

**NORMOSPERMİK İNFERTİL ERKEKLERDE SPERM TSSK6
PROTEİNİN ARAŞTIRILMASI**

FULYA ÖZARAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi HAKAN SOYLU

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**NORMOSPERMİK İNFERTİL ERKEKLERDE SPERM TSSK6
PROTEİNİN ARAŞTIRILMASI**

FULYA ÖZARAS tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ** Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi HAKAN SOYLU
Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri
Dr. Öğr. Üyesi HAKAN SOYLU
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. MERYEM ÇAM
Arel Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi KAYIHAN KARAÇOR
Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 20/10/2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara 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.

20 Ekim 2023

Fulya Özaras

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi HAKAN SOYLU'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi KAYIHAN KARAÇOR, Doç. Dr. MEHMET ALİ SUNGUR ve Doç. Dr. ALİ YAVUZCAN hocama da şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2020.04.01.1116 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

20 Ekim 2023

Fulya ÖZARAS

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
SİMGELER	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	3
2.1. KATILIMCILAR	3
2.2. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	3
2.2.1. Onam Formu	3
2.3. VERİ TOPLAMA SÜRECİ	3
2.4. VERİ ANALİZ SÜRECİ	4
2.4.1. Semen Numune Hazırlama.....	4
2.4.2. Semen Analizi (Spermiyogram).....	4
2.4.3. İnsan Sperminde TSSK6'nın İmmüno-lokalizasyonunun İmmunofloresan ile değerlendirilmesi;.....	4
2.4.3.1. Örneklerin İmmunofloresan Boyaya için Hazırlanması	4
2.4.3.2. İmmunoflorasan Boyama	5
2.4.3.3. İstatistiksel Analiz	5
3. GENEL BİLGİLER	7
3.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ.....	7
3.1.1. Testisler	8
3.1.1.1. Testisi Saran Yapılar.....	9
3.1.2. Seminifer Tübüller	12
3.1.3. Spermatogenez.....	15
3.1.4. Spermiyogenez.....	17

3.1.5. Testis içi kanallar	19
3.1.6. Spermin Yapısı	20
3.1.6.1. Semen	21
3.2. İNFERTİLİTE VE ERKEK İNFERTİLİTESİ.....	22
3.2.1. İnfertiliteyi Etkileyen Faktörler.....	22
3.2.2. İdiyopatik erkek infertilitesi.....	22
3.2.2.1. Sigaranın Erkek İnfertilitesi Üzerine Etkisi	23
3.2.2.2. Testise Özgü Serin/Tireonin Kinaz Ailesi (TSSK)	24
3.2.2.3. TSSK6.....	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. BULGULAR.....	27
4.2. TARTIŞMA.....	35
5. SONUÇ	38
6. KAYNAKLAR.....	39
7. ÖZGEÇMİŞ	44

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Erkek üreme sistemi [22]	8
Şekil 3.2. Testisin kısmi olarak sagittal kesiti b.Seminifer tübül enine kesiti [22]	9
Şekil 3.3. Testis ve epididimisin H&E boyanmış kesiti.[23]	11
Şekil 3.4. İnsan testisinin midsagittal kesiti.[23].....	12
Şekil 3.5. Çevreleyen dokuyla birlikte seminifer tübülün bir parçası. Seminifer epitel iki tip hücre oluşturmuştur. Spermatogenik seri hücreleri ve sertoli hücreleri [28].	13
Şekil 3.6. Seminifer Tübülün enine kesiti; perifere yakın noktada spermatogonyumlar (SG), Sertoli hücreleri (SH), primer spermatositler (PS) ve lümenin yakınında geç spermatidler (GS) ve çevredeki bağ dokuda bulunan miyoid hücreler (M) ve erken spermatidler (ES), fibroblastlar (F). [29]	14
Şekil 3.7. Spermatogenez ve Spermiyogenez [29].	16
Şekil 3.8. Spermatogenez ve spermiyogenez [23].....	18
Şekil 3.9. Spermiyogenez aşamasında spermatidlerin değişimi ve matür sperm yapısı [31].	19
Şekil 3.10. Seminifer tübüller,tubuli rekti ve rete testis [29].	20
Şekil 4.1. Sigara içen ve sigara içmeyenlerde TSSK6 ekspresyonunun değişimini gösteren grafik.....	28
Şekil 4.2. İdiyopatik infertil hasta ve kontrol grubunda TSSK6 ekspresyonunun değişimini gösteren grafik.....	29
Şekil 4.3. Kontrol ve hasta gruplarında TSSK6 proteinin immüno Floresan boyanma paterninin fotoğrafları. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.	30
Şekil 4.4. Kontrol sigara içmeyen grup sperminde TSSK6 ekspresyonunun fotoğrafı. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.	31
Şekil 4.5. Kontrol sigara içen grup sperminde TSSK6 ekspresyonunun fotoğrafı. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.	32
Şekil 4.6. Hasta sigara içmeyen grup sperminde TSSK6 ekspresyonunun fotoğrafı. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.	33
Şekil 4.7. Hasta sigara içen grup sperminde TSSK6 ekspresyonunun fotoğrafı. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.	34

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. TSSK6 protein değerlerinin hasta ve kontrol grubu ile sigara içen ve içmeyen üzerindeki dağılım tablosu.....	27
--	----



KISALTMALAR

ABP	Androjen bağlayıcı protein
ATP	Adenozin trifosfat
DER	Düz endoplazmik retikulum
DIC	Diferansiyel İnterferans Kontrast
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ES	Erken spermatidler
F	Fibroblastlar
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GER	Granüler endoplazmik retikulum
GS	Genç spermatosit
H&E	Hematoksilen & Eosin
ICSI	Intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	In vitro fertilizasyon
KK	Korpora kavernoza
KS	Korpus spongiyozum
LH	Luteinleştirici hormon
M	Miyoid hücreler
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PS	Primer spermatositler
RNA	Ribo nükleik asit
RPL	Tekrarlayan gebelik kaybı
SG	Spermatogonyum
SH	Sertoli hücreleri
SNP	Tek nükleotid polimorfizm
SSC	Spermatogoniyal kök hücre
YÜT	Yardımcı üreme teknikleri
TA	Tunika albuginea
TSSK	Testise özgü serin/tireonin-protein kinazı
TSSK1	Testise özgü serin/tireonin-protein kinazı 1
TSSK2	Testise özgü serin/tireonin-protein kinazı 2
TSSK3	Testise özgü serin/tireonin-protein kinazı 3
TSSK4	Testise özgü serin/tireonin-protein kinazı 4
TSSK6	Testise özgü serin/tireonin-protein kinazı 6
WT	Vahşi tip
ZP	Zona pellisuda

SİMGELER

kDa	Kilo dalton
L	Litre
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
ml	Mililitre



ÖZET

NORMOSPERMİK İNFERTİL ERKEKLERDE SPERM TSSK6 PROTEİNİN ARAŞTIRILMASI

Fulya ÖZARAS

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi HAKAN SOYLU

Temmuz 2023, 43 sayfa

Erkek infertilitesi her geçen gün artarak devam eden sağlık sorunlarından biridir. Erkek infertilitesinin yaklaşık %30-50'si idiyopatik normospermik infertilite olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalar gözden geçirildiğinde, spermde bulunan bazı proteinlerin yokluğunun infertiliteye neden olabileceği belirlenmiştir. Testise özgü serin/treonin-protein kinaz 6 (TSSK6) proteini bunlardan biridir. TSSK6, testislerde eksprese edilen bir protein kinazdır ve erkek üreme sistemi gelişimi ve işlevi için önemlidir. Ancak normospermik infertil bireylerin sperminde TSSK6 proteini ekspresyon değişimini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle bu çalışmada normospermik infertil erkeklerde sperm TSSK6 proteininin ekspresyon değişiminin araştırılması amaçlandı. Çalışmada idiyopatik normospermik infertil 60 erkekte alınan semen örnekleri ve kontrol olarak fertil 40 erkekte alınan semen örnekleri kullanıldı. Bu amaçla kontrol grubuna daha önceden doğal yollarla çocuk sahibi olan kişiler dahil edildi. Normospermik infertil bireylerin 30'u sigara içmeyen, 30'u sigara içenlerden oluşmaktadır. Kontrol grubu olan fertil bireylerin 20'si sigara içmeyen 20'si sigara içenlerden oluşmaktadır. Alınan semen örneklerinde spermiyogram yıkama yüzdürme işlemleri yapıp immunofloresan boyama yöntemiyle boyandı ve immünofloresan mikroskopu ile çekilen görüntüleri analiz etmek için ImageJ programı kullanıldı. TSSK6 proteinin ekspresyonu sperm hücrelerinde postakrozomal bölge ve orta parçada gözlemlendi. Kontrol grubunda sigara içen birey spermlerinde TSSK6 ekspresyonu sigara içmeyenlere göre daha düşüktü ve istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p<0,001$). Benzer şekilde hasta sigara içen birey spermlerinde de TSSK6 ekspresyonu sigara içmeyenlere göre daha düşüktü. Bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p<0,001$). Hasta bireylerin TSSK6 ekspresyonu kontrole göre düşüktü ($p<0,001$). Yani idiyopatik infertilitesi olan hastalarda TSSK6 proteinin azaldığı veya baskılandığı belirlendi. Ayrıca bu çalışma ile birlikte sigara içmenin, sağlıklı bireylerde ve idiyopatik infertilitesi olan bireylerde TSSK6 ekspresyonunu daha da azalttığı veya baskıladığı belirlendi. Sonuç olarak insan sperminde TSSK6 geni ile ilişkili mutasyonlar ve TSSK6 proteinindeki değişimler erkek infertilitesinin nedeni olabileceği düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: İdiyopatik, İnfertilite, Normospermik, Sigara, TSSK6

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SPERM TSSK6 PROTEIN IN NORMOSPERMIC INFERTIL MEN

Fulya ÖZARAS

Duzce University

Graduate School, Department of HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY

Master Thesis

Advisor: Dr. Instructor Member HAKAN SOYLU

July 2023, 43 pages

Male infertility is one of the health problems that continues to increase day by day. Approximately 30-50% of male infertility is defined as idiopathic normospermic infertility. When the studies were reviewed, it was determined that the absence of some proteins in the sperm may cause infertility. The testis-specific serine/threonine-protein kinase 6 (TSSK6) protein is one of them. TSSK6 is a protein kinase expressed in the testis and is important for male reproductive system development and function. However, there was no study investigating the expression change of TSSK6 protein in the sperm of normospermic infertile individuals. Therefore, in this study, it was aimed to investigate the expression change of sperm TSSK6 protein in normospermic infertile men. In the study, semen samples from 60 idiopathic normospermic infertile men and semen samples from 40 fertile men as controls were used. For this purpose, people who previously had children naturally were included in the control group. Of the normospermic infertile individuals, 30 are non-smokers and 30 are smokers. Of the fertile individuals in the control group, 20 were non-smokers and 20 were smokers. In the semen samples taken, the spermogram was washed by flotation and stained with immunofluorescent staining method, and ImageJ program was used to analyze the images taken with the immunofluorescence microscope. Expression of TSSK6 protein was observed in the postcrosomal region and middle part of sperm cells. TSSK6 expression in the sperm of smokers in the control group was lower than in non-smokers and it was statistically significant ($p<0.001$). Similarly, TSSK6 expression was lower in the sperm of patients who smoked compared to non-smokers. This decrease was also statistically significant ($p<0.001$). TSSK6 expression of the patients was lower than the control ($p<0.001$). In other words, it was determined that TSSK6 protein was decreased or suppressed in patients with idiopathic infertility. In addition, with this study, it was determined that smoking further reduced or suppressed TSSK6 expression in healthy individuals and individuals with idiopathic infertility. In conclusion, mutations associated with the TSSK6 gene and changes in the TSSK6 protein in human sperm were thought to be the cause of male infertility.

Keywords: Idiopathic, Infertility, Normospermic, Cigarette, TSSK6

1. GİRİŞ

Günümüzde kadın ve erkek infertilitesi her geçen gün artarak devam eden sağlık sorunlarından biridir. Herhangi bir aile planlama yöntemi kullanılmamasına rağmen 1 yıllık sürede çocuk sahibi olmak isteyip olamayan çiftlerin yaklaşık %15'inde infertilite sorunu bulunmaktadır. İnfertilite sorunu olan çiftlerin %50'sinde ise sorunun temelinde erkek faktörünün rol oynadığı düşünülmektedir [1].

Erkeklerin infertil olmasında, konjenital ya da kazanılmış ürogenital bozukluklar, endokrin ya da genetik bozukluklar, immünolojik faktörler [2], cinsel yolla bulaşan enfeksiyöz ajanlar [3], çalışma ortamında kimyasallara maruz kalma ya da sürekli oturarak iş yapma (skrotal ısı artışı), iş yerinde yaşanan psikolojik stres [4], obezite [5], tedavi edilen testiküler travma, erişkin çağda kabakulak enfeksiyonu, cinsel işlev bozuklukları, kemoterapi ve radyoterapi etkili olabilmektedir [6]. Ayrıca sigara, radyasyon, ağır metal iyonları, alüminyum, flor, böcek ilaçları, aflatoksin ve organik çözücüler gibi çevresel faktörlerin de sperm üzerine zararlı etkileri olabilmektedir [7]. Erkek infertilitesinin hipogonadizm, hiperprolaktinemi, genital sistem enfeksiyonları, ejakülasyon bozuklukları, tiroid hormon bozuklukları ve varikozel gibi bilinen nedenleri, hedefe yönelik tedaviler veya cerrahi müdahaleler ile etkili bir şekilde tedavi edilebilir [8]. Ne yazık ki, bu bilinen nedenler erkek infertilitesinin yaklaşık %50-70'ini oluşturmaktadır ve geri kalanı ise idiyopatik olarak tanımlanmaktadır [9]. Etiyolojik faktörlerin belirlenemediği bu idiyopatik, nedeni açıklanamayan erkek infertilitesinin yönetimi hem klinisyen hem de çözüm arayan çiftler için zorlu bir süreçtir [8].

Sigara içmek, kardiyovasküler/solunum yolu hastalıkları ve akciğer kanseri dahil olmak üzere çok sayıda olumsuz sağlık sorunuyla ilişkilendirilmiştir [10]. Bununla birlikte, tütün bileşiklerinin deoksiribo nükleik asit (DNA) ve erkek germ hücrelerinde potansiyel hasara yol açabilme ihtimali varken, bilim camiası sigara içmenin erkek üreme sağlığı üzerindeki olumsuz etkisinden şüphelenmeye ancak son zamanlarda başlamıştır [11]. Semen analizi erkek infertilite tetkiklerinin temel taşıdır ve sonuçların yorumlanması infertil çiftlerin genel tedavisinde hayati bir rol oynar. Bununla birlikte, sigara içmenin semen parametrelerini etkileyip etkilemediğine dair kanıtlar tartışmalıdır; bazı araştırmalar erkeklerin sigara içmesi ile azalan sperm sayısı/motilitesi arasında bir ilişki

gösterirken [12], diğerleri herhangi bir ilişki bulamamıştır [13]. Semen analizinde sigara içmenin sperm konsantrasyonu üzerinde önemli ve bağımsız bir etkisi olduğu, ancak semen hacmi, sperm hareketliliği, sperm canlılığı ve sperm morfolojisi gibi diğer parametrelerin sigaradan etkilenmediği bildirilmiştir [14].

