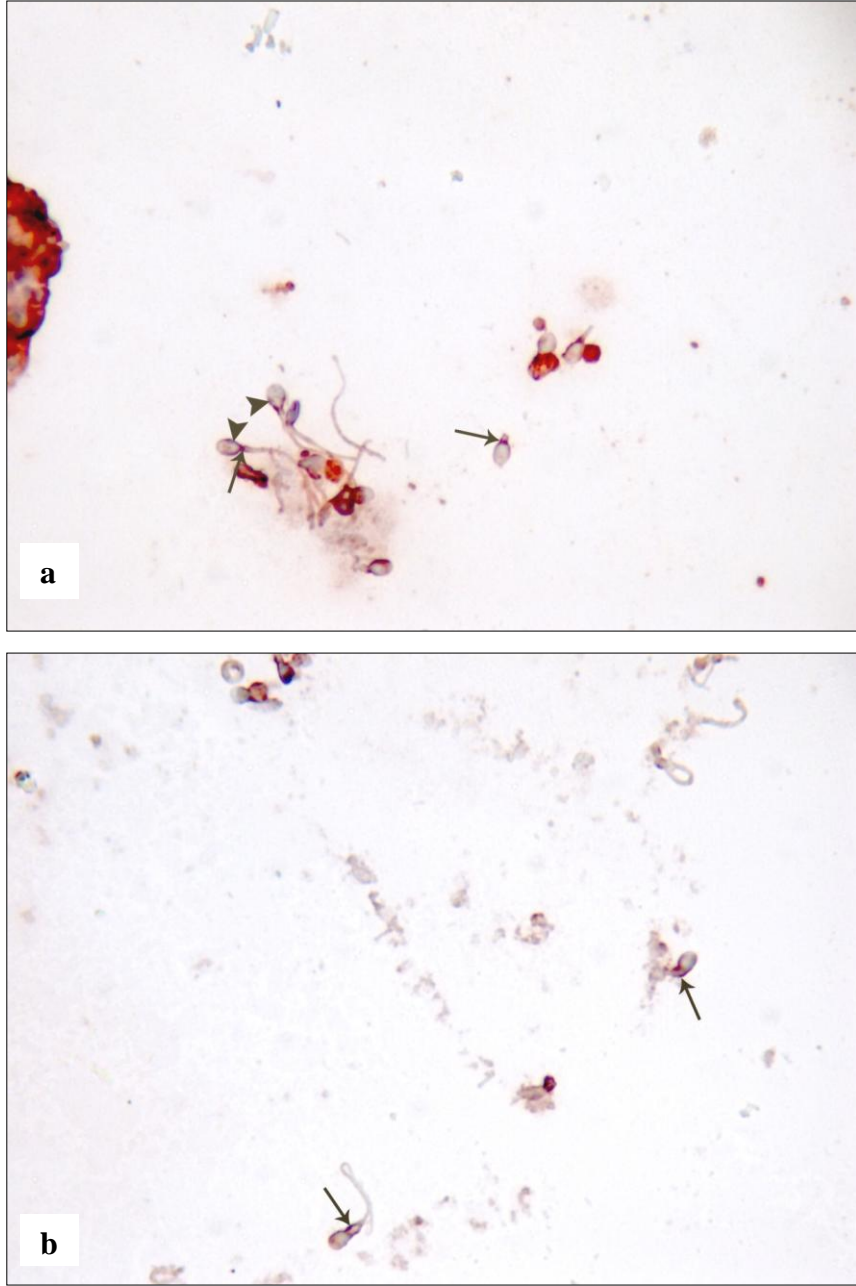
Tip IV: sperm orta parça (boyun) boyanması (baş boyanmış ya da boyanmamış)

#### **6.1.1. eNOS Değerlendirmesi**

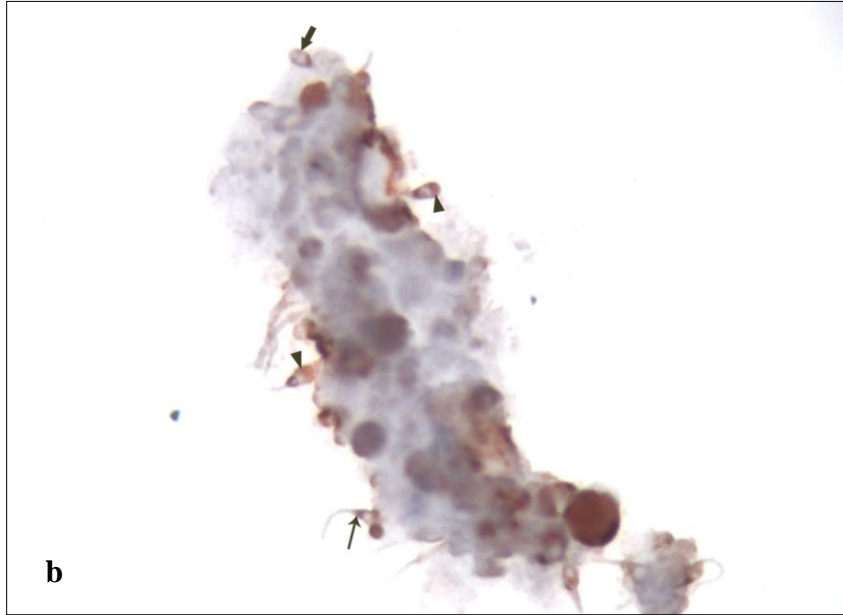
Normospermik bireylerden elde edilen kesitlerde spermatozoolarda eNOS'un reaksiyonunun baş ve boyun bölgesinde belirgin ya da güçlü olduğu görüldü (Şekil 1a-b) (Tip IV). Bununla birlikte baş membranının bir kısmında (Şekil 2a-b), ekvatoryal kısmının bazı bölgelerinde ve akrozomda zayıf eNOS reaksiyonu seçilmekteydi (Şekil 3a-b) (Tip I ve Tip IV).



**Şekil 1a-b:** Normospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoanın boyun bölgesinde (→) (Tip IV) eNOS reaksiyonu. x400.

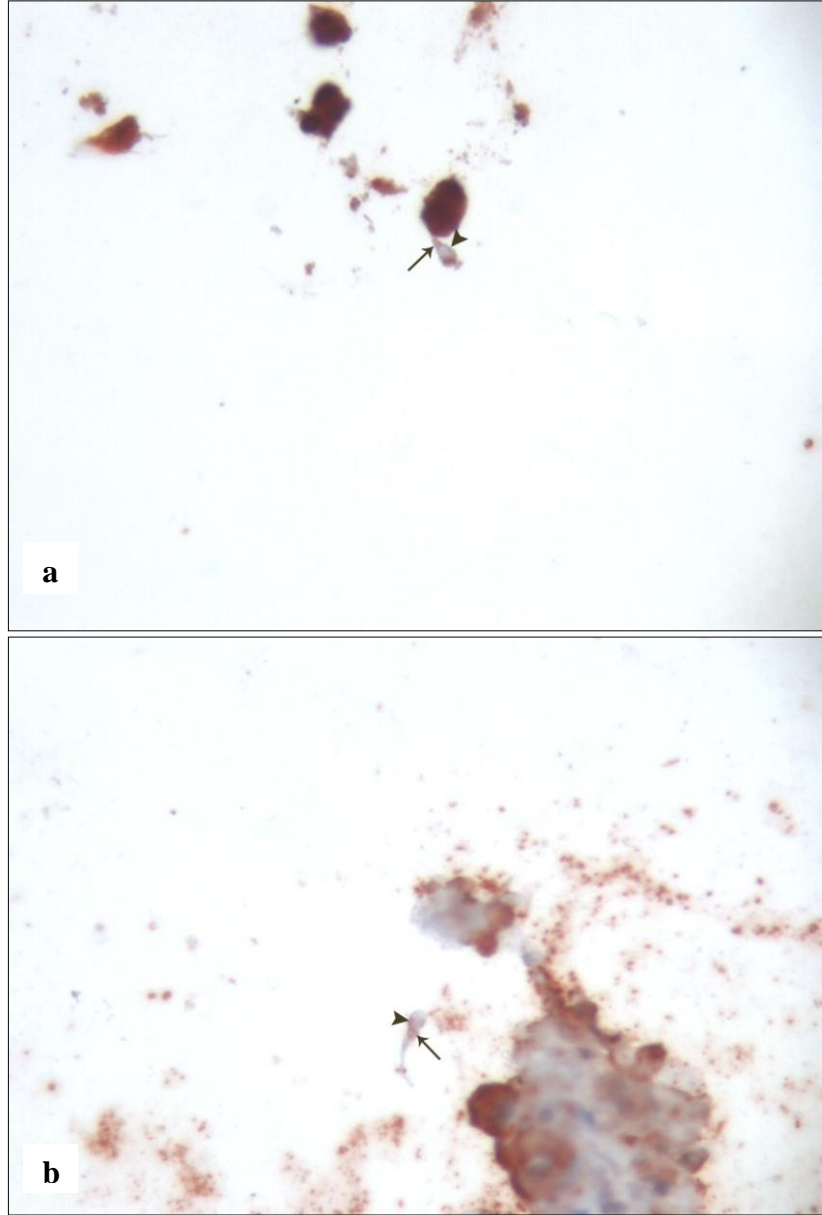


**Şekil 2a-b:** Normospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoanın boyun bölgesi (→) ile baş membranının bir kısmında (➤) (Tip IV) eNOS reaksiyonu. x400.