Son zamanlarda farelerde yapılan çalışmalarda spermde bulunan bazı proteinlerin yokluğunun infertiliteye neden olabileceği gösterilmiştir. Onlardan bir tanesi de testise özgü serin kinaz (TSSK) protein ailesidir ve erkek germ hücrelerinde postmayotik olarak eksprese edilir [15]. Testise özgü serin/treonin-protein kinazı 6 (TSSK6) proteinini bunlardan biridir [16]. TSSK6 (testis-spesifik serin kinaz 6), testislerde eksprese edilen bir protein kinazdır ve erkek üreme sistemi gelişimi ve işlevi için önemlidir. TSSK6 proteinini sperm DNA yoğunlaşması ve kromatinin yeniden şekillenmesinde temel bir rol olarak spermiyogenez ve işlevsel sperm üretimi için gerekli olan histon – protamin değişimine önemli katkı sağlar [17]. TSSK6 proteinini ve infertilite arasındaki ilişki, farklı çalışmalarda bildirilmiştir. TSSK6, testiste ve spermde ekspre olmaktadır. Sosnik ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sperm analizleri normal olarak kabul edilen (normosperm) ve bu sonuçlara rağmen infertil olan farelerde TSSK6'nın yokluğu dikkat çekmiştir [16]. Ancak bu farelerde spermatozoonlar normal seviyelerde spontan akromozomal reaksiyon gösterirken *in vitro* olarak yumurta ile füzyon yapamamaktadır [16]. TSSK6 proteinini eksik olan farelerin sperm üretiminde sorun yaşandığı ve infertil oldukları rapor edilmiştir [18]. TSSK6 geninin insanda bulunan bir varyantının, erkeklerde oligozoospermi (düşük sperm sayısı) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [19]. Ancak sebebi belirlenememiş, idiyopatik erkek infertilitesinde insan sperminde TSSK6 proteinini ekspresyon değişimi üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada da sigara içen ve içmeyen idiyopatik normospermik infertil erkeklerin sperminde, sperm fertilitesinde ve yumurta sperm füzyonunda önemli rol alan TSSK6 proteinin ekspresyon değişimini araştırdık.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. KATILIMCILAR

Bu çalışmada katılımcılar amaçlı örneklem ile seçilmiştir. Amaçlı örnekleme, bir araştırmada belirli bir amaca hizmet etmek üzere örneklemin belirlendiği örnekleme yöntemidir [20]. Bu doğrultuda katılımcılar şu şekilde seçilmiştir. Çalışmada, Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarına gelen idiyopatik ve normospermik infertil 60 erkekten alınan semen örnekleri kullanıldı. Kontrol grubu ise fertil 40 erkekten alınan semen örneklerinden temin edildi. Bu amaçla kontrol grubuna daha önceden doğal yollarla çocuk sahibi olan kişiler dahil edildi. Normospermik infertil bireylerin 30'u sigara içmeyen, 30'u sigara içenlerden oluşmaktadır. Kontrol grubu olan fertil bireylerin 20'si sigara içmeyen 20'si sigara içenlerden oluşmaktadır.

2.2. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

2.2.1. Onam Formu

Normospermik infertil ve kontrol grubuna dahil bireylerden semen örnekleri alınmadan önce çalışmayla ilgili gerekli bilgiler sözel olarak verildi ve detaylı bilgilendirmeyi içeren onam formları kişilere imzalatılarak yazılı izinleri de alındı.

2.3. VERİ TOPLAMA SÜRECİ

Bu çalışma Düzce Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesinde gerçekleştirildi. Hastanemizin Üroloji polikliniğine muayene olmuş ve spermiyogram testleri yapıp incelenmiş erkekler ve eşlerinin de üniversitemizin Kadın Doğum Hastalıkları polikliniğinde muayene olup gerekli testleri yapıldıktan sonra nedeni bilinmeyen infertilite tanısı almış olan erkek bireylerden çalışmamız için örnek alımı gerçekleştirildi. Bu kişiler intrauterin inseminasyon hazırlığı için androloji laboratuvarına gelen kişilerden seçildi. Kontrol grubu ise yine aynı amaçla hastanemize gelip örnek veren ancak öncesinde çocuk sahibi olan kişiler arasından seçildi. Gönüllülere onam formu bilgileri önce sözlü olarak

bildirilip sonrasında yazılı onayları alındı. Onam formunu ve anketi dolduran katılımcılar Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Androloji laboratuvarının örnek alma odasında steril bir kap içerisine örnek verdi.

2.4. VERİ ANALİZ SÜRECİ

2.4.1. Semen Numune Hazırlama

Alınan semen örneğinin oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek likefiye olması sağlandı. Spermiyogram testleri için hazırlanan semen örneği swim-up işleminden geçirilerek yıkama solüsyonuyla yüzdürme ve yıkama işlemlerinden geçirilip spermier saflaştırıldı. Yıkama yüzdürme sonuçları değerlendirilip tekrar hücre sayıları ve hareketliliği belirlendi.

2.4.2. Semen Analizi (Spermiyogram)

Semen analizi için, infertil normospermik erkek bireylerden ve fertil normospermik kontrol grubundan toplanan semen içerisindeki spermier, makler sperm sayma kamerası kullanılarak ışık mikroskobu altında 20x büyütmede sayıldı. Semen analizinde semenin fiziksel özellikleri, sperm sayısı değerlendirildi.

2.4.3. İnsan Sperminde TSSK6'nın İmmüno-lokalizasyonunun İmmünofloresan ile değerlendirilmesi;

2.4.3.1. Örneklerin İmmünofloresan Boyaya için Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan lamalar polilizin (Sigma; #25988-63-0) solüsyonunda 5 dk bekletilerek spermierin lama kolay yapışmasını sağlayan bir yüzey oluşturuldu. Havada kurutulduktan sonra +4 °C saklandı. Çalışma için uygun olan kişilerden semen toplandı. Daha sonra 1 saat içerisinde spermiyogram ve yıkama yüzdürme işlemleri yapılarak örnekler hazırlandı. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı rutin laboratuvarında öncelikle stok iyonofor hazırlandı. 0,5 ml eppendorf tüpü içerisine 95,46 µl distile su üzerine 1 µl stok kalsiyum iyonofor (Sigma, #A23187) eklenerek (95,48 mikromolar/L) vortekslenip, buz dolabında günlük kullanılmak üzere bekletildi. Yıkama yüzdürme işlemi sonucunda hazırlanmış her örnekten 192 µl çekilip 0.5 ml eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 8 µl hazırladığımız stok (5 mikromolar/L) kalsiyum iyonofordan eklenerek pipetaj yapılarak karıştırıldı. Tüplerin ağzı hava almaması için parafin oil ile kapatılarak örnekler 15 dk 37°C etüvde bekletildi. Sonrasında akrozom reaksiyonu

gerçekleşmiş olan örnekten her lama 25'er mikrolitre olacak şekilde polilizinle kaplanmış lamlara kişi isimleri ve tarihleri yazılarak damlatılıp 45 dercelik açıyla boş bir lam yardımıyla yayıldı ve havada kurutuldu. Fiksasyon için 15 dk % 99,7 metil alkolde fikse edildi ve havada kurutularak immün boyama yapılana kadar -20 °C'de bekletildi.

2.4.3.2. İmmunoflorasan Boyama

Fikse edilen örnekler -20 °C'den alındı. Öncesinde Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) hazırlandı. Bunun için 2,85 gr. Di Sodyum Hidrojen Fosfat, 16 gr. Sodyum Klorür ve 0,8 gr. Potasyum Dihidrofosfat 2 L distile su içinde çözüldü. Ph 7,2-7,4 arasında dengelendi. Hazırlanılan bu PBS ile -20 °C'den alınan örnekler 3 kez 5 dk yıkandı. % 0.1 Triton X-100 (Bio basic, 9002-93-1) PBS içerisinde çözüldü (70 ml PBS, 70 µl Triton-X). Karışımın homojen olması için balıkla iyice karıştırıldı. Sonrasında bu karışım coplin jara alınıp yaymalar hazırlanmış olan % 0.1 triton X-100 permeabilizasyon solüsyonu içerisinde 15 dk inkübe edildi. Örnekler coplin jardan çıkarılıp suları süzülür ve lamların altı spançla silindi. Bu aşamada örneklerin kurumasına izin verilmedi. Lamların üzeri hidrofobik pap pen ile sınırlandırıldı. Lamlar nem kutusuna yerleştirildi. UV blok (Thermo scientific, #TA-125-UB) lamların üzerine damlatılıp 5 dk bekletilerek bloklandı. Hemen akabinde yıkama yapmadan 1:200 dilüsyonunda TSSK6 antikoru (Bioss, #bs-9734R) nem kutusu içerisindeki lamlara damlatıldı ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda lamların üzerindeki antikor dökülüp 3 kez 5dk PBS ile yıkandı. Bu aşamada (Jackson ImmunoResearch, #111-095-003) sekonder antikor hazırlandı. 1:500 dilüsyonunda hazırlanan FITC ile işaretli sekonder antikor ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Bu aşamadan itibaren tüm işlem karanlık alanda yapıldı. Akabinde PBS ile 3 kez 5dk yıkandı. Daha sonra kapatma medyumundan her bir laman üzerine damlatılarak lamelle kapatıldı. Sonrasında örneklerimiz Olympus BX51 immunofloresan mikroskopta değerlendirildi. Bütün gruplarda TSSK6 proteinin immünofloresan boyamaları floresan mikroskobu ile görüntülendi ve fotoğraflandı. Elde edilen fotoğraflar, İmage J programı ile analizleri yapılarak değerlendirildi.

2.4.3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS v.22 paket programı ile yapılmıştır. Verilerin dağılımı Shapiro-Wilk testi ile incelenmiş, protein değerleri üzerine hasta-kontrol grupları ve sigara kullanımının birlikte etkisinin incelenmesi amacıyla iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sayısal değişkenler için ortalama ve standart

sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak dikkate alınmıştır.

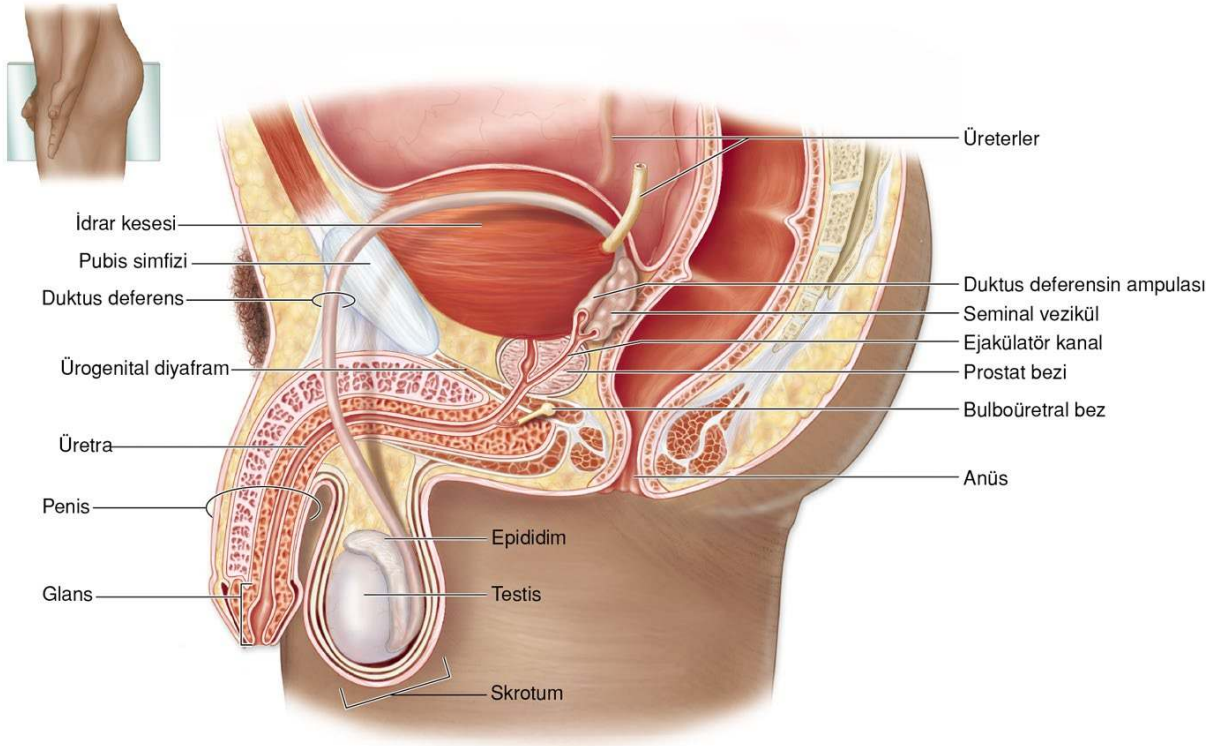
3. GENEL BİLGİLER

3.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM

Erkek genital sistem esas olarak, testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmaktadır [21] (Şekil 3.1).

Erkek genital sistemi, spermatozoaların üretimi ve bunların dışı üreme kanalına iletilmesinden sorumludur ve dört ana işlevsel bileşene ayrılmaktadır [21]:

- Testisler, skrotal kesede bulunan bir çift organ olup, erkek gametlerinin yani spermatozoaların üretiminden ve özellikle testosteron gibi erkek cinsiyet hormonlarının salgılanmasından sorumludur.
- Duktus sistemi, duktuli efferentes, epididimis, duktus (vas) deferens ve duktus ejakulatoriusu içerir ve her testisten spermatozoaları toplar, depolar ve taşırlar. Ejakülatuvar kanallar üretra ile birleşir.
- Üç ekzokrin bez; ilk ikisi spermatozoaların dışı üreme yollarına taşınmasını sağlayan, besleyici ve kayganlaştırıcı sıvı ortam oluşturan seminal sıvıyı salgılayan bir çift seminal vezikül ve bir adet prostat bezi ve üçüncüsü ejakülasyon sırasında semenin geçişi için üretrayı kayganlaştıran bir sıvı salgılayan bir çift Cowper (bulbüretral) bezlerinden oluşur. Ejakülasyon sırasında atılan semen, seminal sıvı ve spermatozoidlerden oluşur, ayrıca bunlara ek olarak bazı dökülen kanal hücreleri de bulunur.
- Penis, ejakülasyonla spermatozoaların vajinaya iletilmesini sağlayan erektile bir organdır [21].



Şekil 3.1. Erkek üreme sistemi [22]

3.1.1. Testisler

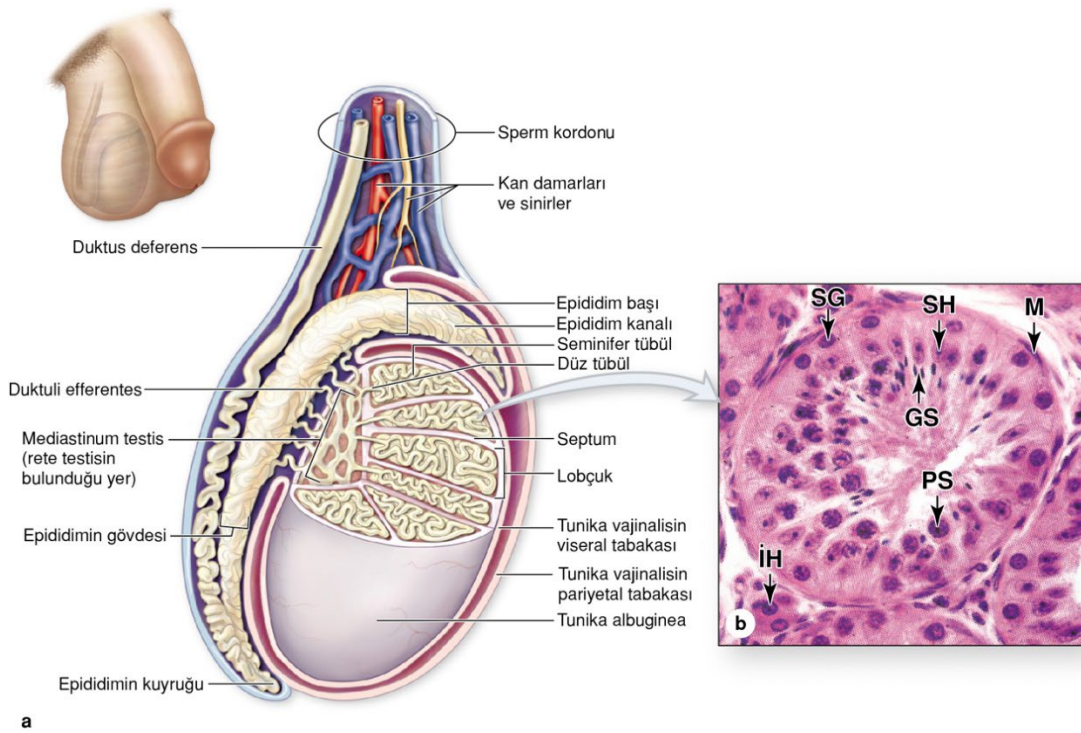
Testisler karın boşluğu dışında, deri ile örtülü olan fibromusküler bir kese olan skrotum içinde yer alan bir çift organdır. Testisler, skrotum içinde funikulus spermatikus (spermatik kordon) ile asılı halde bulunur. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34°C ile 35°C sıcaklık gereklidir [23], [24].

Her testiküler arter, testisten gelen serin kanı içeren zengin pampiniform venöz pleksus ile sarılmıştır. Zıt yönlü akış ısı değişim sistemi ile bu venöz pleksus, arteriyel kandan ısı çeker. Skrotumdan terin buharlaşması da ısı kaybına katkı sağlamaktadır. Skrotumun ince dartos kası ve spermatik kordonların kremaster kasının kasılması veya gevşemesi, testisleri vücuda yaklaştırılarak veya uzaklaştırılarak testis sıcaklığının kontrol altında tutulmasına katkı sağlar. Testesteron Leydig hücreleri tarafından sentezlenir ve androjen bağlayıcı proteine (ABP) bağlanarak tübül lümenine taşınır ve spermatogenez başlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilerek germ hücrelerini epididime taşır [23].