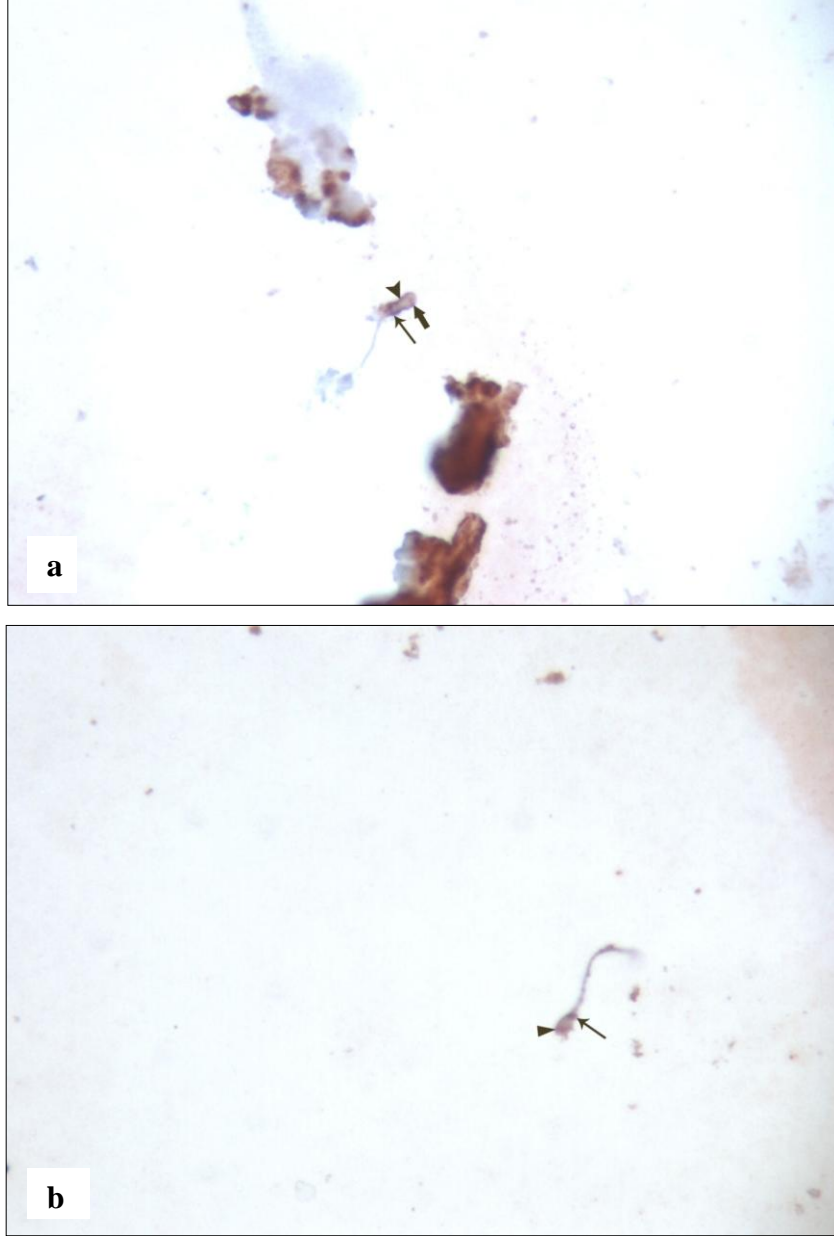
**Şekil 3a-b:** Normospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoanın boyun bölgesinde (→) (Tip IV), ekvatoriyal bölgede (➤) ve akrozomda (▶) (Tip I) eNOS reaksiyonu. x400.

Oligospermik bireylerden elde edilen kesitlerde spermatozoolarda eNOS reaksiyonunun normospermi gruba göre tüm sperm bazında azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil4a-b) (azalmış Tip IV reak.). Spermin ekvatoryal düzleminde ve baş membranının bir kısmında ve akrozomda reaksiyon olduğu tespit edildi (Şekil5a-b) (azalmış Tip IV ve Tip I).



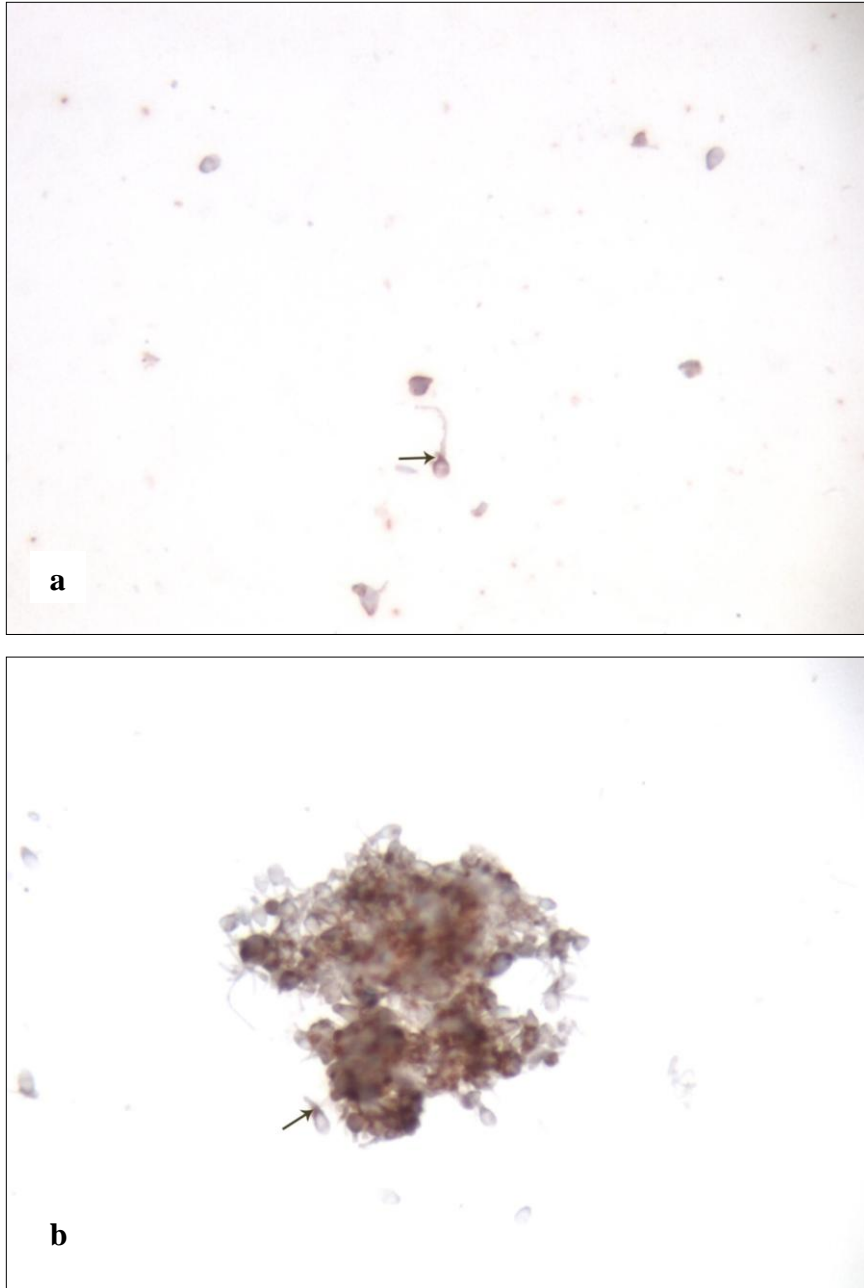
**Şekil 4a-b:** Oligospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoanın boyun bölgesinde (→) ve baş membranının bir kısmında (➤) (azalmış Tip IV) eNOS reaksiyonu. x400.



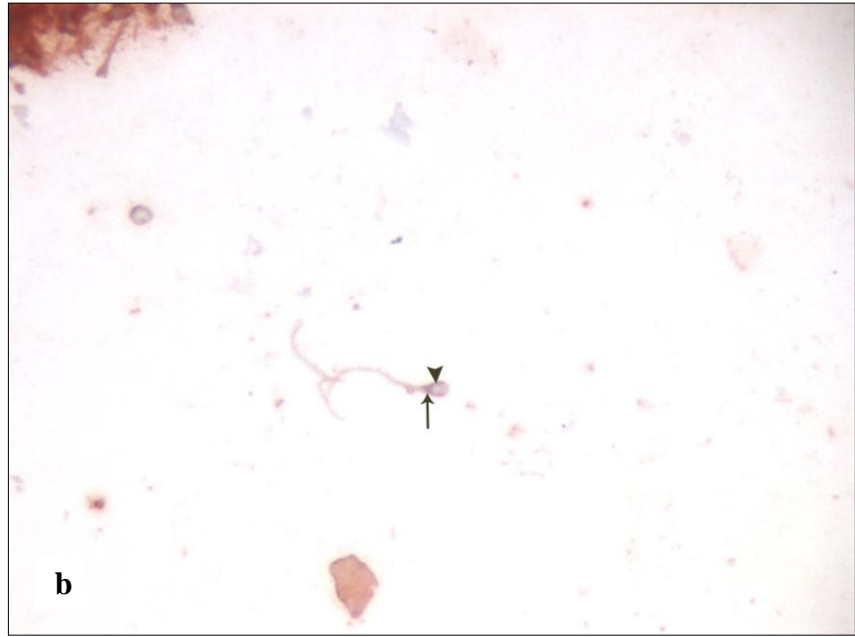
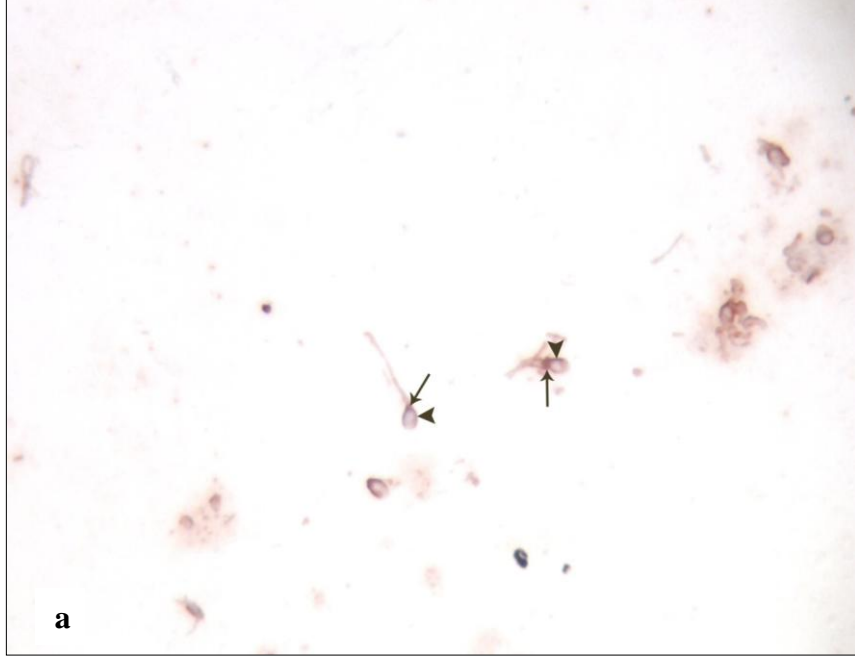