Testisler, embriyonun karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişir. Fetüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı hale gelirler. Karın boşluğundan gerçekleştirdikleri bu göç sırasında her testis tunica vajinalis denilen ve peritondan gelişmiş olan seröz bir kese ile sarılır. Tunica vajinalis dışta skrotumu döşeyen pariyetal tabaka ile tunica albugineayı testisin ön ve yan taraflarından saran iç viseral tabakadan oluşur [25]

3.1.1.1. Testisi Saran Yapılar

Skrotum; Bol melanin pigmenti içerdiğinden kahverengi renkli, çok ince bir deriye sahiptir. Özel bir kokusu olan yağ bezleri ve bol ter bezi içerir. Sinir sonlanmasından zengin olup deri altında yağ dokusu bulunmaz. Dolayısıyla ısı kaybı için uygun bir yapısı vardır. Deri ile musculus dartos (ince bir düz kas tabakası) arasında ince bir bağ dokusu (tunica dartos) bulunur. Testiküler kapsül, skrotum ile testis arasında iki tabakalı bir yapıdır (Şekil 3.2). Bu tabakalar:



Şekil 3.2. Testisin kısmi olarak sagittal kesiti **b.**Seminifer tübül enine kesiti [22]

Tunica Vaginalis

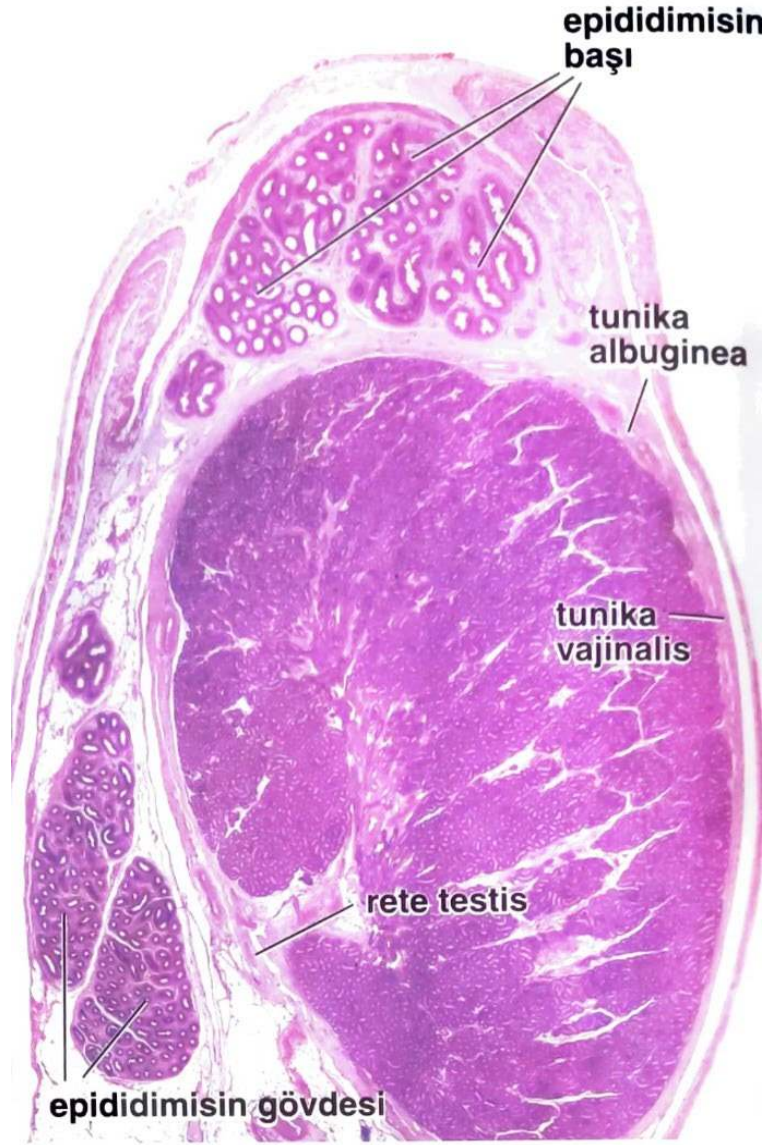
Tunica vaginalis, periton kökenli bir seröz kesedir ve testisi neredeyse tamamen sarar ve skrotum içinde belirli bir derecede hareket etmesine izin verir [24]. İki yapraklı periton zarıdır. Epiteli tek katlı yassı mezotel hücrelerinden oluşur. Visseral yaprak tunika

albuginea'ya yapışır, pariyetal yaprak ise skrotumun iç yüzüne tutunur [26].

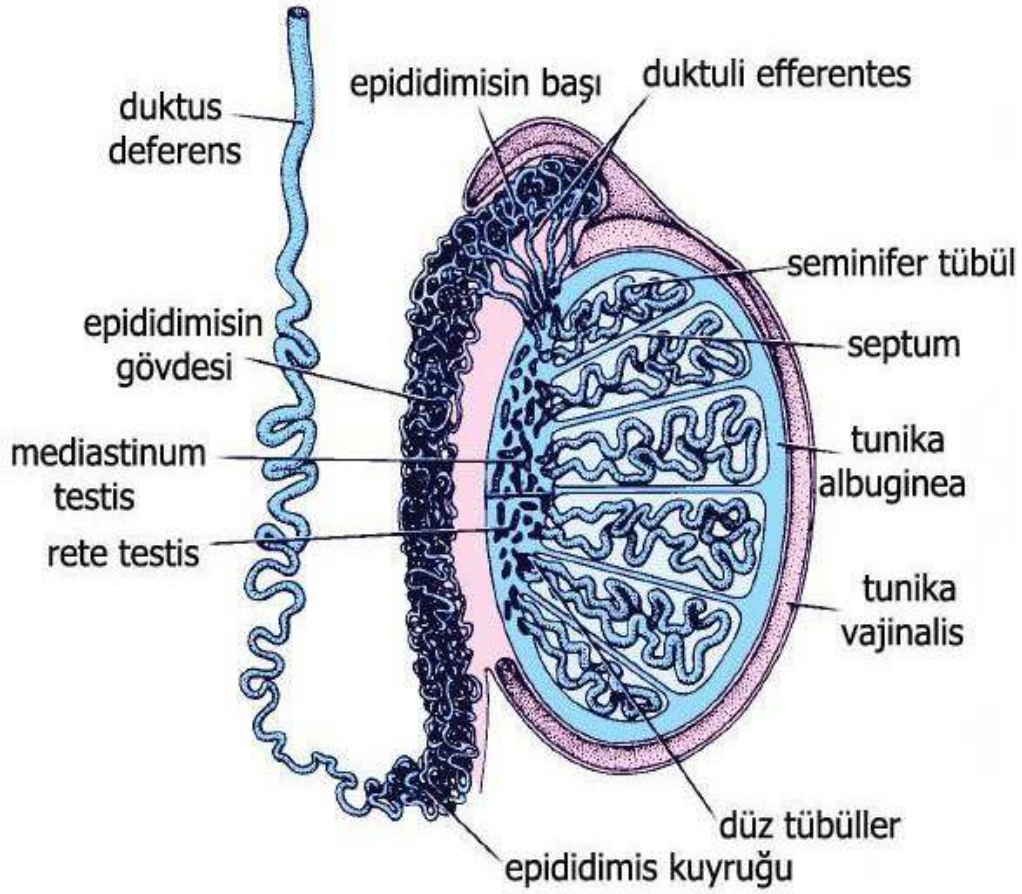
Testisler inguinal kanal adı verilen bir kanal boyunca skrotuma iner. İnguinal kanal, karın bölgesinden skrotuma doğru uzanan bir kanaldır ve içinde testisleri taşıyan sperm kanalı ve kan damarları bulunur. Testisler fetal dönemde, karın bölgesinde gelişir ve doğum öncesi inguinal kanaldan skrotuma doğru göç ederek iner. Testislerin inişinden kısa süre sonra inguinal kanalın karın içine açılan ucu kapanır. Normal gelişim süreci, testislerin skrotuma inmesi ile tamamlanır ve ergenlik dönemine kadar normal olarak yerlerinde kalır [26].

Tunica Albuginea

Erkek üreme sisteminde, tunica albuginea, testisleri çevreleyen ve her testisin etrafında fibröz bir kapsül oluşturan bir bağ dokusu tabakasıdır (Şekil 3.3). Hassas testis dokularına yapısal destek ve koruma sağlar ve testislerin skrotum içindeki şeklini ve konumunu korumaya yardımcı olur. Tunica albuginea ayrıca testiküler kan akışı ve sıcaklığının düzenlenmesinde yer alan düz kas liflerini de içerir [27]. Tunica albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Bu fibröz bölgeden bezin içine giren fibröz uzantılar (septum) bezi testis lobülleri denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile birlikte sayıları 1 ile 4 arasında değişen seminifer tübüller yer alır [22].



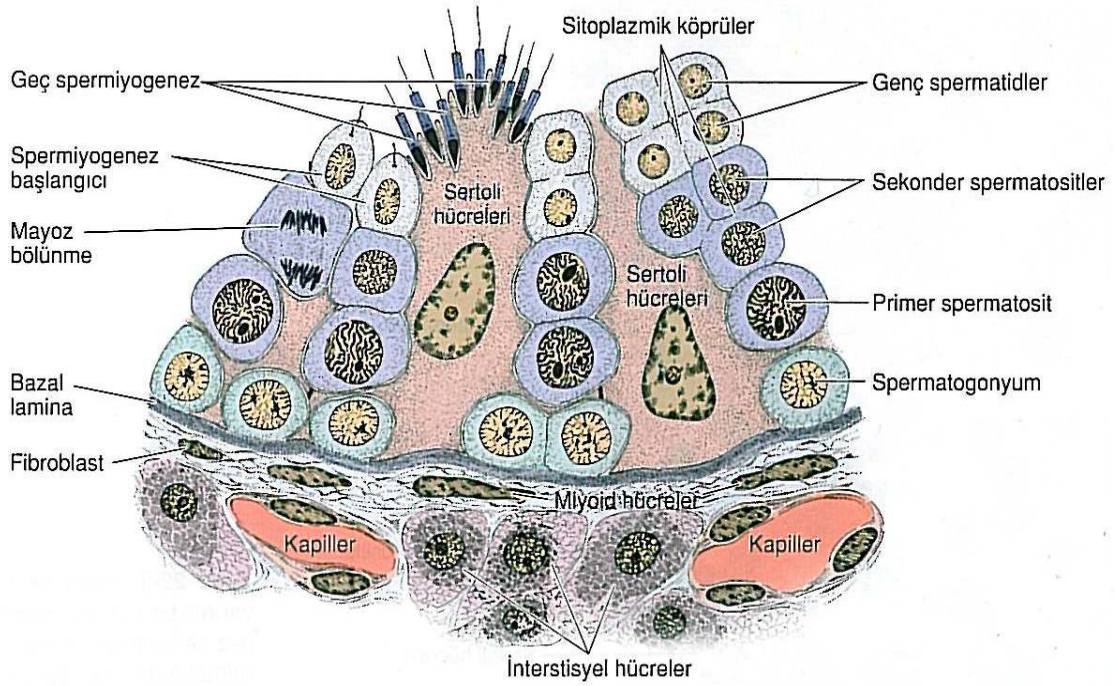
Şekil 3.3. Testis ve epididimisin H&E boyanmış kesiti.[23]



Şekil 3.4. İnsan testisinin midsagittal kesiti.[23]

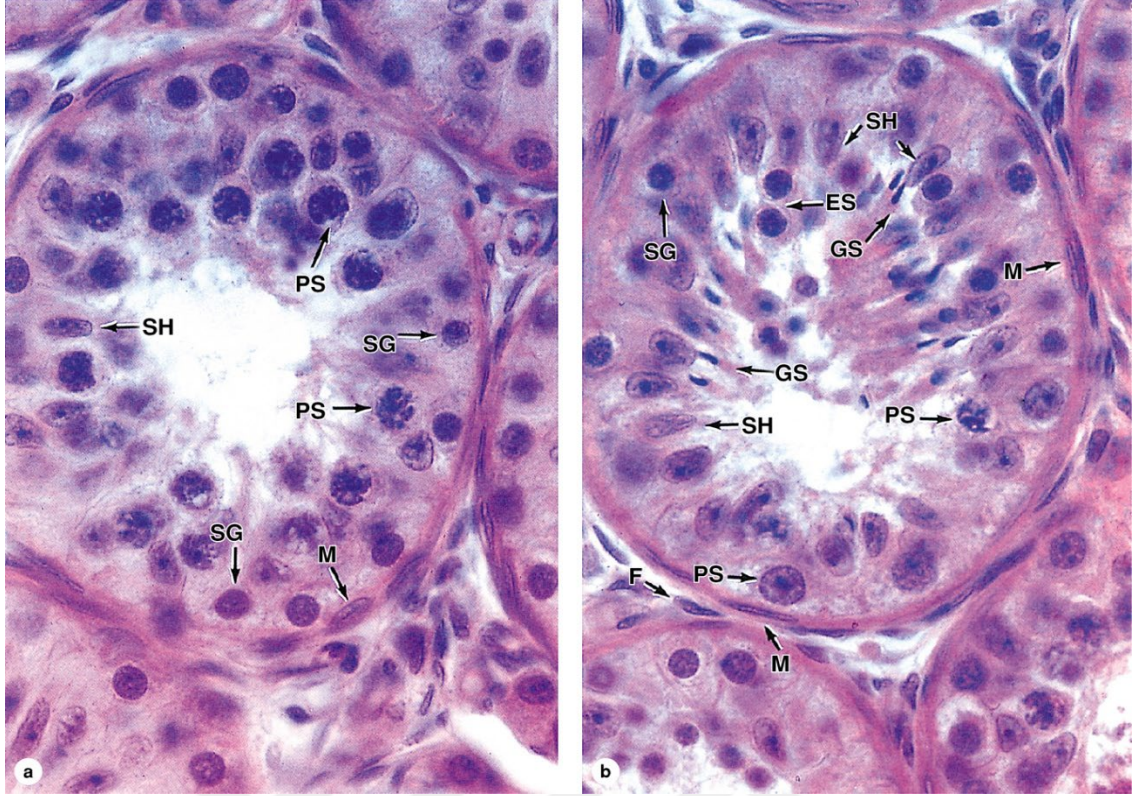
3.1.2. Seminifer Tübüller

Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her seminifer tübül yaklaşık 150-250 μm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir (Şekil 3.5). Genç yetişkinlerde, seminifer tübüllerde günde ortalama 2×10^8 sperm üretilir. Tübüller kıvrımlıdır ve sonlanırken lümen daralır ve tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eder (Şekil 3.6) [22].



Şekil 3.5. Çevreleyen dokuyla birlikte seminifer tübülün bir parçası. Seminifer epitel iki tip hücre oluşturmuştur. Spermatogenik seri hücreleri ve sertoli hücreleri [28].

Her bir seminifer tübül, germinal epitel adı verilen özelleşmiş, çok katlı bir epitelden oluşur. Bu epitelin bazal membranı fibröz bağ doku ile kaplıdır ve en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Bu hücreler tübüllerin zayıf bir şekilde kasılmasını sağlar. Germinal epitel iki tip hücreden oluşur: Büyük bölünmeyen sertoli (destek hücreleri) hücreleri ve bölünebilen spermatogenik seri hücreleri (4-8 tabaka halinde). Seminifer tübülde sperm üretimi iki aşamada gerçekleşir. İlk olarak spermatid üretim süreci olan spermatogenez ve spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin spermatozoona dönüşme süreci olan spermiyogenezdir (Şekil 3,7) [23], [28].



Şekil 3.6. Seminifer Tübülün enine kesiti; periferde yakın noktada spermatogonyumlar (SG), Sertoli hücreleri (SH), primer spermatositler (PS) ve lümenin yakınında geç spermatidler (GS) ve çevredeki bağ dokuda bulunan miyoid hücreler (M) ve erken spermatidler (ES), fibroblastlar (F). [29]

Sertoli hücreleri; büyük açık girintili çekirdeklere, bol miktarda mitokondriye, iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, endolizozomlar ve birçok sitoskeletal elemente sahip uzun hücrelerdir. Bitişik sertoli hücreleri arasında oluşturulan sıkı bağlantılar, seminifer tübülün lümenini iki kompartmana böler. Sıkı bağlantılar ile bazal lamina arasında yer alan vasküler bağ dokusundan etkilenen kısım bazal kompartman, sıkı bağlantılardan lümene kadar olan bölüm vasküler bağ dokusunda izole adluminal kompartmandır. Sıkı bağlantılar bir kan-testis bariyeri oluşturur ve gelişmekte olan gametlerin bağışıklık sistemine maruz kalmasını engeller. Aksi takdirde gelişmekte olan gametlere karşı bağışıklık yanıtı oluşur [24].

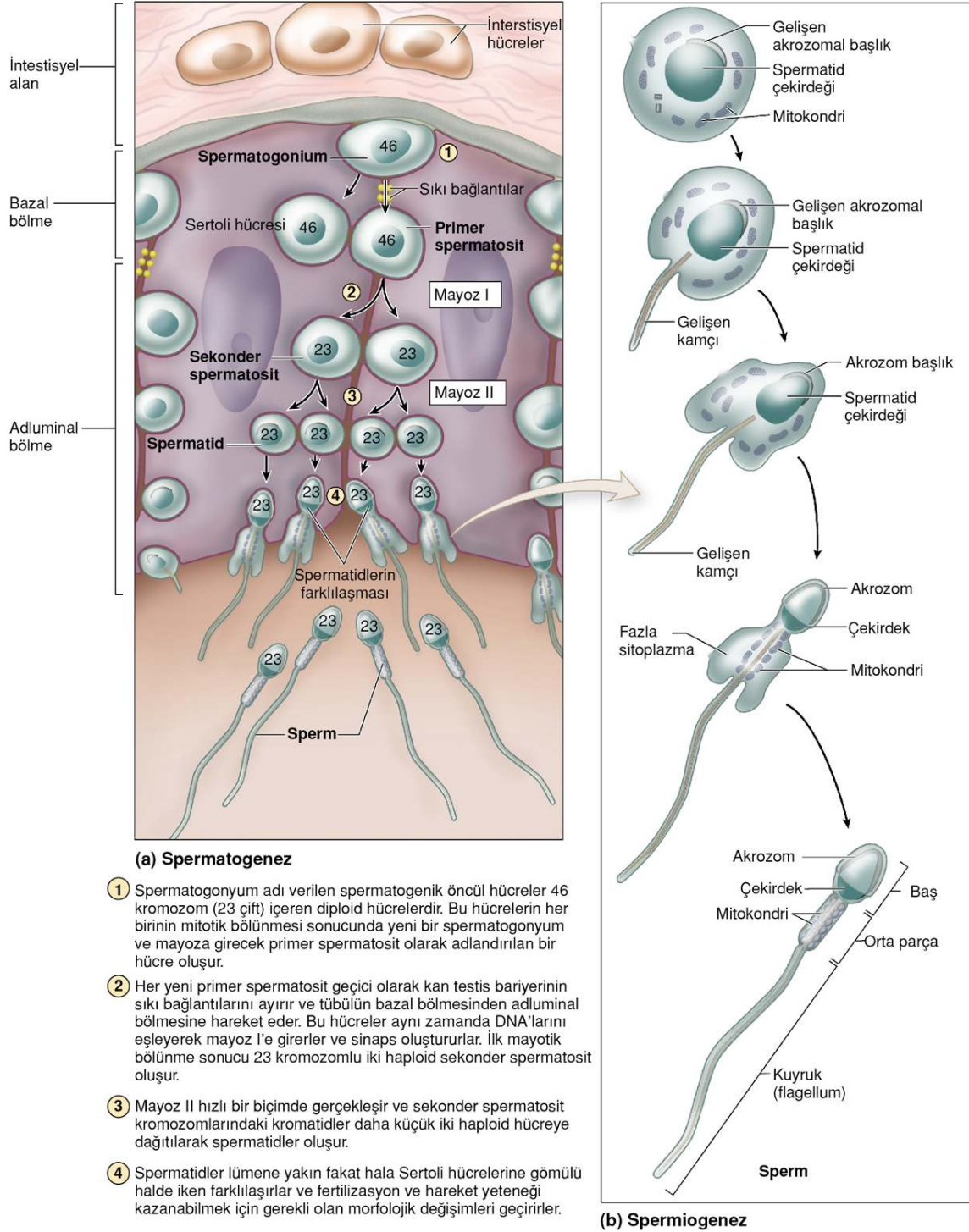
Sertoli hücrelerinin işlevleri: Gelişmekte olan spermatojenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek. Spermiyogenez süreci sırasında atılan hücre kalıntılarını (artık cisimler) fagosite etmektedir. Olgun spermatidlerin lümen içine serbest bırakılmasını aktin aracılı kasılma yoluyla kolaylaştırmak (spermiyasyon). Androjen bağlayıcı proteini (ABP) seminifer tübül lümenine salgılayarak seminifer tübüllerdeki testosteron konsantrasyonunu artırmak. FSH'nin salınımını engelleyen inhibini salgılamak. Spermatozoayı genital kanallar boyunca besleyen ve taşıyan sıvıyı salgılamak, olgunlaşan

gametlere demir sağlamada yardımcı olan testiküler transferrini salgılamak ve embriyonik gelişim sırasında dişi üreme sistemi gelişimini engelleyen ve erkek üreme sisteminin gelişimine izin veren antimüllerian hormonunu salgılamaktır [24].

3.1.3. Spermatogenez

Spermatogenez, cinsel olgunluk çağında kök ve progenitör hücreler olan spermatogonyumların proliferasyonu ile başlar ve yeni hücreler oluşur. Spermatogonyumlar küçük, yuvarlak ve 12 µm çapında hücrelerdir. Bu hücreler bazal membranın hemen üstündedir ve sertoli hücrelerinin yüzeyleriyle yakın ilişki halindedirler (Şekil 3.8). Spermatogonyumun gelişiminin farklı basamakları, şeklindeki küçük farklılıklara ve çekirdeğinin boyanma özelliklerine bakarak tanımlanabilir [22].





Şekil 3.7. Spermatogenez ve Spermiyogenez [29].

Tip A koyu renkli ve oval şekilli çekirdeğe sahip spermatogonyum kök hücre olarak hareket eder ve nadir bölünür. Bu hücrenin bölünmesi sonucunda iki tip hücre oluşur. Birincisi kök hücre (Tip A koyu) karakterindedir. Diğeri ise daha soluk boyanan ve oval çekirdekli (Tip A soluk) ve progenitör hücrelerde olduğu gibi daha hızlı bölünebilen hücredir. Tip A soluk spermatogonyumlar birbiriyle bağlantılı olacak şekilde çok sayıda

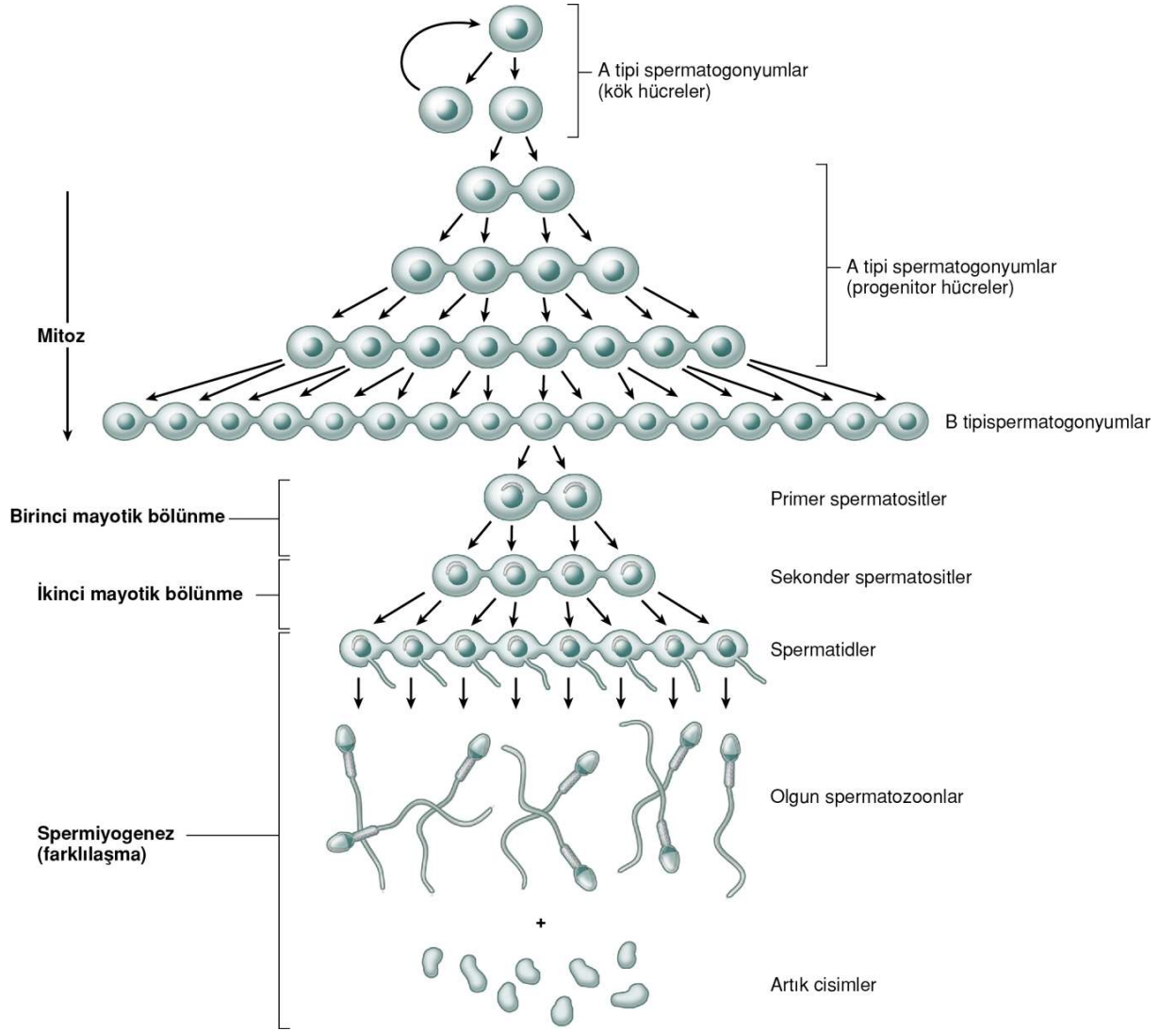
klonal bölünme geçirir. Sonunda bu hücreler yuvarlak ve soluk boyanmış nükleuslu Tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar da son bir mitoz bölünme geçirerek primer spermatositleri oluştururlar [22].

Primer spermatositler diploid 4N DNA'lıdır. Bu hücreler 46 kromozom 4N DNA içerir. Spermatogenik serinin en büyük hücreleridir. Oluşumlarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler (yaklaşık 22 gün sürer). Birinci mayoz bölünme sonunda, homolog kromozomlar ayrılır ve sekonder spermatositler olarak adlandırılan 23 kromozom 2N DNA içeren daha küçük hücreler oluşur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve hızlıca ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir [22].

Sekonder spermatositlerin bölünmesiyle her bir kromozomun kromatidleri birbirinden ayrılır ve iki tane haploid hücre oluşur. Bu hücreler spermatid olarak adlandırılır ve 23 kromozom içerir. Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı (DNA sentezi) görülmediği için, ikinci bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1N) hücreler meydana gelir. Böylece, mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid kromozom içeren hücreler oluşur. Döllenme ile birlikte, mayoz ile oluşan bir haploid ovum ve sperm birleşir ve normal diploid kromozom sayısı korunur [22].

3.1.4. Spermiyogenez

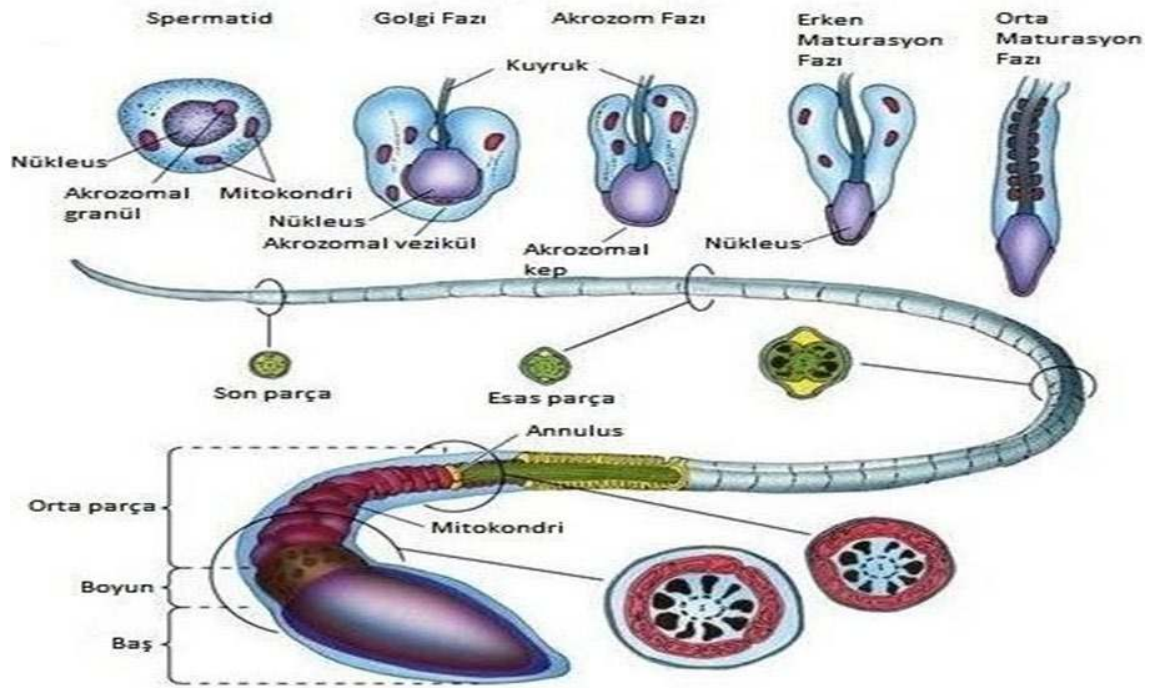
Spermiyogenez, spermatozoon üretiminin sıcaklığa en duyarlı son aşamasıdır. Spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoonlara dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez ve spermatogenezde olduğu gibi, yer alan hücreler sertoli hücreleri ile yakın ilişkidedirler. Haploid spermatidler küçüktürler ve seminifer tübül lümenine yakındırlar (Şekil 3.9) [22].



Şekil 3.8. Spermatogenez ve spermiyogenez [23]

Spermiyogenez, akrozom oluşumu, nükleus yoğunlaşması ve uzaması, flagellum oluşumu ve sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Sonuçta, daha sonra seminifer tübül lümenine salınan olgun spermatozoon oluşur. Spermiyogenez golgi fazı, kep fazı, akrozomal faz ve matürasyon fazı olmak üzere 4 faza ayrılır [1], [22]. Golgi fazı spermatid sitoplazmasında nükleusun yakınında golgi kompleksi, mitokondri, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum (DER) tübüllerini içerir. Golgi kompleksi tarafından oluşturulan proakrozomal granüller (küçük PAS-pozitif granüller) bir araya gelerek birleşir ve akrozomal vezikülü oluştururlar. Sentriyoller akrozomal kesenin yerleştiği kutuptan en uzağa göç eder ve distal sentriyol flagella aksonemini oluşturmaya başlar [30]. Kep fazında akrozomal vezikül yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde nükleusu sarmaya başlar ve akrozom adını alır. Akrozom kumulus hücrelerini ve zona pellusidayı geçebilmek için hiyalüronidaz,

nöraminidaz ve asit fosfataz gibi hidrolitik enzimleri içerir. Bu enzimlerle oluşan reaksiyona akrozomal reaksiyon denir ve döllenmenin ilk basamağıdır. Akrozomla eş zamanlı olarak nükleus uzar ve daha yoğun hale gelir. Distal sentriolden aksonem gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal kısmı etrafında sarmal halinde toplanarak orta parçayı oluşturur. Bu bölge sperm hareketleri için enerji kaynağıdır. Maturasyon fazında geriye kalan sitoplazma artıkları sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve spermatozoonlar seminifer tübülün lümenine salınırlar. Spermatozoonlar, epididimise sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen testiküler sıvı tarafından taşınır. Bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla ilişkili androjen bağlayıcı protein içermektedir [23], (Şekil 3.10).