**Şekil 5a-b:** Oligospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoanın boyun bölgesinde (→), ekvatoriyal bölgede (▴), baş membranının bir kısmında (▶) ve akrozomda (▴) (azalmış Tip IV ve Tip I) eNOS reaksiyonu (→) x400.

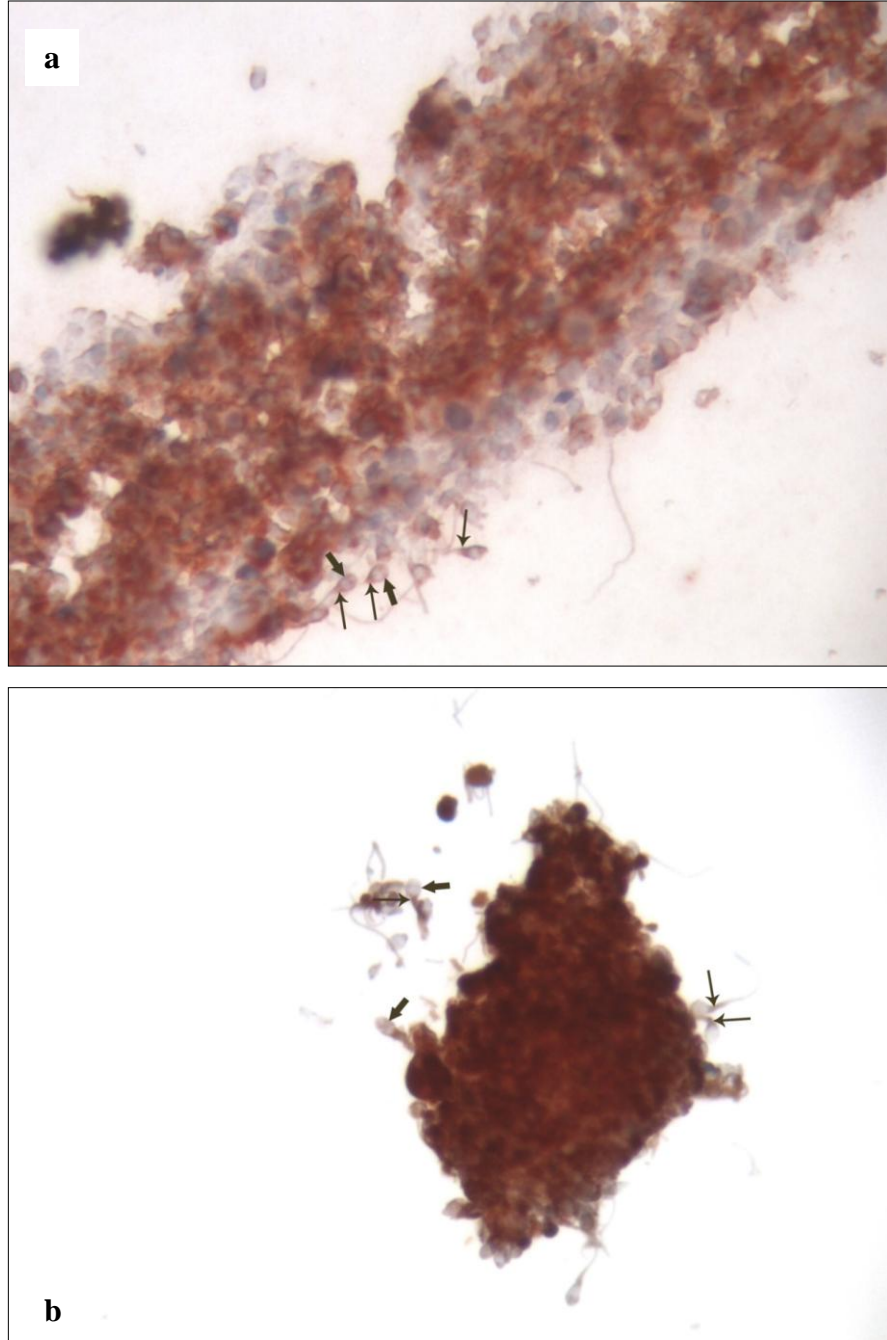
Astenospermik örneklerin eNOS antikoru ile boyanmasında, spermatozoolarda normospermi grubuna kıyasla, boyun bölgesinde (Şekil 6a-b) (azalmış Tip IV) ve baş membran kısmında ve (Şekil 7a-b) ekvatoryal bölgede azalmış bir reaksiyon gözlemlendi (Şekil 8a-b) (azalmış Tip I).



**Şekil 6a-b:** Astenospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoonun boyun bölgesinde (→)(azalmış Tip IV) eNOS reaksiyonu. x400.



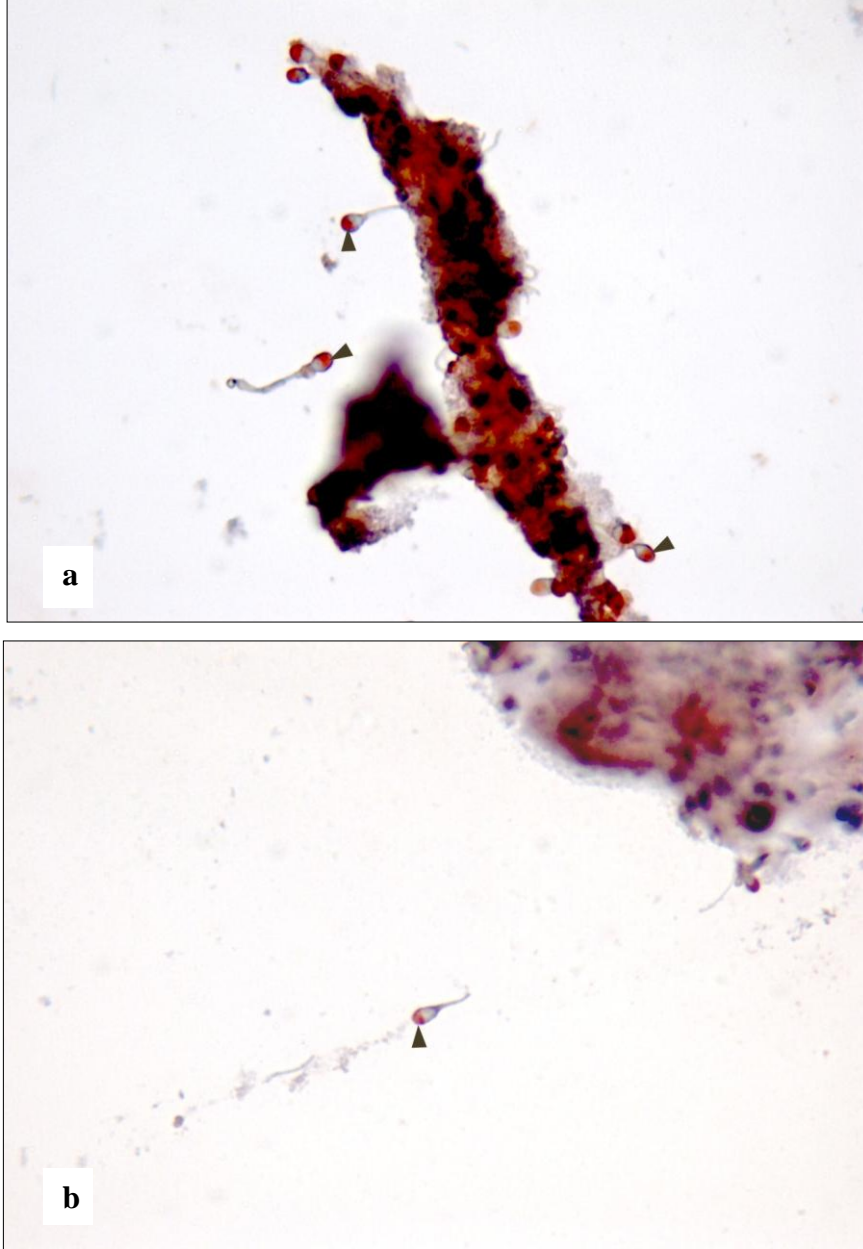
**Şekil 7a-b:** Astenospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoonun boyun bölgesinde (→) ve baş membranının bir kısmında (▶)(azalmış Tip IV) eNOS reaksiyonu. x400.