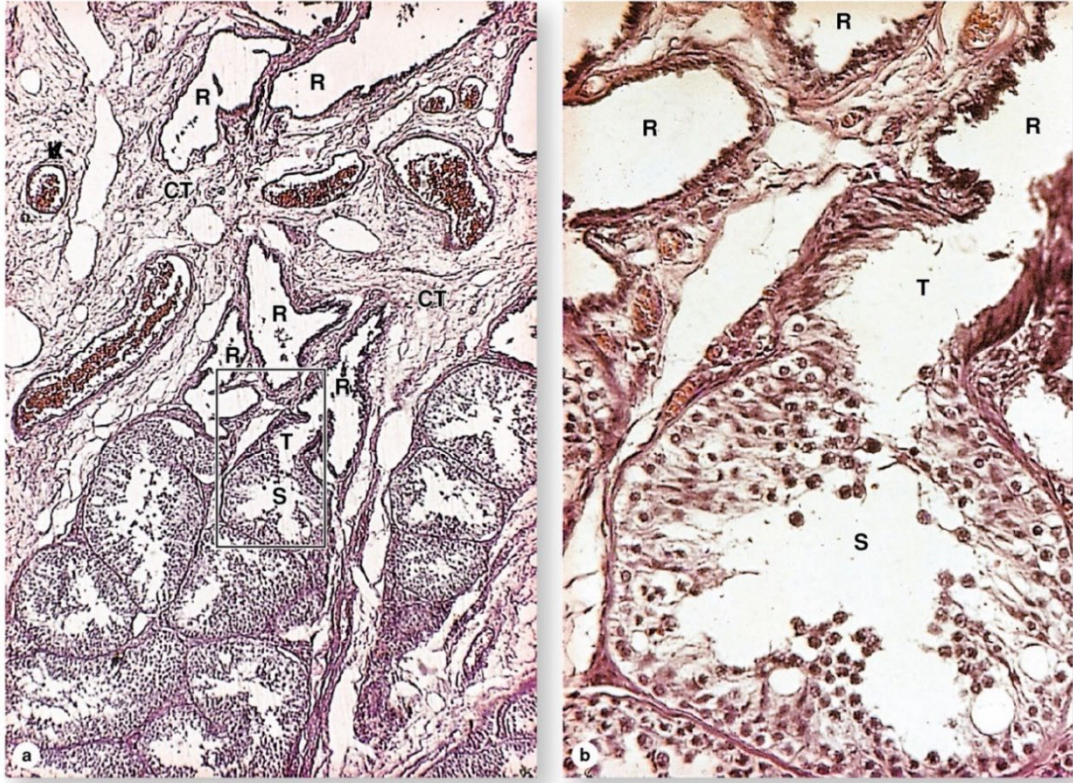


Şekil 3.9. Spermiyogenez aşamasında spermatidlerin değişimi ve matür sperm yapısı [31].

3.1.5. Testis içi kanallar

Testis içi genital kanallar tubuli rekti, rete testis ve duktuli eferentestir (Şekil 3.4), (Şekil 3.5). Bu kanallar, Seminifer tübüllerden gelen sıvı ve spermatozoonları duktus epididimise taşır. Tubuli rekti başlangıcı sertoli hücrelerinden oluşan ve sonra sıkı bağ dokusu ile sarılı prizmatik epitele dönüşen bir kanal yapısıdır. Daha sonra bu kanal rete testise açılır. Rete testis tunika albugineanın kalınlaşmasıyla oluşan mediastinum içinde ağ şeklinde yer alır. Prizmatik epitelle döşeli anastomozlaşan kanallar sistemidir. Duktuli eferentes rete testisi epididimise bağlayan 10-20 adet kanaldır. Epiteli silyalı

izoprizmatik, sterosilyalı kübik ve bazal hücrelerden oluşur. Epitel tarak şeklindedir. Bazal hücreler lümene ulaşamaz ve kök hücrelerdir. Sterosilyalı hücreler seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu absorbe eder. Silyalı hücreler epididimise doğru hareketi sağlar. Bazal laminanın altında ince bir sirküler kas tabakası vardır [32].



Şekil 3.10. Seminifer tübüller,tubuli rekti ve rete testis [29].

3.1.6. Spermin Yapısı

Spermatozoa, üç ana bileşenden oluşan yaklaşık 65 µm uzunluğunda bir hücredir. Baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç ana bölümden oluşur [21].

Baş, farklı memeli türleri arasında en değişken yapıdır. İnsanlarda baş yaklaşık olarak 4,5 µm uzunluğundadır ve düzleştirilmiş armut şeklinde bir yapıya sahiptir. Başın çoğunu kaplayan çekirdek yoğun kromatinden oluşur. Çekirdeğin ön üçte ikisini çevreleyen akrozomal başlık, bir dizi glikoprotein ve çeşitli hidrolitik enzim içeren membranla sınırlanmış bir keseciktir. Bu kesenin enzimleri, korona radiata hücreleri ve döllenme sırasında zona pellucidanın geçilmesini sağlar [21].

Kuyruk boyun, orta, esas ve son parça olmak üzere dört segmente ayrılır:

Boyun, başı kuyrukla birleştiren çok kısa bir segmenttir. Bu, flagellumun aksonemini oluşturan iki sentriol içerir ve bu sentriollerden biri flagellumun aksoneminin oluşumunu

sağlar. Aksonem, silyada gözlenen mikrotübül çiftlerinin standart 'dokuz artı iki' düzenine sahiptir. Boynun aksonemi, birkaç yoğunlaşmış fibröz halka tarafından çevrilidir. İnsan spermatozoalarında, boyun bölgesinde genellikle önemli miktarda sitoplazma bulunur.

Orta parça, kuyruğun ilk bölümüdür ve başla aynı uzunluğa sahiptir. Bu parça, flagellar aksonem ile uzunlamasına düzenlenmiş dokuz kalın lif tarafından çevrilidir. Bu merkezi yapının dışında sıkı bir sarmal şeklinde düzenlenmiş mitokondriler bulunur ve bunlar flagellum hareketi için gerekli enerjiyi sağlar. Plazma membranının altında orta parçanın son kısmında fibröz bir kalınlaşma dikkat çeker. Bu kalınlaşma mitokondrilerin esas parçaya kaymasını önleyen annulustur [21].

Esas kısım, kuyruğun büyük bölümünü oluşturur. Merkezinde aksonem ve orta parçadan devam eden dokuz kalın lif içerir. Aksonem ve dış yoğun lifleri çevreleyen dairesel bir şekilde düzenlenmiş birçok fibröz yapı bulunur [21].

Son parça, yalnızca aksonemi içeren kuyruğun kısa, konik bir bölümüdür [21].

Sperm, embriyolojik gelişimde önemli bir role sahiptir. Fertilizasyon sırasında, sperm hücresi dişi yumurta hücresinin sitoplazmasına girer ve nukleusları bir araya gelerek zigotu oluşturur. Zigot, embriyonik gelişim sürecinde hücre bölünmeleri ile çoğalarak morula adı verilen hücre kümesini oluşturur. Bu süreçler, embriyonik gelişimde hayati öneme sahiptir [25].

3.1.6.1. Semen

Semen, erkek üreme sistemi tarafından üretilen bir sıvıdır. Semen ana bileşenleri arasında su, früktoz, proteinler, enzimler, mineraller ve vitaminler yer alır. Semen, sperm hücreleri, seminal veziküller, prostat ve Cowper bezlerinin salgıları ve idrar yolundan geçen diğer sıvıların bir karışımıdır. Su, semenin çoğunluğunu oluşturur ve sperm hücreleri için uygun bir ortam sağlar. Fruktoz, sperm hücrelerinin enerji kaynağıdır. Proteinler, sperm hücrelerinin beslenmesine ve savunmasına yardımcı olan antikorlar ve diğer moleküller içerir. Enzimler, spermin dişi üreme sistemi içinde yolunu açar. Mineraller ve vitaminler, sperm hücrelerinin sağlıklı gelişimi için gereklidir. [33]. Her ejakülasyonda semen hacmi yaklaşık 3.5 mL'dir. Her mL'de 50 - 150 milyon arasında spermatozoa bulunur. Normal, fertil erkeklerde, ejaküle edilen spermatozoaların %25'ine kadarı anormal veya dejeneratif formdadır. Ejakülasyon anına kadar, spermatozoalar olgunlaşmış ve hareket özelliğini kazanmış olsalar da, dişi üreme yolunda gerçekleşen bir süreç olan "kapasitasyon" sürecinden sonra bir yumurtayı dölleyebilirler [21]. Semen analizleri, erkeklerde üreme sağlığı ile ilgili birçok bilgi sağlayabilir. Sperm sayısı,

hareketliliği, morfolojisi ve diğer faktörler semen analizi sırasında değerlendirilir [33]. Sperm sayısı, kalitesi ve diğer bileşenlerdeki değişimler bazı durumlarda üreme problemlerine neden olabilir [34], [35]

3.2. İNFERTİLİTE VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

İnfertilite, endüstriyel ülkelerde doğurganlık çağındaki çiftlerin %15'ini etkileyen yaygın bir durumdur [36]. Korunmasız cinsel ilişki sonrası 1-2 yıl boyunca gebe kalamama olarak tanımlanır [37]. İnfertilite, erkek ve/veya kadın gamet üretiminin bozulması veya gametlerin birbirlerine ulaşamaması veya birleşmemesi sonucu ortaya çıkar. Ayrıca, embriyo oluştuktan sonra, yetersiz embriyo büyümesi ve gelişmesi de infertiliteye neden olabilir. Erkek infertilitesi ise, çift infertilitesinin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır [1].

3.2.1. İnfertiliteyi Etkileyen Faktörler

Şimdiye kadar infertil çiftlerde birçok etiyolojik faktör tanımlanmıştır. Bunlar;

1. Kişisel sağlık etkenleri; diyet, egzersiz, obezite ve stres, gametogenez bozuklukları, anormal gamet kalitesi, genital sistem bozuklukları (tikanıklıklar, enfeksiyonlar, vb.), anormal embriyo yerleşimi veya vaskülarizasyon yer alır [38].
2. Suistimal edilen maddeler (alkol, sigara, anabolik steroidler vb)
3. Çevresel faktörler (radyofrekans elektromanyetik radyasyon, çevre kirliliği, ısı vb)

Bu kadar çok faktör belirlenmesine rağmen, halen önemli bir yüzdelik dilimde infertilite etiyolojisi açıklanamamaktadır [39].

3.2.2. İdiyopatik erkek infertilitesi

Erkek kaynaklı infertilite, çift infertilitesinin yarısından fazlasını oluşturur ve sadece %30'u belirlenir [40]. Endişe verici bir şekilde kanıtlar, infertil çiftlerin erkek partnerlerinin ~%70'inde etiyolojik bir faktör bulunamadığını ve erkek infertilitesinin nedeninin hala belirsiz olduğunu göstermektedir. Öte yandan, etiyolojik faktörlerin bulunamadığı, idiyopatik, açıklanamayan erkek infertilitesinin yönetimi hem klinisyen hem de çözüm arayan çiftler için zorlu bir süreçtir [8]. Özellikle, erkek gametin embriyogenezdeki genel katkısı sperm DNA'sıyla sınırlı olduğundan, tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftler de dahil olmak üzere, çift infertilitesinin yönetiminde erkek partnerin dikkatli bir tanısal ve terapötik yaklaşımı sıklıkla göz ardı edilir. Bu nedenle, sperm DNA'sını oosit içine enjekte etmeyi amaçlayan yardımcı üreme teknikleri (YÜT), infertil

çiftlerin erkek partnerlerinin tanı ve tedavisinin ihmal edilmesi nedeniyle uzun süredir infertilite için en etkili terapötik yaklaşım olarak kabul edilmiştir. Ancak, YÜT başlatılan döngü sayısı ile klinik gebelik sayısı arasındaki yüksek uyumsuzluk, YÜT'ün o kadar başarılı olmadığını ve sperm DNA parçalanması ötesinde sperm kalitesi ile ilgili diğer faktörlerin dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. [41], [42].

Yardımcı üreme teknolojisi çağında, teorik kavramlara dayanan sınırlı yararları ve düşük bilimsel temeli olan bu konuda hala birkaç tıbbi seçenek mevcuttur, ancak spesifik olmayan tıbbi tedavi, doğal bir hamilelik elde etmek için çoğunlukla endikasyon dışı bir seçenek olarak devam etmektedir [8].

Bu veriler ışığında, erkek infertilitesinin daha fazla moleküler hedefleri araştırılmalıdır. Spermatogenez, spermatogoniyal kök hücrelerinin çoğalması ve yüksek özelleşmiş, terminal farklılaşmış spermatozoalara dönüşümü ile sonuçlanan moleküler olayların karmaşık bir serisidir. Mevcut yüksek çıktılı teknolojilerin geliştirilmesi, binlerce RNA ve proteini taşıyan spermatozoanın büyük karmaşıklığının tanınmasını sağlamaktadır. Sperm genomunun (epigenetik düzenleme dahil), transkriptomunun ve proteomunun toplam katkısı, embriyo oluşumu ve gelişimi araştırılmalı ve erkek infertilitesinden sorumlu yeni moleküler hedefler belirlenmelidir [41], [42].

3.2.2.1. Sigaranın Erkek İnfertilitesi Üzerine Etkisi

Sigaranın sperm kalite ve sayısına etki mekanizması tam olarak gösterilememişse de olumsuz etkisi açıktır [43]. Testise ulaşan oksijen miktarını azaltmakta, bu durum da spermatogenez için gerekli olan yüksek metabolik ihtiyacı ve serbest oksijen türleri miktarını da artırmaktadır. Sigara içinde bulunan kadmiyum, benzopiren, karbon monoksit, naftalin gibi metabolitlerin neden olduğu oksidatif stres spermatogeneze doğrudan etki oluşturmakta, sperm DNA kırıklarına neden olmakta, sperm sayı ve kalitesini düşürmektedir [1, 39, 43, 44].

Bir sistemik derleme ve meta-analiz olan çalışma, sigara içmenin sperm kalitesini olumsuz etkilediğini göstermiştir. Bu çalışma, sigara içen erkeklerde sperm yoğunluğunun ve hareketliliğinin daha düşük olduğunu, sperm şekil bozukluklarının ise daha yüksek olduğunu bulmuştur [12]

Diğer bir çalışma, sigara içen erkeklerde sperm morfolojisinde anormallikler ve DNA hasarı riskinin arttığını göstermiştir. Sigara içme süresi ve sigara içilen günlük miktarın artmasıyla birlikte bu etkilerin daha belirgin olduğu bulunmuştur [45].

3.2.2.2. Testise Özgü Serin/Tireonin Kinaz Ailesi (TSSK)

1994 yılında Ziemiecki ve arkadaşları yeni kinazları ararken dejenere bir primer stratejisi kullanarak farede testise özgü serin kinazı ilk kez tanımlamışlardır [46]. Li ve arkadaşları, fare ve insan sperminde TSSK aile üyelerinin ekspresyon ve lokalizasyon desenlerinin kapsamlı bir analizini gerçekleştirdi. Bu çalışmada, kantitatif PCR kullanarak, TSSK1, TSSK2, TSSK3, TSSK4 ve TSSK6 transkriptlerinin testise özgül ve fare germ hücrelerinde postmayotik olarak ekspre edildiği onaylandı. Ayrıca, antikorlar kullanarak, bu kinazların spermatogenez sırasındaki bölgesel lokalizasyonları ve olgun spermdeki dağılımları karakterize edilerek tespit edildi [47], [48]. Li ve arkadaşlarının bir çalışmasında TSSK1, TSSK2, TSSK4 ve TSSK6'nın spermatidlerde postmayotik olarak ekspre edildiği bulundu. Ancak, TSSK2 ve TSSK6 proteinlerinin yalnızca spermatidlere özgü olduğu tespit edilirken, TSSK1 ve TSSK4'ün bazal membrana yakın ekspre olduğu tespit edildi [49].

Sosnik ve arkadaşları bir çalışmasında, fare TSSK2 ve TSSK6'nın polimerize aktin açısından zengin bir sperm başının postakrozomal bölgesinde lokalize olduğunu göstermiştir [16]. TSSK1, TSSK2 ve TSSK6, insan sperminde de lokalize olmuş ve fare sperminde gözlenenle çok benzer bir ekspresyon sergilemiştir [50].

3.2.2.3. TSSK6

Testise özgü serin/tireonin-protein kinazı 6'nın (TSSK6) geniş bir ekspresyon paterni vardır, ancak fertilité üzerindeki etkileri nedeniyle testise özgü olarak tanımlanmaktadır. Erkek farelerde oldukça benzer bir proteini kodlayan genin olmaması hayvanların steril olmasına ve morfolojik olarak anormal spermiler oluşmasına neden olmaktadır [51].

TSSK6, sadece testiste ekspre olan, spermın arka baş ve perforatoryumunu içeren ve polimerize aktin ile zenginleştirilmiş bir sperm bölgesine lokalize olan serin/tireonin protein kinazdır. TSSK6'nın olmadığı fareler infertildir ve spermatozoaları normal koşullarda spontan akrozomal reaksiyon gösterir ve *in vitro* olarak yumurtalarla kaynaşamazlar [16]

Bu bulgular, TSSK6'nın farelerde fertilité için gerekliliğini vurgular ve insanlarda da

benzer bir işlevi olabileceğini düşündürmektedir. İnsanlarda TSSK6 ile ilişkili mutasyonlar, erkek infertilitesinin nedeni olabilir.

Daha önce yapılan bir çalışmada, TSSK6'nın olmadığı ve TSSK6 içeren farelerden elde edilen sperm, Diferansiyel İnterferans Kontrast (DIC) mikroskopisi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre TSSK6'nın olmadığı sperm, genel baş morfolojisi, TSSK6 içeren sperm, farklı değildi. Bununla birlikte, dört ana morfolojik kusur bulundu. Bu kusurlar, çok sayıda ayırık baş, başın geriye doğru yanlış rotasyonu, kuyruktaki saç tokası görüntüsü şeklinde katlanma ve kuyruktaki saç tokası görünüm ve başın arkaya doğru rotasyonunun birlikteliği şeklinde gözlenmiştir. Spermin geri kalanı normal morfoloji göstermiştir. Ayrıca TSSK6 içermeyen fareler herhangi bir somatik anomali göstermeden sterildir. (sperm zona pellucidadan içeri girebilir ancak yumurta plazması membranı ile birleşemez). Bu nedenle, TSSK6 yumurta füzyonu için gereklidir ancak yumurtanın aktivasyonu için gerekli değildir. Yukarıda belirtilen çalışma sonuçlarını dikkate aldığımızda TSSK6 proteinin erkek fertilesi için gerekli olduğu açıkça anlaşılmaktadır [16], [49].

TSSK6'dan yoksun farelerde, morfolojik olarak normal ve ilerleyici hareket edebilen önemli bir yüzdeye sahip sperm bulunmektedir. In vitro fertilizasyon (IVF) deneyleri gerçekleştirildiğinde ise, hiçbir yumurta fertilize olmazken, intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) bu kusuru aşmıştır. Zona pellusuda (ZP) tabakası çıkarılmış yumurtalar kullanılarak yapılan IVF denemelerinde, sperm-yumurta füzyonu eksikliği nedeniyle fertilizasyon gerçekleşmemiştir. Şu anda, genetik yaklaşımlar kullanılarak, sperm-yumurta füzyonu için kesin olarak gerekli olduğu gösterilen sperm proteinleri TSSK6 ve Izumo1'dir. Izumo1'e karşı yönlendirilen antikorlar, TSSK6'dan yoksun sperm fenotipini daha fazla araştırmak için kullanılmıştır. Vahşi tip hayvan sperm, akrozom reaksiyonu gerçekleştikten sonra, Izumo1 ekspresyon desenini değiştirir ve postakrozomal bölgeye dağılır, ancak bu değişiklik TSSK6'dan yoksun sperm, gözlenmemiştir. Ayrıca, TSSK6'dan yoksun fareler, floresan phalloidin boyama yöntemi kullanılarak izlendiğinde aktin polimerizasyonunda kusurlar sergilemiştir. Tüm bu veriler, TSSK6'nın Izumo1 lokalizasyonundaki değişikliklerde rol oynadığını ve bu değişikliklerin gamet füzyonu için önemli olduğunu göstermektedir [16].

Bu bulgulara göre, TSSK6 proteininin sperm yumurta füzyonunda önemli olduğu ve sperm üretiminde önemli rollerinin olduğu yukarıda verilen çalışmalardan anlaşılmaktadır. Ancak idiyopatik infertilitesi olan bireylerde TSSK6 ekspresyon

değişimleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca sigara içen ve içmeyen bireylerdeki TSSK6 değişimi araştırılmamıştır. Biz bu çalışma ile idiyopatik infertil sigara içen ve içmeyen bireylerin spermalarında TSSK6 protein ekspresyon değişimlerini araştırdık.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

Olympus BX51 mikroskoba monte dijital kamera ile immünofloresan boyanan sperm yaymalarının mikrografları çekildi. İmmünofloresan boyanma yüzdeleri ImageJ programı kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel analizler IBM SPSS v.22 paket programı ile yapılmıştır. Verilerin dağılımı Shapiro-Wilk testi ile incelenmiş, protein değerleri üzerine hasta-kontrol grupları ve sigara kullanımının birlikte etkisinin incelenmesi amacıyla iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sayısal değişkenler için ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak dikkate alınmıştır (Çizelge 4.1).

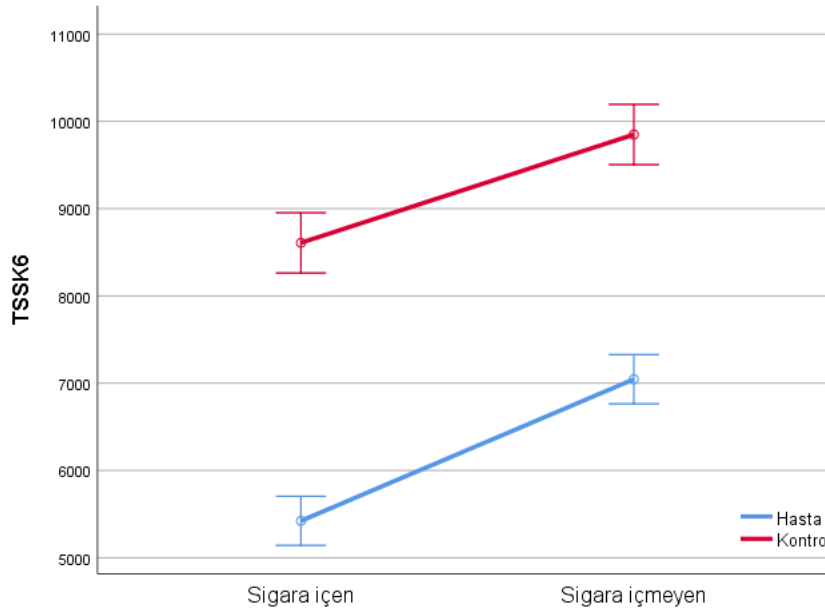
Çizelge 4.1. TSSK6 protein değerlerinin hasta ve kontrol grubu ile sigara içen ve içmeyen üzerindeki dağılım tablosu

TSSK6	Hasta	Kontrol	Genel	p
Sg. içen	5422,51±767,51	8608,27±542,96	6696,81±1717,10	<0,001
Sg. içmeyen	7045,46±823,05	9848,82±910,80	8166,81±1627,02	
Genel	6233,99±1136,73	9228,55±970,76	0,232	
p	<0,001			

TSSK6 proteinin ekspresyonu sperm hücrelerinde postakrozomal bölge ve orta parçada gözlemlendi (Şekil 4.3). Kontrol grubunda sigara içen birey spermelerinde TSSK6 ekspresyonu sigara içmeyenlere göre daha düşüktü (Şekil 4.4) ve (Şekil 4.5). Bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p<0,001$) (Şekil 4.1) ve (Şekil 4.2). Hasta grubunda sigara içen ve içmeyen bireylerin TSSK6 ekspresyonuna genel olarak baktığımızda kontrole göre anlamlı şekilde azaldığını gözlemledik ($p<0,001$) (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Hasta sigara içen birey spermelerinde TSSK6 ekspresyonu sigara içmeyenlere göre daha düşüktü (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p<0,001$) (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). TSSK6 proteini bakımından grup X sigara etkileşimi

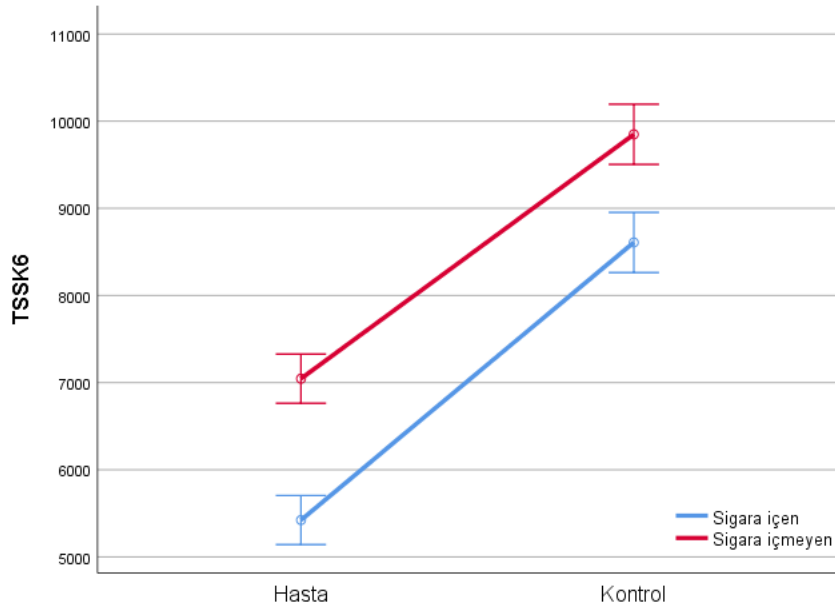
anlamalı bulunmamıştır ($p=0,232$). Yani hasta ve kontrol gruplarındaki sigara içme durumuna göre TSSK6 değerlerinin değişimi hasta ve kontrol gruplarında benzer şekilde ortaya çıkmakta, her iki grupta da sigara içenlerde TSSK6 değerinin daha düşük olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1).

Grup ana etkisi ($p<0,001$) ve sigara ana etkisi ($p<0,001$) ise anlamalı olup genel olarak hasta grubunda protein değerlerinin daha düşük olduğu ve genel olarak sigara içenlerde protein değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



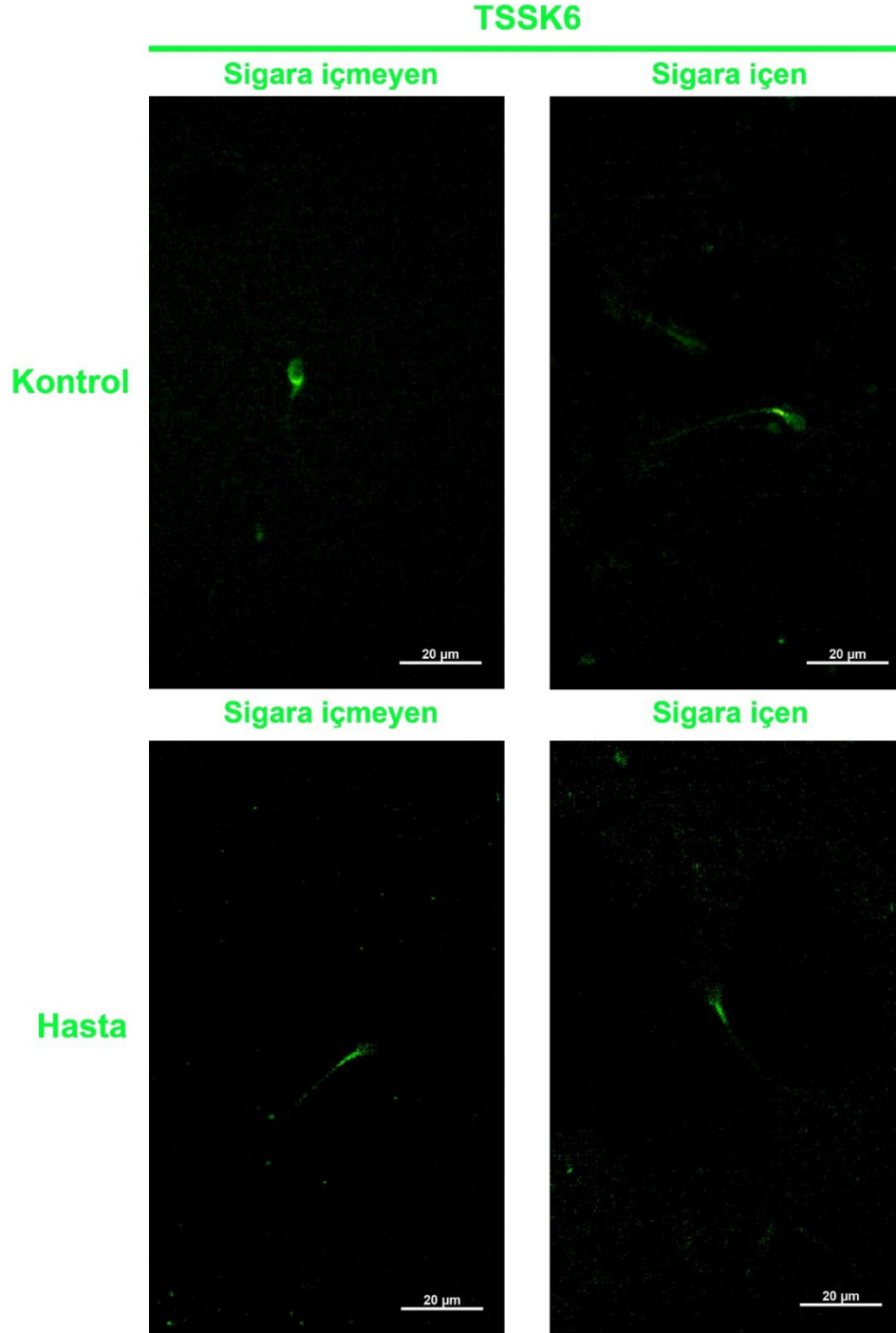
Şekil 4.1. Sigara içen ve sigara içmeyenlerde TSSK6 ekspresyonunun değişimini gösteren grafik

TSSK6 proteini hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamalı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Ayrıca, hasta spermindeki bu düşüşün, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamalı olduğu belirtilmiştir ($p<0,001$). Yani, çalışmamızda idiyopatik infertil hasta grubunda TSSK6 proteini ekspresyonu, öncesine çocuk sahibi olmuş fertil bireylerin sperminden daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.1).



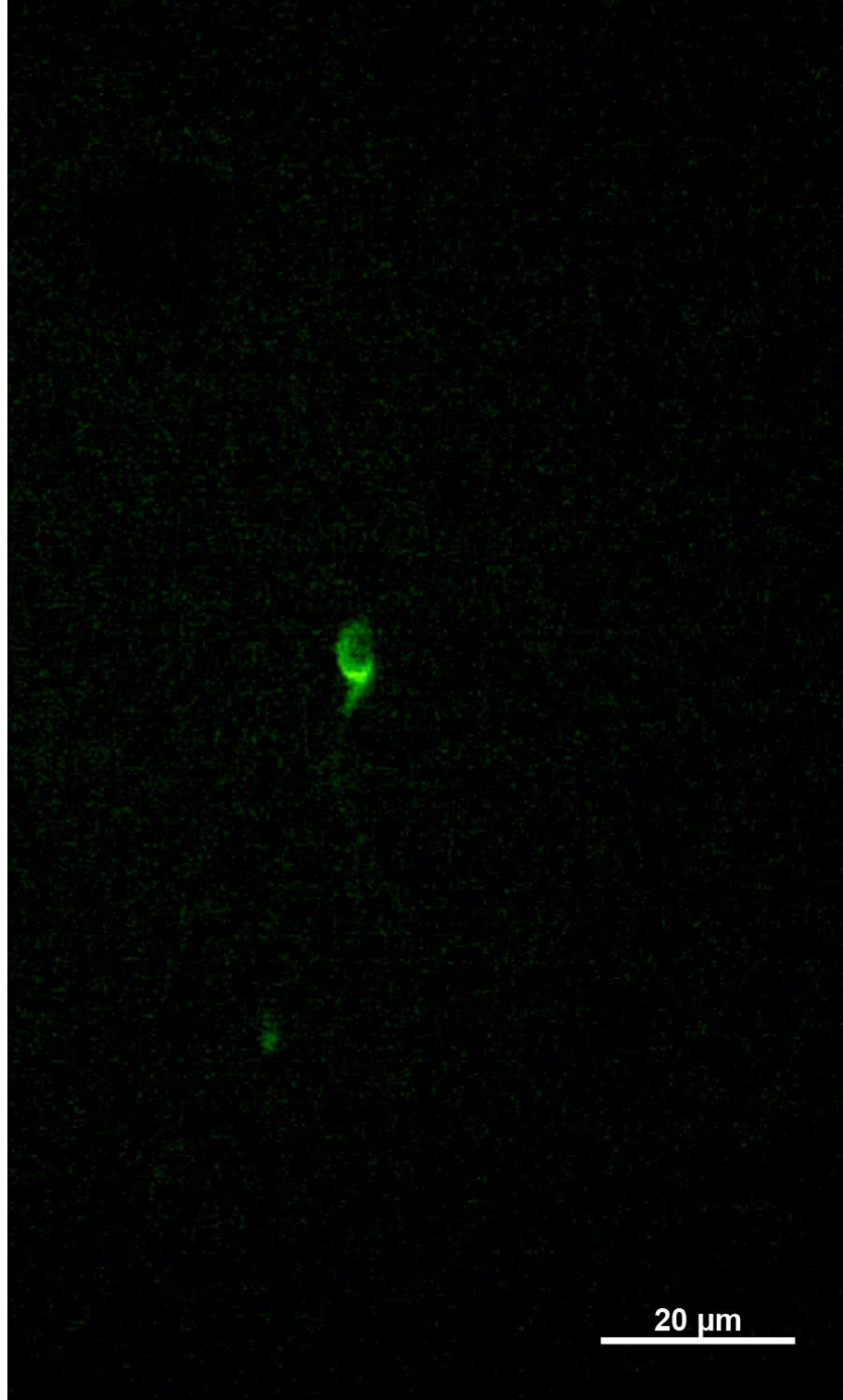
Şekil 4.2. İdiyopatik infertil hasta ve kontrol grubunda TSSK6 ekspresyonunun değişimini gösteren grafik

Bunun yanında, sigara içen hasta sperminde TSSK6 protein ekspresyonu sigara içen kontrol grubunun spermlerine kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$) (Şekil 4.2). Ayrıca, sigara içmeyen hastaların sperm TSSK6 protein ekspresyonu, sigara içmeyen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.2).