**Şekil 8a-b:** Astenospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoonun boyun bölgesinde (→) ve ekvatoriyal bölgede (▴)(azalmış Tip I) eNOS reaksiyonu. x400.

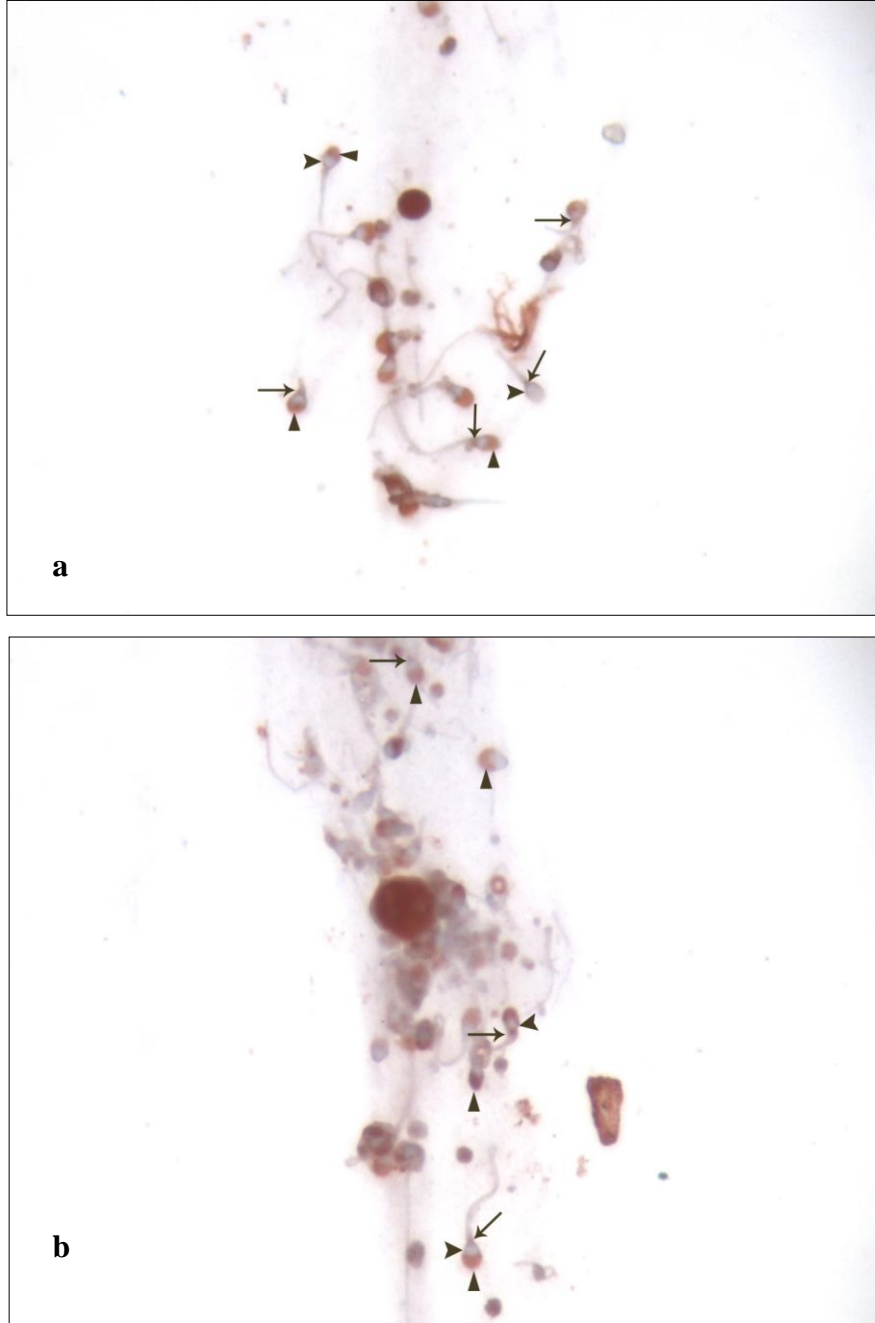
### 6.1.2. iNOS Değerlendirmesi

Normospermik iNOS örnekleri incelendiğinde, akrozom kısmında çok yoğun bir iNOS reaksiyonu gözlemlendi (Şekil 9a-b) (Tip II).



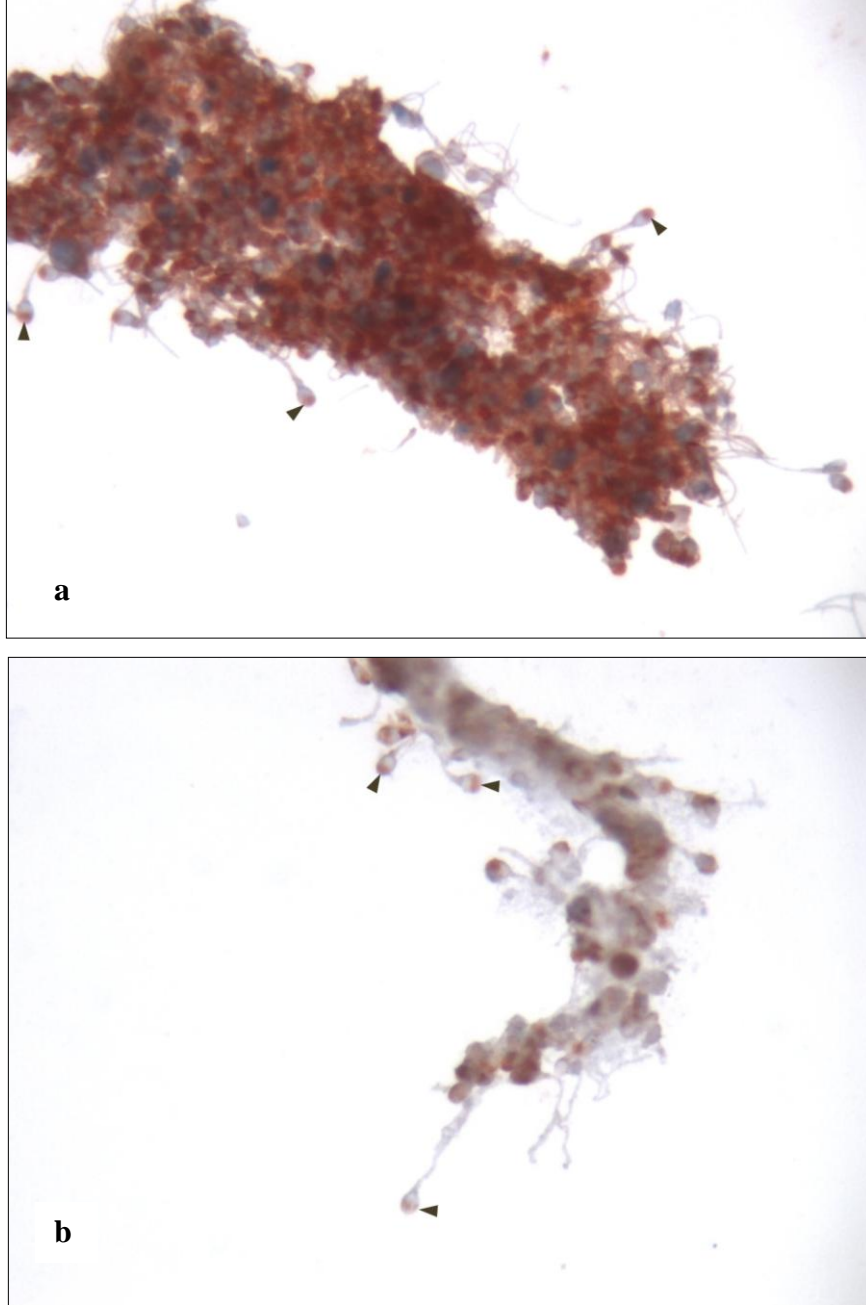
**Şekil 9a-b:** Normospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoonun akrozomun (►) (Tip II) iNOS reaksiyonu. x400.

Oligospermi olgularına ait kesitlerin iNOS antikoruna ile boyanmasında, spermin akrozom bölgesinde yoğun boyanma (Tip II) gözlemlendi. Ayrıca yoğun olmamakla birlikte boyun kısmı ve baş membranının bir kısmında da reaksiyon gösterildi (Şekil 10a-b) (Tip IV).

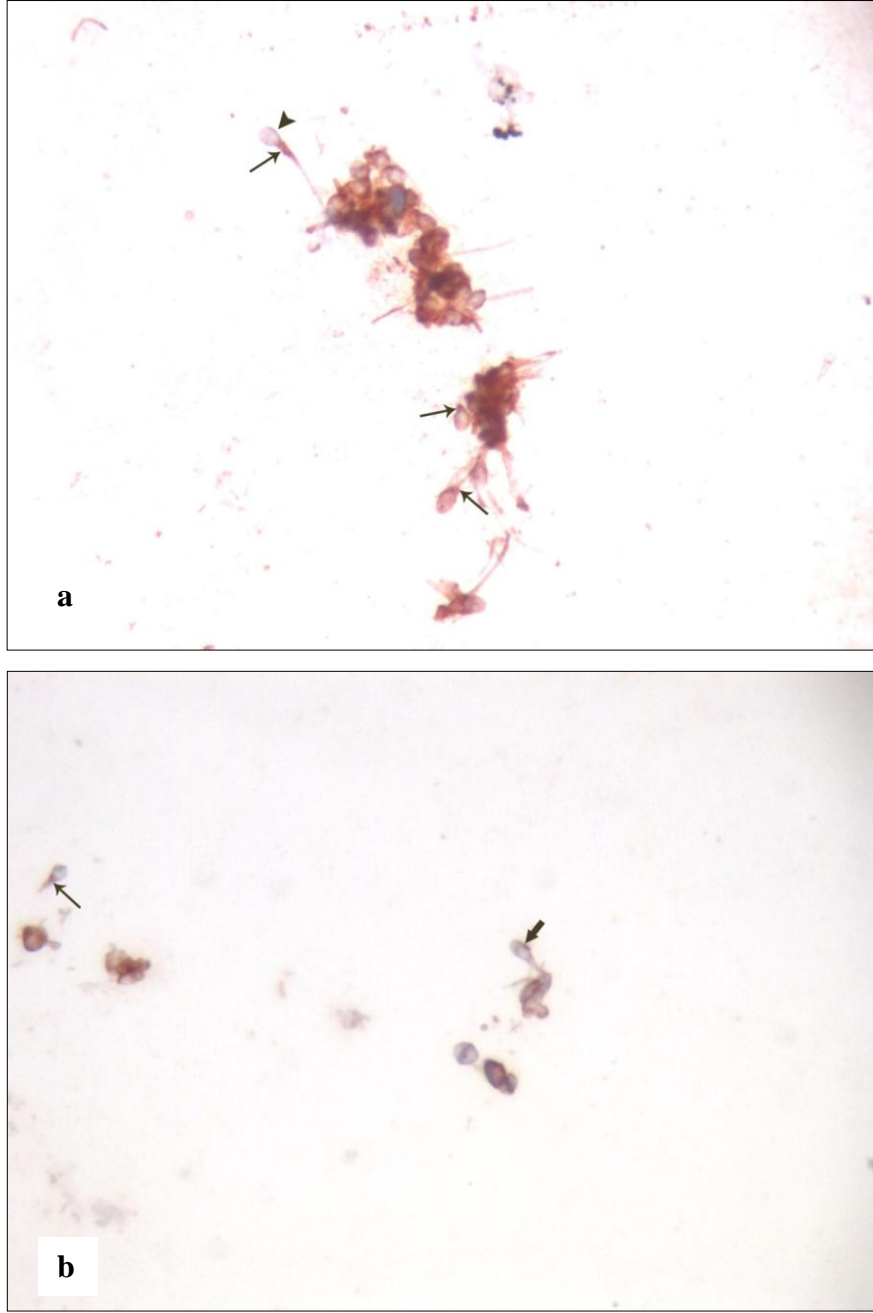


**Şekil 10a-b:** Oligospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoanın akrozomunda (▶)(Tip II), boyun bölgesinde (→) ve baş membranının bir kısmında (▶) (Tip IV) iNOS reaksiyonu. x400

Astenospermi gruplarından elde edilen kesitlerde, akrozomda yoğun iNOS reaksiyonu tespit edildi (Şekil 11a-b) (Tip II). Spermatozoa baş membranının bir kısmında, boyun bölgesinde ve ekvatoryal bölgede reaksiyon gözlemlendi (Şekil 12a-b) (Tip IV).



**Şekil 11a-b:** Astenospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoonun akrozomunda (►) (Tip II) iNOS reaksiyonu (→). x400.



**Şekil 12a-b:** Astenospermik olgulardan elde edilen kesitlerde spermatozoonun boyun bölgesinde (→) ve baş membranının bir kısmında (▶) (Tip IV) iNOS reaksiyonu. x400.

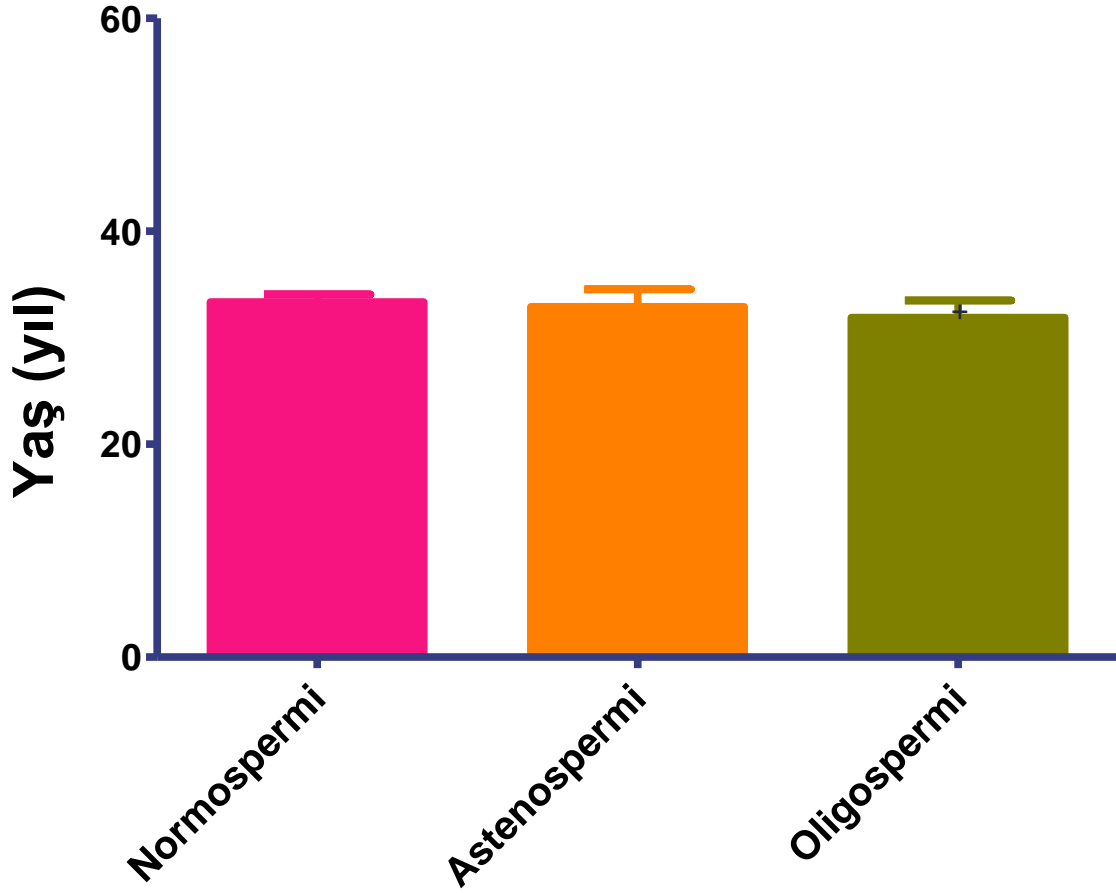


## 6.2. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Normospermi, oligospermi ve astenospermi gruplarından elde edilen yaş verileri ve nitrit/nitrat konsantrasyon oranları istatistiksel olarak değerlendirildi.

### 6.2.1. Yaş Değerlendirmesi

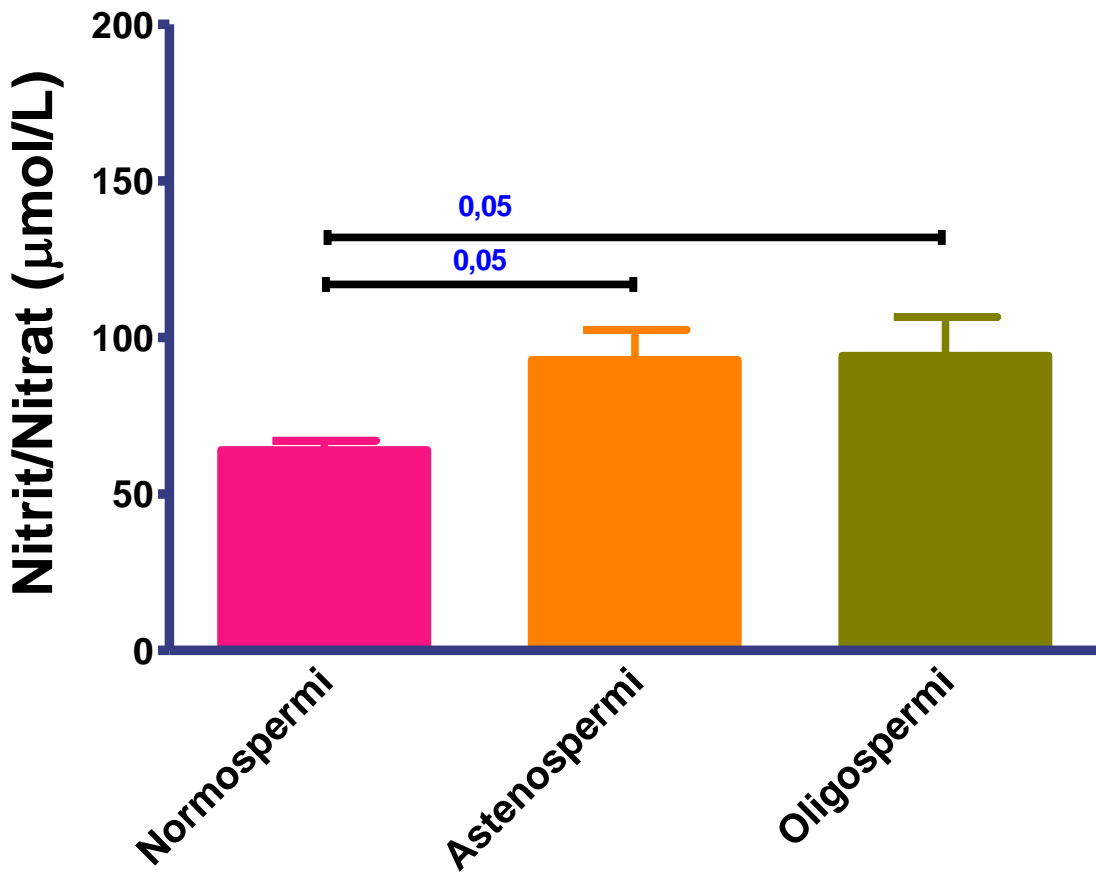
Normospermi, oligospermi ve astenospermi grupları yaş aralıkları açısından karşılaştırıldığında normospermi ( $33\pm0.71$ ), oligospermi ( $32\pm1.60$ ) ve astenospermi ( $32\pm1.64$ ) grupları arasında anlamlı fark bulunmadı (Grafik 1).