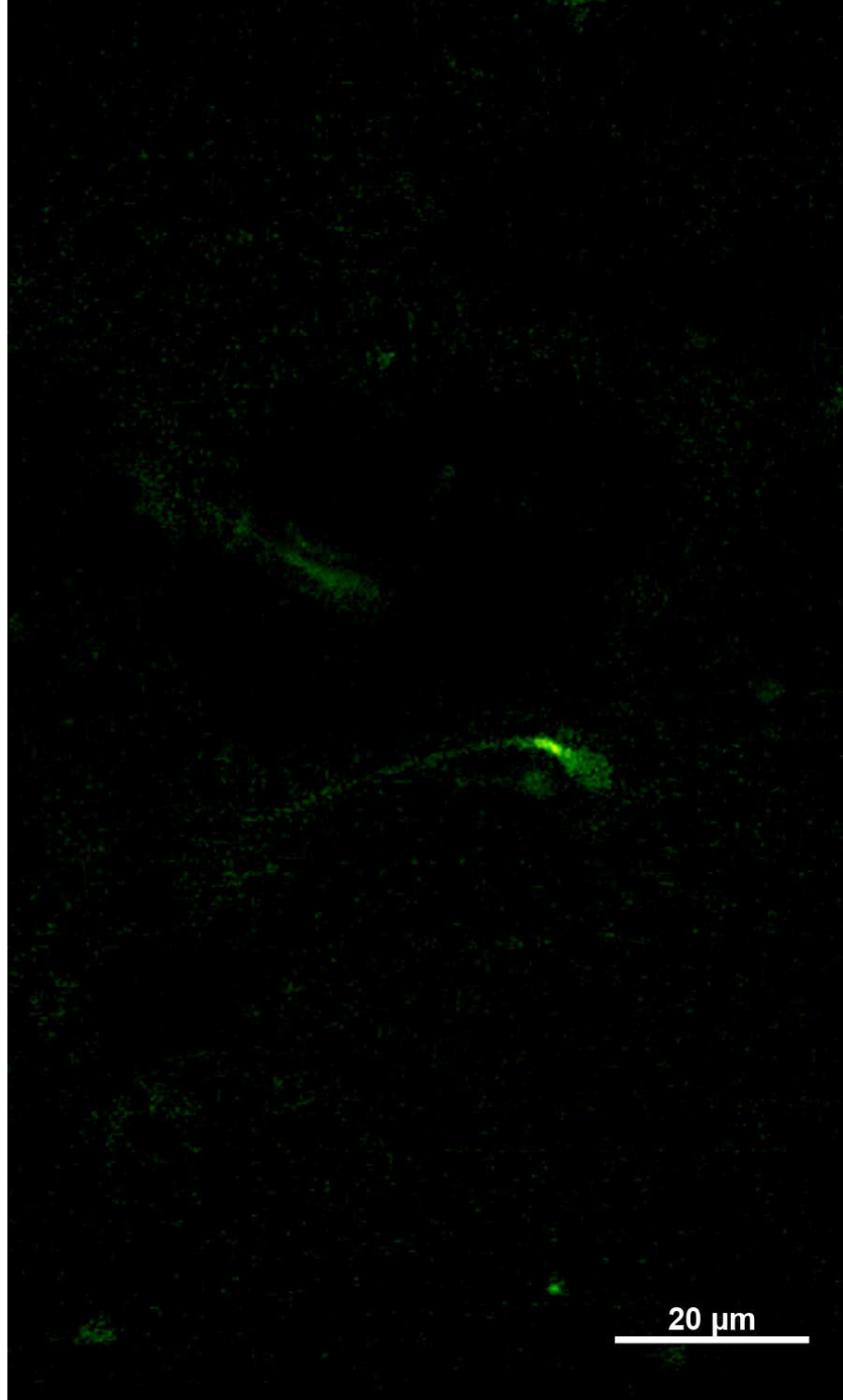
Şekil 4.3. Kontrol ve hasta gruplarında TSSK6 proteinin immünofloresan boyanma paterninin fotoğrafları. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.

Kontrol sigara içmeyen; kontrol grubumuzda sigara içmeyen gruptan alınan sperm yaymalarında TSSK6 proteinin ekspresyon paterni Şekil 4.4'de görüldüğü gibi spermin postakrozomal ve boyun kısmında yoğunlaştığı tespit edildi. Ayrıca bu grup, TSSK6 ekspresyonunun en yoğun görüldüğü gruptur (Şekil 4.4).



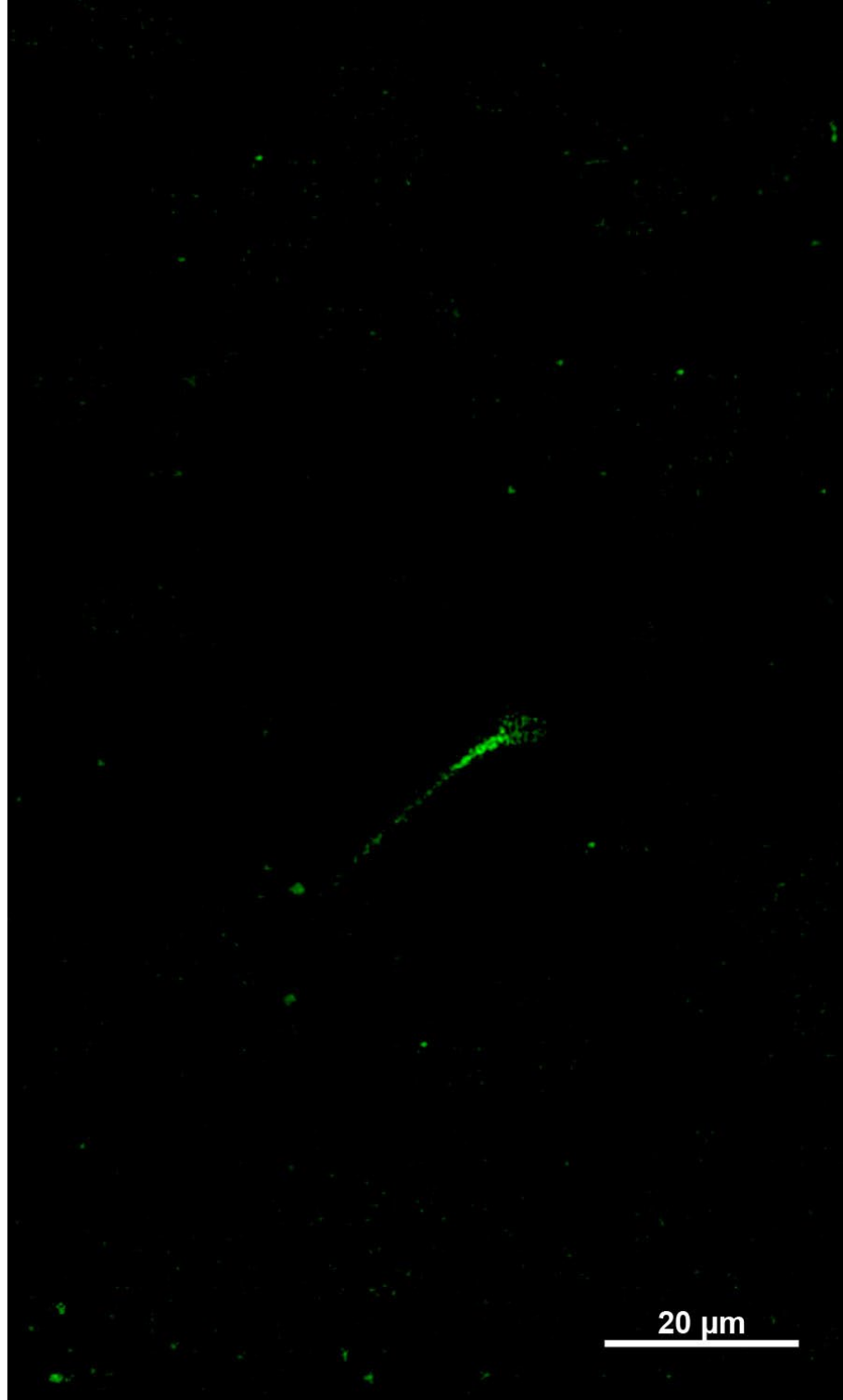
Şekil 4.4. Kontrol sigara içmeyen grup sperminde TSSK6 ekspresyonunun fotoğrafı. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.

Kontrol sigara içen; kontrol grubumuzda sigara içen gruptan alınan sperm yaymalarında TSSK6 proteinin ekspresyonu Şekil 4.5'de görüldüğü gibi ağırlıklı olarak spermin boyun bölgesinde yoğunlaştığı tespit edildi. Ayrıca bu grupta, TSSK6 proteinin ekspresyon yoğunluğu sigara içmeyenlere göre azaldığı tespit edildi (Şekil 4.5)



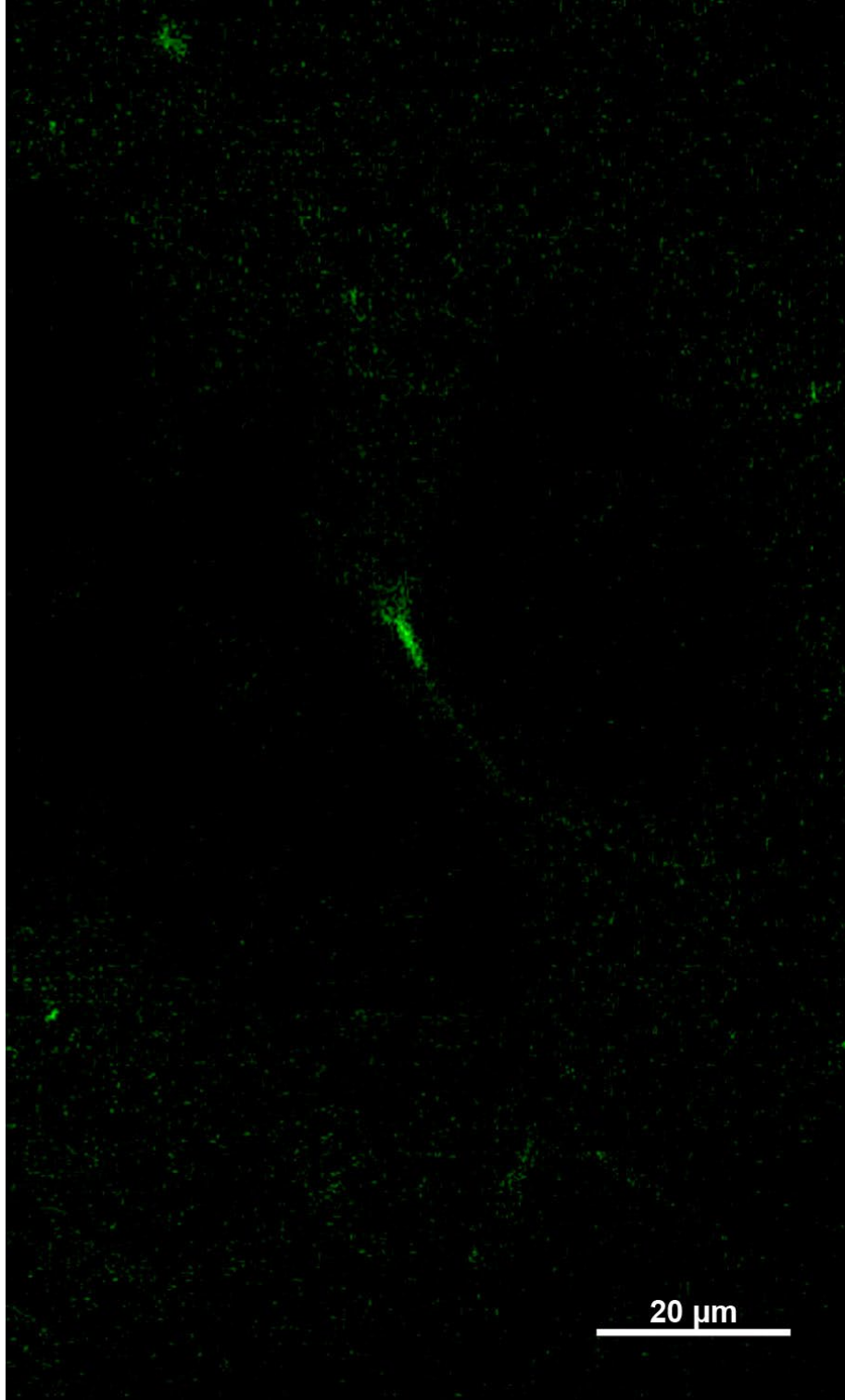
Şekil 4.5. Kontrol sigara içen grup sperminde TSSK6 ekspresyonunun fotoğrafı. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.

Hasta sigara içmeyen; hasta sigara içmeyen gruptan alınan sperm yaymalarında TSSK6 proteinin ekspresyonunun Şekil 4.6'da görüldüğü gibi ağırlıklı olarak spermin boyun bölgesinde yoğunlaştığı tespit edildi. Ayrıca bu grupta TSSK6 ekspresyonunun kontrol sigara içen ve içmeyen gruplara göre daha az olduğunu belirledik (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Hasta sigara içmeyen grup sperminde TSSK6 ekspresyonunun fotoğrafı.
Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.

Hasta sigara içen; Hasta sigara içen gruptan alınan sperm yaymalarında TSSK6 proteinin ekspresyonunun Şekil 4.7'da görüldüğü gibi ağırlıklı olarak spermin boyun bölgesinde yoğunlaştığı tespit edildi. Ayrıca bu grup, TSSK6 ekspresyonunun en düşük olduğu gruptur (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Hasta sigara içen grup sperminde TSSK6 ekspresyonunun fotoğrafı. Görüntü büyütmesi 400x'dir. Skala bar 20 mikrometredir.

4.2. TARTIŞMA

Erkeklerde infertilite, endüstriyel ülkelerde doğurganlık çağındaki çiftlerin %15'ini etkileyen yaygın bir durumdur [36]. İnfertilitedeki erkek faktörü, çift infertilitesinin yarısından fazlasını oluşturur ve bu durum sadece %30'unda belirlenebilmektedir [40]. Erkek kaynaklı infertilitenin yaklaşık %20'sinin nedeni belirlenebilmektedir. Geri kalanı ise nedeni belirlenemeyen idiyopatik olarak tanımlanmaktadır [8]. İnfertil çiftlerin erkek partnerlerinin ~%70'inde etiyolojik bir faktör bulunamamaktadır ve erkek infertilitesinin nedeni hala belirsizliğini korumaktadır. Yardımcı üreme teknikleri ile başlatılan fertilizasyon deneme döngü sayısı ile klinik gebelik sayısı arasındaki yüksek uyumsuzluk, yardımcı üreme tekniklerinin o kadar başarılı olmadığını ve sperm DNA hasarının ötesinde sperm kalitesi ile ilgili diğer faktörlerin de dikkate alınması gerektiğini göstermektedir [41], [42]. Sperm parametrelerini, diyet, egzersiz, obezite ve fizyolojik stres gibi kişisel etkenler, alkol, sigara ve anabolik steroidler gibi zararlı kimyasallar ve elektromanyetik radyasyon ve çevre kirliliği gibi çevresel faktörler etkilemektedir [39]. Bir sistemik derleme ve meta-analiz, sigara içmenin sperm kalitesini olumsuz etkilediğini göstermiştir. Özellikle sigara içen erkeklerde, sperm morfolojisinde anormallikler ve DNA hasarı riskinin arttığı gösterilmiştir. Sigara içme süresi ve sigaranın günlük içilen miktarının artmasıyla birlikte bu etkilerin daha belirgin olduğu bulunmuştur [45]. Sigara içen bireylerde, sigaranın sperm yoğunluğunda, hareketliliğinde, antioksidan aktivitesinde azalma ve morfolojisi üzerine olumsuz etki gösterdiği bildirilmiştir [52]. Sigara içen bireylerde sperm yoğunluğundaki azalma ortalama %22 ve doza bağımlı olarak değişmektedir. Dumansız tütün kullanımının da ayrıca çoklu semen parametreleri üzerinde doza bağlı olumsuz bir etkisi vardır [53]. Ayrıca sigara içen erkeklerde sperm yoğunluğunun ve hareketliliğinin daha düşük olduğu, sperm şekil bozukluklarının ise daha yüksek olduğu bulunmuştur [12]. Literatürde protein kinazların hücrelerde çeşitli hücresel işlevleri düzenlemek için sinyal iletiminde rol oynayan enzimler olduğu ve TSSK6'nın özellikle erkek üreme sistemi gelişimi ve işleviyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. TSSK6, hemen hemen yalnızca testiste ekspre edilen, fare sperminde arka baş ve perforatoryumu içeren polimerize aktin ile zenginleştirilmiş bir sperm bölgesinde lokalize olan bir serin/treonin protein kinazıdır. TSSK6'nın olmadığı fareler sterildir ve spermatozoaları normal seviyelerde spontan akrozomal reaksiyon gösterir, fakat *in vitro* olarak yumurtalarla kaynaşamazlar [16]. Bunun nedeni ise, füzyonun gerçekleşmesi için, akrozom reaksiyonu olarak bilinen süreç sırasında Izumo1 proteininin ön baştan

postakrozomal bölmeye taşınması gerekliliğidir. TSSK6'dan yoksun sperm, akrozom reaksiyonu sırasında Izumo1'in yerini değiştiremez [16]. Tüm bu bulgular, TSSK6'nın farelerde fertilité için gerekliliğini vurgular ve insanlarda da buna benzer bir işlevi olabileceğini düşündürmektedir. Bizde bu çalışmada idiyopatik infertilitesi olan hasta spermelerinde, sperm yumurta füzyonu için hayati öneme sahip olan TSSK6 proteinini ekspresyonunun fertil sağlıklı bireylere göre nasıl değiştiğini ve fertil ve infertil bireylerde sigara içmenin TSSK6 ekspresyonu üzerine etkisinin olup olmadığını araştırdık.