Grafik 1: Normospermi, oligospermi ve astenospermi grupları arasında istatistiksel analiz yapılmış yaş grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

## 6.2.2. Nitrit / Nitrat Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi

Normospermi, oligospermi ve astenospermi grupları nitrit/nitrat değerleri açısından karşılaştırıldığında astenospermi grubunda nitrit/nitrat değerleri ( $79.7 \pm 9.68$ ), normospermi grubuna ( $64.5 \pm 2.97$ ) kıyasla anlamlı olarak artmış bulundu ( $p < 0.05$ ). Oligospermi grubunda da ( $95.6 \pm 12.37$ ) normospermi grubu ( $64.5 \pm 2.97$ ) ile kıyaslandığında nitrit/nitrat değerlerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Astenospermi ve oligospermi grupları arasında nitrit/nitrat değerleri açısından fark bulunamadı (Grafik 2).



Grafik 2: Normospermi, oligospermi ve astenospermi grupları arasında istatistiksel analiz yapılmış nitrit/nitrat değerleri grafiği. \*:  $p < 0,05$ , +:  $p < 0,05$  normospermi grubuyla kıyaslandı.

## 7. TARTIŞMA

İnfertilite, en az bir yıl korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalınamaması durumu olarak tanımlanır. Genelde gebeliğin başarısızlığı, dişi bireyden kaynaklanan faktörlere bağlı olduğu düşünülmele birlikte aslında, erkek genital fonksiyonunun da en az %50 oranında etkili olduğu görülmektedir (1).

Sperm fonksiyonuna bağlı olan infertilitede birçok çevresel, fizyolojik ve genetik faktörler rol oynamaktadır. Erkek infertilite için bazı belirli sebepler olmasına rağmen 'idiyopatik (açıklanamayan) infertilite' terimi halen geçerliliğini korumaktadır. Açıklanamayan infertilite üzerine yapılan çeşitli çalışmalar, erkeklerin fertilitate potansiyelinde oksidatif stresin etkisinin olduğunu ortaya çıkarmıştır (3, 24, 28). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda NO'nin fertilizasyonda rolü olduğuna dair pek çok araştırma vardır (5, 6, 38, 41). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, NO'nin sentezinden sorumlu olan üç izoform arasından eNOS ve iNOS'un, normospermi, oligospermi ve astenospermi olgularında, sperm fonksiyonunda ve fertilizasyon yeteneğinde farklı rollere sahip olabileceğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

NO, birçok fizyolojik sistemlerde sinyal yollarındaki önemli fonksiyonel rollerinden dolayı büyük önem kazanmıştır (23). NOS enziminin, insan ve fare spermatozoasının kuyruk ve akrozom bölgesinde lokalize olduğu bilinmektedir (4, 14, 51). Lewis ve arkadaşları (1996) yapmış oldukları çalışma ile , eNOS ve nNOS'un insan spermatozoasındaki varlığını tespit etmişler ve otokrin bir şekilde sperm motilitesi üzerindeki düzenleyici etkisini kanıtlamışlardır (52). NO'nin salgılatıcı bileşenlerinin olması spermatozoanın folliküler sıvıya erken cevap oluşturması açısından önemlidir (38). Aynı şekilde NOS inhibitörleri de akrozom reaksiyonlarının yüzdesini azaltmaktadır (37, 46, 53). Ayrıca NO, sperm proteinlerinin tirozin fosforilasyonu olayını düzenlemektedir (6, 14, 27). Bunun sonucu olarak, sperm kapasitasyonu ve tirozin fosforilasyonu arasında NO ile ilişkili bir bağın olduğu düşünülmektedir.

Garg ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, spermdeki NOS aktivitesinin ve NO üretiminin, insan sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu tamamlayabilmesi için gerekli olduğu savunulmuştur (54). Bununla birlikte, tam olarak aydınlanmayan nokta NOS'un kapasitasyon sırasında nasıl aktive olduğudur. Varsayımlar ise, NOS'un, bir yapısal izoform (cNOS) olduğu ve Ca<sup>2+</sup> tarafından kapasitasyon sırasında aktive

edildiğidir. Fakat,  $Ca^{2+}$  'un kapasitasyon regülasyonundaki ilişkisi net değildir. Açıkça görülen o ki, NOS'un spermatozoadaki işleyişi hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (14, 54).

Biz de çalışmamızda normospermik donörlerden elde edilen örneklerde, immunohistokimyasal olarak eNOS reaksiyonunun baş, boyun ve ekvatoryal kısmının bazı bölgelerinde olduğunu belirledik. eNOS'a ek olarak iNOS reaksiyonunun da, spermin baş kısmında lokalize olduğunu tespit ettik. Şu ana kadar yapılan çalışmalar, genellikle eNOS'un insan sperminin fertilizasyon sürecindeki rolü üzerine odaklanmıştır (39, 50, 52, 55, 56). Biz de benzer şekilde, eNOS varlığına ek olarak iNOS'un var olduğunu ve fonksiyonel rolünün olabileceğini ve NO'in sperm fonksiyonunda etkili olduğunu bulgularımızla destekledik.

Sperm fonksiyonunun ve spermatogenez sürecinin bozulması, erkek infertilitesinin oluşumunda en önemli etkenlerdir (1, 56). Anormal sperm işleyişini tespit ve tedavi etmek, zorlu bir süreçtir. Erkek infertilitesine sebep olan ve tam olarak fonksiyonu açıklanamayan faktörlerden birisi de NO'dir ve sperm patolojisinde rol oynamaktadır (6). NO, birçok dokuda fizyolojik hücre sinyal mekanizmalarını etkilemektedir. Ancak çok fazla miktarda sentezlenmesi ROS'nin artmasına, dolayısıyla oksidatif strese neden olmaktadır (42, 57, 58). Oksidatif stres, hücre, doku ve organ hasarına neden olmaktadır. ROS, türüne, konsantrasyonuna, yerine ve ne kadar süre ile etkili olduğuna bağlı olarak sperm fonksiyonu üzerinde hem zararlı ve hem de yararlı etkilere sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, erkek genital sisteminde ROS üretiminin yüksek seviyelerde olması halinde sperm kalitesi ve fonksiyonu üzerindeki potansiyel etkilerinden dolayı ilgi odağı haline gelmiştir (42). Yüksek NO konsantrasyonunun sperm motilitesi, canlılığı, *in vitro* koşullardaki metabolik olaylar üzerine negatif etkisi gösterilmiştir (59, 60, 61). İnsan spermlerinde yapılan çalışmalarda, NO sentezi ve eNOS ekspresyonunun, normospermik örneklerde astenospermik örneklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (52). Anormal morfolojiye sahip sperm örnekleri, tutarsız bir eNOS immün boyanma sergilemektedir. Bunun yanında ciddi oranda azalmış bir motilite gözlenmektedir (50). Bu bulgular, NO'in sperm motilitesininin düzenlenmesinde parakrin rolünü işaret etmektedir (6, 14).

Yapmış olduğumuz çalışmada astenospermi donörlerden elde edilen örneklerde eNOS reaksiyonunun normospermi örneklerine göre azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu örneklerde iNOS reaksiyonunun da kontrollere göre artmış olduğu gösterilmiştir. Normal

fizyolojik olaylarda fonksiyonel olan eNOS'un azaldığı ve harekette rolü olan mitokondriyal bölgedeki iNOS'un arttığını gösteren bulgularımız, astenospermi olgularında NO'in, sperm hareketliliğini ve dolayısıyla döllenmeyi etkileyebileceğini düşündürmektedir. Spermatogenez sırasında spermatozoanın sitoplazmik artıkların birikmesi ile sonuçlanan spermatozoa anormalliği meydana geldiğinde ROS üretimi olmaktadır. ROS üretiminin 2 ana bölgesi mitokondri ve spermin plazma membranıdır (54, 57).

Bugüne kadar, insanda oligospermi olgularında immunohistokimyasal olarak eNOS ve iNOS lokalizasyonu gösteren çalışmalara rastlanmamıştır. Kruger kriterlerine göre oligospermi olarak tanımlanan bireylerden alınan örneklerde, eNOS reaksiyonunun normospermi grubuna benzer bölgelerde görüldüğü, ancak daha az olduğu belirlenmiştir. iNOS reaksiyonunda ise, spermin akrozom bölgesinde yoğun boyanma olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda astenospermi grubunda, iNOS reaksiyonu, boyun bölgesinde yoğun olarak incelenmiştir. Daha önceki çalışmaların da ışığında, mitokondri bölgesinde yoğun boyanmanın ROS üretimine bağlı olduğunu ve bunun da spermin motilitesini etkilediğini düşünmekteyiz (50, 52). Roselli M. ve arkadaşları (49), NO donörü olan S-nitroso-N-asetil penisillamin ve SNP'den köken alan NO'in insan spermatozoasının motilitesi ve canlılığı üzerine direkt etkilerini değerlendirmişlerdir. SNAP veya SNP ile saflaştırılmış spermatozoa tedavisi sperm motilitesini ileri derecede azaltmıştır (62). Aynı zamanda konsantrasyona bağlı olarak immotil spermatozoa yüzdesini arttırdığını gözlemlemişlerdir (38). Oligospermide motilitenin normal olabildiği ancak sayısal olarak bir farklılık olduğu bu sperm türünün tanımlanmasında kabul edilir bir kriter olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla oligospermide motilite probleminin olmaması ve normospermiye benzer eNOS reaksiyonu göstermesi, ayrıca astenospermide ise motilitenin düşmesine neden olabileceğini düşündüğümüz iNOS artışının boyun bölgesinde olmasına karşın oligospermide bu bölgede reaksiyonun olmaması motilitede NO'in etkili olduğunu bize düşündürmüştür.

Balercia ve ark. (63), normospermik fertil donörlerden elde edilen sperm hücrelerinin kinetik özellikleri ile semendeki NO konsantrasyonun bir ilişki halinde olduğunu göstermişlerdir. Normospermik fertil erkeklerdeki NO konsantrasyonlarının, astenospermik infertil erkeklerinkinden önemli derecede düşük olduğunu belirlemişlerdir. NO konsantrasyonu ile total sperm motilitesinin yüzdesi arasında negatif bir korelasyon

vardır. Amiri ve ark. (64), infertil erkeklerin seminal plazmadaki NO seviyelerinin fertil erkeklerden daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır. Seminal plazmadaki artan NO konsantrasyonu, sperm motilitesinde ve canlılığında azalmaya neden olmaktadır. Bu bilgiler, aşırı derecede serbest radikalın üretimini ve bunun sonucu olarak meydana gelen oksidatif strese uzun süreli maruz kalınmasının ve bunun da sperm motilitesinin azalmasında önemli patolojik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Olgularımızdan elde edilen semen örneklerinde, NO'nun son ürünü olan nitrit/nitrat değerlerine bakıldığında normospermik örneklere göre oligospermi ve astenospermilerde nitrit/nitrat konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir. Oligospermi olgularında nitrit/nitrat konsantrasyonundaki bu artış, spermatogenez sürecinde yüksek oranda ROS'a maruz kaldığını ve bu durumun da sperm sayısında şiddetli ölçüde azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir.

İnfertil erkeklerin spermelerindeki ROS kaynağının, kendi spermatozoasından mı yoksa lökositlerden mi kaynaklandığı tartışılmaktadır. Sperm disfonksiyonu, sperm Sertoli hücresinden salınımı sırasında veya kusurlu spermiyogenezden kaynaklanabilir (65). Ayrıca mevcut atılmamış sitoplazmik artıkların varlığı ile ilgili olabilir. Semendeki anormal spermatozoada olduğu gibi lökositler tarafından oluşturulan aşırı ROS, spermatozoolarda hasara yol açarak infertiliteye sebep olabilir.

Ford ve arkadaşları, lökosit kaynaklı yüksek ROS üretiminin, oligospermi ( $10 \times 10^6 > \text{ml}$ ) ve düşük sperm kalitesi ile orantılı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, çok iyi şekilde yıkanmış sperm örneklerinde düşük miktarda da olsa ROS üretiminin olduğu gözlenmiştir (66). Araştırmamızda donörlerden alınan örnekler yıkanmadan takibe alınmıştır ve gruplar içerisinde lökosit sayıları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durum da bize, gruplar arasındaki ROS üretiminin lökosit kaynaklı olmadığını düşündürmüştür.

Araştırmamızın sonuçları doğrultusunda normospermi, oligospermi ve astenospermi gruplarında yapmış olduğumuz eNOS ve iNOS immunohistokimyası bulguları ile semendeki nitrit/nitrat konsantrasyon oranlarına bakıldığında sperm motilitesi, kapasitasyonu, ve akrozom reaksiyonunda NO'nun fonksiyonel açıdan bir rolü olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca, bu süreçte nNOS'unda akrozom reaksiyonunda etkili bir faktör olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda gelecekteki çalışmalarımız nNOS'un bu mekanizmadaki rolünü aydınlatmaya yönelik olacaktır.

## 8. SONUÇ

Bu çalışmaya, infertilite merkezine başvurmuş olan yaşları 24-44 arasında değişen 60 donörden alınan seminal plazma örnekleri dahil edildi. Çalışma grubu, olarak semen örnekleri sperm morfolojisi, sayısı ve motilitesi açısından değerlendirilip normospermi (20 milyon/ml ve üzeri, motilite %50 ve üzeri), oligospermi (20 milyon/ml altı) ve astenospermi (motilite %30 ve altı) olmak üzere 3 grup oluşturuldu.

Bu gruplardan hazırlanmış olduğumuz parafin kesitlere, eNOS ve iNOS immünohistokimya işlemi uygulandı. Aynı gruplardan elde edilen semen örnekleri, nitrit/nitrat oranları ölçülerek istatistiksel olarak değerlendirildi.

Normospermik donörlerde, eNOS reaksiyonu baş, boyun ve ekvatoryal bölgelerde gözlenirken iNOS reaksiyonunun da, spermin baş (akrozom) kısmında olduğu gösterildi.

Oligospermik donörlerde, eNOS reaksiyonu, normospermi grubuna benzer bölgelerde ancak reaksiyon azalmış belirlenirken, iNOS reaksiyonu ise, akrozom bölgesinde yoğun olarak gözlemlendi.

Astenospermik donörlerde, eNOS reaksiyonu normospermi grubuna göre azalırken iNOS reaksiyonu da aynı gruba göre artmış olarak gösterildi.

Elde edilen semen örneklerinde, NO'nin son ürünü olan nitrit/nitrat değerlerine bakıldığında normospermi örneklerine kıyasla oligospermi ve astenospermi gruplarında nitrit/nitrat konsantrasyonunun arttığı belirlendi.

Sonuç olarak çalışmamızda, oligospermi ve astenospermi örneklerinde eNOS reaksiyonunun azaldığı, iNOS'un arttığı, spermelerde meydana gelen değişikliklerde NO'nin önemli rol oynadığı tespit edildi. Normospermiye göre diğer iki grupta, anormalilerine bağlı olarak eNOS ve iNOS lokalizasyonunda farklılıklar gösterildi. Özellikle astenospermide, iNOS reaksiyonunun, mitokondrilerin olduğu boyun bölgesinde yoğun olmasının harekette bir anormalliğe sebep olabileceğini düşündürdü.

İleriki çalışmalarda NO'nin spermin kapasitasyonu ve fertilizasyondaki rolünü daha iyi anlayabilmek adına diğer izoformunun da (nNOS) araştırılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam süresince, bilgi birikimini paylaşan, katkılarını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, tezimi hazırlama döneminde deneyimleri ve desteği ile her zaman yanımda olan çok sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Canan HÜRDAĞ'a,

Çalışmam da örnek teminatında elinden gelen tüm özveriyi gösteren sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL'a

Laboratuvar çalışmalarım süresince yanımda olan, yardımını ve bilgisini benimle paylaşan değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Yasemin Ersoy CANILLIOĞLU'na

Işık mikroskopik çalışmalarım da desteğini esirgemeyen Dr. Aslı KANDİL'e

Konsantrasyon ölçümlerinde, Oksante Laboratuvar ve Özel Sağlık Hizmetleri'ne tüm katkılarından dolayı, Msc. Huri DEDEAKAY'a

Malzeme, KİT teminatında, bize her türlü kolaylığı sağlayan, Kaplan Uluslararası Elektronik Mümessillik Firmasının İstanbul Bölge Müdürü Zafer TOPRAKÇI'ya

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen Enstitü sekreterimiz sevgili arkadaşım İlknur KARAOSMANOĞLU'na,

Her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini her daim hissettiren, üzerimde sonsuz bir emeğe sahip sevgili annem, sevgili babam ve ablama minnettarı borç bilirim.



## 10. KAYNAKLAR

1. Agarwal A, Allamaneni SS. Free Radicals and Male Reproduction. *J Indian Med Assoc.* 2011, 109:184-187.
2. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N. Evidence for Decreasing Quality of Semen During Past 50 Years. *Br. Med.*1992, 305: 609-613.
3. Cummins JM, Jequier AM, Kan R. Molecular Biology of Human Male Infertility: Links with Aging, Mitochondrial Genetics, and Oxidative Stress? *Mol. Rep. And Dev.* 1994, 37: 345-362.
4. Knowles RG, Moncada S. Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem.* 1994, 298: 249-258.
5. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of Nitric Oxide in the Biology, Physiology and Pathophysiology of Reproduction. *Hum Reprod Update.* 1998, 4: 3-24.
6. Herrero MB, Gagnon C. Nitric Oxide: a Novel Mediator of Sperm Function. *J Androl.* 2001, 22: 349-356.
7. Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of Nitric Oxide Synthase. Properties, Cellular Distribution and Expressional Control. *Biochem Pharmacol.* 1995, 50: 1321-1332.
8. Lee NP, Cheng CY. Nitric Oxide/Nitric Oxide Synthase, Spermatogenesis, and Tight Junction Dynamics. *Biol Reprod.* 2004, 70: 267-276.
9. Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Low Levels of Nitric Oxide Promote Human Sperm Capacitation In Vitro. *J Androl.* 1995, 16: 424-431.
10. Abraham L. Kierszenbaum. Çev. Ed. Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; 531-544.
11. Keith L. Moore. T.V.N. Persaud. İnsan Gelişiminin Başlangıcı. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Ed. Dalçık H. Yıldırım M. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi. 2009.
12. T.W.Sadler. Çev. Ed. A.Can Başaklar. Medikal Embriyoloji. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005; 26-29.
13. Green DP. Mammalian Fertilization as a Biological Machine: a Working Model for Adhesion and Fusion of Sperm and Oocyte. *Hum Reprod.* 1993, 8: 91-96.

14. Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide Regulates Human Sperm Capacitation and Protein-Tyrosine Phosphorylation *In vitro*. *Biol Reprod*. 1999, 61: 575-581.
15. Zimmerman S, Sutovsky P. The Sperm Proteasome During Sperm Capacitation and Fertilization. *J Reprod Immunol*. 2009, 83: 19-25.
16. WHO ( D nya Sağlık  rg t ) Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semeni ve Sperm-Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi.  eviri Edit r : G nalp S. Ankara, Tıp Teknik Kitapevi, 2002.
17. Chang MC. Fertilizing Capacity of Spermatozoa Deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*. 1951, 168: 697-698.
18. Rhemrev JP, Menkveld R, Roseboom TJ, van Overveld FW, Teerlink T, Lombard C, Vermeiden JP. The Acrosome Index, Radical Buffer Capacity and Number of Isolated Progressively Motile Spermatozoa Predict IVF Results. *Hum Reprod*. 2001, 16: 1885-1892.
19. Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic Variability of Sperm DNA Denaturation in Infertile Men. *Urology*. 2001, 58: 258-261.
20. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonette F, Bleau G. Sperm DNA Fragmentasyonu: Erkek İnfertilitesinde Eşik Deėer. *Hum Reprod*. 2005, 20: 3446-3451.
21. Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJ, Kremer JA. Globozoospermia Revisited. *Hum Reprod Update*. 2007, 13: 63-75.
22. Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregr n P, Freitas A, Paiva A, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. Not all Sperm are Equal: Functional Mitochondria Characterize a Subpopulation of Human Sperm with Better Fertilization Potential. *Plos One*. 2011, 6: 18112-18113.
23. Dr ge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 2002, 82: 47-95.
24. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant Superoxide Dismutase - a Review: Its Function, Regulation in the Testis, and Role in Male Fertility. *Contraception*. 2002, 65: 305-311.

25. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998, 59: 1037-1046.
26. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of Reactive Oxygen Species on Spermatozoa: a Balancing Act Between Beneficial and Detrimental Effects. *Hum Reprod.* 1995, 10: 15–21.
27. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, et al. Redox Regulation of Tyrosine Phosphorylation in Human Spermatozoa is Involved in the Control of Human Sperm Function. *J Cell.* 1995, 108: 2017–2025.
28. Agarwal A, Saleh RA. Role of Oxidants in Male Infertility: Rationale, Significance, and Treatment. *Urol Clin North Am.* 2002, 29: 817-827.
29. Sharma RK, Agarwal A. Role of Reactive Oxygen Species in Male Infertility. *Urology.* 1996, 48: 835–850.
30. Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, Koppers AJ, McLaughlin EA. Cis-unsaturated Fatty Acids Stimulate Reactive Oxygen Species Generation and Lipid Peroxidation in Human Spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91: 4154-4163.
31. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and Human Sperm Function. *Biol Reprod.* 1989, 40: 183–197.
32. Nathan C, Xie QW. Nitric Oxide Synthases: Roles, Tolls, and Controls. *Cell.* 1994, 78: 915-918.
33. Snyder SH, Ferris CD. Novel Neurotransmitters and Their Neuropsychiatric Relevance. *Am J Psychiatry.* 2000, 157: 1738-1751.
34. [www.kumc.edu/research/medicine/biochemistry/bioc800/sig02-11.htm](http://www.kumc.edu/research/medicine/biochemistry/bioc800/sig02-11.htm)
35. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular Basis of Defective Sperm Function and its Association with the Genesis of Reactive Oxygen Species by Human Spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1987, 81: 459-469.
36. McCann SM, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH. The Role of Nitric Oxide in Reproduction. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Nov;32(11):1367-79.
37. De Lamirande E, Gagnon C. Human Sperm Hyperactivation and Capacitation as Parts of an Oxidative Process. *Free Radic Biol Med.* 1993, 14: 157-166.

38. Revelli A, Soldati G, Costamagna C, Pellerey O, Aldieri E, Massobrio M, Bosia A, Ghigo D. Follicular Fluid Proteins Stimulate Nitric Oxide (NO) Synthesis in Human Sperm: A Possible Role for NO in Acrosomal Reaction. *J Cell Physiol.* 1999, 178: 85-92.
39. Fujisawa M, Yamanaka K, Tanaka H, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Sertoli Cells of Men with Infertility of Various Causes. *BJU Int.* 2001, 87: 85-88.
40. Zhang H, Zhou Q, Li X, Zhao W, Wang Y, Liu H, Li N. Ginsenoside Re Promotes Human Sperm Capacitation through Nitric Oxide-dependent Pathway. *Mol Reprod Dev.* 2007, 74: 497-501.
41. Lefièvre L, Chen Y, Conner SJ, Scott JL, Publicover SJ, Ford WC, Barratt CL. Human Spermatozoa Contain Multiple Targets for Protein S-Nitrosylation: an Alternative Mechanism of the Modulation of Sperm Function by Nitric Oxide? *Proteomics.* 2007, 7: 3066-3084.
42. Sikka SC. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Curr Med Chem.* 2001, 8: 851-862.
43. Austin CR. Observations on the Penetration of Sperm into the Mammalian Egg. *Aust J Scr Res.* 1951, 4: 581.
44. Primakoff P, Myles DG. Penetration, Adhesion, and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction. *Science.* 2002, 296: 2183-2185.
45. De Lamirande E, Lamothe G. Reactive Oxygen-Induced Reactive Oxygen Formation During Human Sperm Capacitation. *Free Radic Biol Med.* 2009, 46: 502-510.
46. Revelli A, Costamagna C, Moffa F, Aldieri E, Ochetti S, Bosia A, Massobrio M, Lindblom B, Ghigo D. Signaling Pathway of Nitric Oxide-Induced Acrosome Reaction in Human Spermatozoa. *Biol Reprod.* 2001, 64: 1708-1712.
47. Gross SS, Wolin MS. Nitric Oxide: Pathophysiological Mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 1995, 57: 737-769.
48. Aksoy Y, Ozbey I, Aksoy H, Polat O, Akçay F. Seminal Plasma Nitric Oxide Concentration in oligo- and/or Asthenozoospermic Subjects with/without Varicocele. *Arch Androl.* 2002, 48: 181-185.

49. Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ. Effects of Nitric Oxide on Human Spermatozoa: Evidence that Nitric Oxide Decreases Sperm Motility and Induces Sperm Toxicity. *Hum Reprod.* 1995, 10: 1786-1790.
50. O'Bryan MK, Zini A, Cheng CY, Schlegel PN. Human Sperm Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression: Correlation with Sperm Motility. *Fertil Steril.* 1998, 70: 1143-1147.
51. Herrero MB, Pérez Martínez S, Viggiano JM, Polak JM, de Gimeno MF. Localization by Indirect Immunofluorescence of Nitric Oxide Synthase in Mouse and Human Spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 1996, 8: 931-934.
52. Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U. Nitric oxide Synthase and Nitrite Production in Human Spermatozoa: Evidence that Endogenous Nitric Oxide is Beneficial to Sperm Motility. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2: 873-878.
53. De Jonge CJ, Han HL, Mack SR, Zaneveld LJ. Effect of Phorbol Diesters, Synthetic Diacylglycerols, and a Protein Kinase C Inhibitor on the Human Sperm Acrosome Reaction. *J Androl.* 1991, 12: 62-70.
54. Garg V, Garg S. P. Role of Nitric Oxide in Male Infertility. *J Indian Acad Forensic Med.* 2011, 33: 65-68.
55. Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, Fulton D, Black SM. eNOS Activation and NO Function: Structural Motifs Responsible for the Posttranslational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *J Endocrinol.* 2011, 210: 271-284.
56. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical Localization of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Human Testis, Epididymis, and Vas Deferens Suggests a Possible Role for Nitric Oxide in Spermatogenesis, Sperm Maturation, and Programmed Cell Death. *Biol Reprod.* 1996, 55: 935-941.
57. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Vet Med Int.* 2010, 7: 1-7.
58. Aitken R.J, Fisher H. Reactive Oxygen Species Generation and Human Spermatozoa, the Balance of Benefit and Risk. *Bioassay.* 1994, 16: 259-267.

59. Zhang H, Zheng RL. Possible Role of Nitric Oxide on Fertile and Asthenozoospermic Infertile Human Sperm Functions. *Free Radical Res.* 1996, 25: 347–354.
60. Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, Kubota Y, Sawai K, Kimura T, Shimoya K, Takemura M, Matsuzaki N, Azuma C, Saji F. Elevated Nitric Oxide Concentration in the Seminal Plasma of Infertile Males: Nitric Oxide Inhibits Sperm Motility. *Am J Reprod Immunol.* 1996, 36: 193–197.
61. Weinberg JB, Doty M, Bonaventura J, Haney AF. Nitric Oxide Inhibition of Human Sperm Motility. *Fertil Steril.* 1995, 64: 408–413.
62. Hellstrom W.J, Bell M, Wang R, Sikka S.C. Effect of Sodium Nitroprosside on Sperm Motility, Viability and Lipid Peroxidation. *Fertil Steril.* 1994, 61: 1117-1122.
63. Giancarlo B, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, Giuseppe R, Mazzanti L. Role of Nitric Oxide Concentration on Human Sperm Motility. *J Androl.* 2004, 25: 245-249.
64. Amiri I, Sheike N, Najafi R. Nitric Oxide Level in Seminal Plasma of Fertile and Infertile Males and its Correlation with Sperm Parameters. *Daru.* 2006, 14:197-202.
65. Tarín JJ, Brines J, Cano A. Long-Term Effects of Delayed Parenthood. *Hum Reprod.* 1998, 13: 2371-2376.
66. Ford WC, Whittington K, Williams AC. Reactive Oxygen Species in Human Sperm Suspensions: Production by Leukocytes and the Generation of NADPH to Protect Sperm Against their Effects. *J Androl.* 1997, 3: 44-49.