Bu çalışmada idiyopatik normospermik infertil hasta spermelerinde, TSSK6 ekspresyonun daha önce çocuk sahibi olmuş fertil bireylerden oluşan kontrol grubu spermelerine kıyasla azaldığını belirledik. TSSK6 geninin erkek farelerde susturulması sonrası, infertiliteye sebep olduğu ve sperm sayısının azaldığı, sperm hareketliliğinin azaldığı, anormal şekilli sperm yüzdesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir [54]. TSSK6'dan yoksun fareler, DNA yoğunlaşma kusurları ve anormal morfoloji ve azalmış motilitéye sahip spermeleri ortaya çıkarır. TSSK6, germ hücrelerinde postmayotik olarak eksprese edilir [16]. TSSK6, spermiyogenez sırasında γ H2AX oluşumu için gereklidir. γ H2AX histondan protamin geçişi sağlayan ve erkek infertilitesi ile bağlantılı bir komplekstir [55]. TSSK6'nın sperm DNA yoğunlaşması ve kromatin yeniden şekillenmesinde temel bir rolü vardır [17]. Ayrıca TSSK6'nın baskılandığı fare spermelerinde dört ana morfolojik kusur ortaya çıkmıştır. Bu kusurlar çok sayıda ayırık başa, başın geriye doğru yanlış rotasyonu, kuyruktaki saç tokası görüntüsü şeklinde katlanma ve kuyruktaki saç tokası görünüm ve başın arkaya doğru rotasyonunun birlikteliği şeklinde gözlenmiştir. Spermin geri kalanı normal morfoloji göstermiştir [49]. Ayrıca herhangi bir somatik anomalisi olmayan TSSK6 baskılanmış fare spermeleri zona pellucidadan içeri girebilir ancak yumurta plazması membranı ile birleşemez. Bu nedenle, TSSK6 yumurta füzyonu için gereklidir [16]. Yukarıda verilen birçok çalışma birlikte değerlendirildiğinde TSSK6'nın baskılanması normal sperm sayısında ve sperm hareketliliğinde azalma, anormal şekilli sperm yüzdesinde artma, DNA yoğunlaşma kusurları, sperm baş ve kuyruk anomalilerinde artış ve sperm yumurta füzyonunda başarısızlığa neden olabileceği anlaşılmaktadır. Bizim çalışmamızda da idiyopatik normospermik infertil hasta spermelerinde, baskılanmış TSSK6 ekspresyonu normal sperm sayısında ve sperm hareketliliğinde azalmaya, anormal şekilli sperm yüzdesinde artmaya, DNA yoğunlaşma kusurlarına, sperm baş ve kuyruk anomalilerinde artışa ve sperm yumurta füzyonunda

başarısızlığa neden olmuş olabilir. TSSK6 ekspresyonunun azalması hastalarda gözlenen idiyopatik infertilite için bir açıklama olabilir.

Bu çalışmada daha önce çocuk sahibi olmuş fertil bireylerden oluşan kontrol grubu ve idiyopatik normospermik infertil hasta gruplarındaki bireylerden, grupların kendi içlerinde sigara içenlerin TSSK6 ekspresyonunun sigara içmeyenlere göre azaldığı belirlendi. Daha önce sigara içmenin sperm kalitesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca yukarıda verilen birçok çalışma TSSK6'nın normal sperm morfolojisi, sayısı ve sperm hareketliliğinde, DNA yoğunlaşmasında ve sperm yumurta füzyonunda önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Yukarıda sigara ile ilgili verilen literatür bilgisine göre sigara içen erkeklerde sperm yoğunluğu, hareketliliği ve antioksidan aktivitesinde azalma, sperm morfolojisinde anormalliklerin ve DNA hasarı riskinin arttığı anlaşılmaktadır. Bu çalışmada, kontrol ve idiyopatik infertilite hastalarının sigara içenlerinde, sigara içmeyenlere göre azalmış TSSK6 ekspresyonu gözlemlendi. Bu azalışın nedeninin sigara ile alakalı olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla sigara içmek, erkeklerde sperm yoğunluğu ve hareketliliğinde azalmaya, antioksidan aktivitesinde azalmaya, sperm morfolojisindeki anormalliklerin ve DNA hasarı riskinin artmasına neden olmanın yanında sperm-yumurta füzyonunda önemli rol alan TSSK6 ekspresyonunu da azaltarak idiyopatik erkek infertilitesini daha da şiddetlendiriyor olabilir.

5. SONUÇ

Erkek infertilitesi, çift infertilitesinin yarısından fazlasını oluşturmaktadır [40]. Bunların da büyük bir kısmı nedeni belirlenemeyen idiyopatik erkek infertilitesi olarak tanımlanmaktadır. Etiyolojik faktörlerin belirlenemediği, nedeni açıklanamayan idiyopatik erkek infertilitesinin yönetimi hem klinisyen hem de çözüm arayan çiftler için zorlu bir süreçtir [8]. Bu çalışmada idiyopatik hastalarda, normal sperm morfolojisi, sperm sayısı ve sperm hareketliliğinde, DNA yoğunlaşmasında ve sperm yumurta füzyonunda oldukça önemli olan TSSK6 proteini araştırıldı ve hastalardaki nedeni belirlenemeyen infertiliteye bir açıklama getirilmeye çalışıldı. Sonuç olarak, idiyopatik erkek infertilitesi olan ve sigara içen hastalarda, açıklanamayan infertilite sebeplerinden biri sayılabilecek sperm yumurta füzyonunda önemli olan TSSK6 protein ekspresyonunun azaldığını belirledik.

6. KAYNAKLAR

- [1] E. Dođantekin, S. Özcan, "Çevresel etkenler ve spermatogenez," *Androloji Bülteni*, c. 18 sayı 66, ss. 183-187, 2016.
- [2] Ö. Güner, & O. Kavlak, "Kadmiyumun erkek üreme sistemi üzerine etkisi," *Androloji Bülteni*, c. 19, sayı 3, ss. 86–91, 2017.
- [3] H. Hatipođlu, & M. Altındış, "Cinsel yolla bulaşan hastalıkların erkek infertilitesi ile ilişkisi," *Androloji Bülteni*, c. 18, sayı 67, ss. 269-274, 2016.
- [4] B. Yılmaz, N. Özerdoğan, & Y. Hamlacı, "Çalışma Hayatının Erkek Üreme Sağlığına Etkisi," *Androloji Bülteni*, c. 19, sayı 1, ss. 16-22, 2017.
- [5] E. Koyun, "Obezitenin Sperm Fonksiyonlarına Etkisi," *Androloji Bülteni*, c. 15, sayı 54, ss.185-189, 2013.
- [6] H. Sezgin, & Ç. Hocaođlu, "Psychiatric Aspects of Infertility," *Psikiyatride Guncel Yaklasimler - Current Approaches in Psychiatry*, c. 6, sayı 3, 2014.
- [7] E. S. Pelit, B. Katı1, Y. Akın, & E. Yeni, "Çevresel Stres Faktörlerinin Sperm Hücreleri Üzerine Etkisi," *Androloji Bülteni*, c. 19, sayı 2, ss. 61-64, 2017.
- [8] E. Tokuç, & M. Öztürk, "Erkek İnfertilitesinin Cerrahi Dış Tedavisi: Spesifik Olmayan Tedavi," *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, c. 24, sayı Special Issue, ss. 26 - 29, 2022.
- [9] A. Agarwal, S. Baskaran, N. Parekh , C.L. Cho, R. Henkel, S. Vij ,...& R. Shah, "Male Infertility," *Lancet*, c. 397, sayı 10271, 319-333, 2021.
- [10] T. Hendriks, R.V. Dijk & N.A. Alsabaan, "Active Tobacco Smoking Impairs Cardiac Systolic Function," *Sci Rep*, c. 10, sayı 1, ss. 6608, 2020.
- [11] Z.H. Zhang, H.B. Zhu, L.L. Li, Y. Yu, H.G. Zhang. & R.Z. Liu, "Decline of semen quality and increase of leukocytes with cigarette smoking in infertile men," *Iran J Reprod Med*, c. 11, sayı 7 ss. 589-96, 2013.
- [12] R. Sharma, A. Harlev, A. Agarwal & S.C. Esteves, "Cigarette Smoking and Semen Quality A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen," *Eur Urol*, c. 70, sayı 4, ss. 635-645, 2016.
- [13] H. Trummer, H. Habermann, J. Haas & K. Pummer, "The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones," *Hum Reprod*, c. 17, sayı 6 ss. 1554-9, 2002.

- [14] S.D Brucker, P. Drakopoulos, E. Dhooghe, J.D. Geeter, V. Uvin, S.S. Ribeiro, ... & M.D. Brucker, "The effect of cigarette smoking on the semen parameters of infertile men," *Gynecol Endocrinol*, c. 36, sayı 12, ss. 1127-1130, 2020.
- [15] P.E. Visconti, H.Z. Purdon, M.A.P. Stein, B.R. Balsara, J.R. Testa, J.C. Herr, ...& G.S. Kopf, "Cloning and chromosomal localization of a gene encoding a novel serine/threonine kinase belonging to the subfamily of testis-specific kinases," *Genomics*, c. 77, sayı 3 cc. 163-70, 2001.
- [16] J. Sosnik, P.V. Miranda, N.A. Spiridonov, S.Y. Yoon, R. A. Fissore, G.R. Johnson, ...& P.E Visconti, "Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse," *J Cell Sci*, c. 122, sayı 15, ss. 2741-9, 2009.
- [17]. A.M. Salicioni, M.G. Gervasi, J. Sosnik, D.A. Tourzani, S. Nayyab, D.A. Caraballo & Pablo E Visconti, "Testis-specific serine kinase protein family in male fertility and as targets for non-hormonal male contraception," *Biol Reprod*, c. 103, sayı 2 ss. 264-274, 2020.
- [18] A. Kumar, "Loss of Tssk6 causes male infertility due to a defect in spermatogenesis in mice," *Mol. Hücre Biyo.*, c. 9, sayı 1-14, 2019.
- [19] B. Gellen, "Testis-specific serine kinase 6 (TSSK6) gene polymorphisms and the risk of male infertility in German patient," *Biol Reprod*, c. 50, sayı 5, 2018.
- [20] E. Babbie, "The practice of social research. Cengage Learning," *Curruent Urban Studies*, c. 8, sayı 4, 2020.
- [21] Young B., O'Dowd G., Woodford P., *Male reproductive system, in Wheater's Functional Histology A Text and Colour Atlas*, 6.baskı, Philadelphia, A.B.D.: Elsevier, 2014.
- [22] Anthony L, M., *Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas*. Erkek Üreme Sistemi, 14. Baskı, İstanbul, Türkiye: Güneş Tıp, 2019.
- [23] Ross, M.H., Pawlina W., *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji*. Erkek Üreme Sistemi, 6. baskı, İstanbul, Türkiye: Palme Yayıncılık, 2014.
- [24]. A.G.López, G. M. Rodríguez, & C. Sarasquete, "Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry," *Histol Histopatol*, c. 20, sayı 4, ss. 1179-89, 2005.
- [25] Moore K.L, Persued T.V.N., Torchia M.G., *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*, 10. Baskı, İstanbul, Türkiye: Nobel Kitap Evi, 2016.
- [26] K. Ağras, "İnmemiş Testiste Embriyoloji ve Testiküler İniş Mekanizmaları *Embryology of Undescended Testis and Mechanisms of Testicular Descent*" *Türk Urol Sem*, c. 3, sayı 1, ss. 17-22, 2012.
- [27] R. Büyükkaya, A. Büyükkaya, B. Erdoğan, B. Yazıcı, A.A. Şafak, ...& Ö.

Yazgan, ‘‘Tunica albuginea kisti ve eşlik eden skrotal kalkül olgusu ,’’ *Abant Tıp Dergisi*, c. 2, sayı 1, ss. 40-42, 2013.

- [28] Junqueira L.C., Carneiro J., *Temel Histoloji*. Erkek Üreme Sistemi, İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitapevi, 2009.
- [29] Anthony, M.L., (2019), *Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas*, A.E. Seyhun Solakoğlu, H.S. Mutlu (eds), İstanbul: Güneş Tıp Kitapevleri.
- [30] D. Goux, J.D. Coudert, D. Maurice, L. Scarpellino, G. Jeannet, S. Piccolo, ...& W. Held, "Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival," *Blood*, c.106, sayı 5, ss. 1726-33, 2005.
- [31] Gartner L.P., Hiatt J.L., *Renkli Histoloji Atlası*. A. Dağdeviren, F.S. Müftüoğlu, G. Karabağ (eds), İstanbul: Güneş Tıp Kitapevi. 369-386.
- [32] Junqueira, L.C., Carneiro J., (2006) *Temel Histoloji*, Y. Aytekin, S. Solakoğlu (eds), İstanbul: Nobel. 431.
- [33]. A. Obaidli, & A. Busaidi, Semen analysis, "Its indications, interpretation, and clinical relevance," *Oman Medical Journal*, c. 35 sayı 5, ss. 165, 2020.
- [34] F. Boitrelle, R. Shah, R. Saleh , R. Henkel, H. Kandil, E. Chung ...& A. Agarwal, "The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis," A Critical Review and SWOT Analysis. *Life (Basel)*, c. 11, sayı 12, ss. 1368, 2021.
- [35] İ. Şahin, L. Canat, "Sperm count, motility, and morphology," *Turkish Journal of Urology*, c. 45 ss. 21-26, 2019.
- [36] A.M. Agarwal, A. Hamada, "A unique view on male infertility around the globe," *Reprod Biol Endocrinol*, c 13, sayı 37, 2015.
- [37] *Report of the Meeting on the Prevention of Infertility at the Primary Health Care Levels*, W.H. Organization, Genova, İsviçre, 1983.
- [38] R.B.C. Atik, J. Elson, A.M. Kolte, S. Lewis, S. Middeldorp, W. Nelen, ...& B. Peramo, "Quenby, S., Recurrent pregnancy loss," *Hum. Reprod*, c. 4, sayı 2, 2018.
- [39] Y. Barazani, B.F. Katz, H.M. Nagler, D.S. Stember, "Lifestyle, environment, and male reproductive health," *Urol Clin North Am*, c. 41, sayı 1, ss. 55-66, 2014.
- [40] D.L.V. Valenti, S. L. Vignera, R.A. Condorelli, R. Rago, N. Barone, Enzo Vicari, ...& E. Calogero, "Follicle-stimulating hormone treatment in normogonadotropic infertile men," *Nat. Rev. Urol.* c. 10 ss. 55-62, 2013.
- [41] M.P. Punab, O. Poolamets, P. Paju, V. Vihlajev, K Pomm, R Ladv, ...& M Laan, "Causes of male infertility: A 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts," *Hum. Reprod*, c. 32 sayı 1, ss. 18-31, 2017.

- [42] F.R. Tüttelmann, C. Ruckert, & A. Röpke, "Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine," *Med. Genet.*, c. 30, sayı 1, ss. 2-20, 2018.
- [43] Z.B. Meri, İ.B. Irshid, M. Migdadi, A.B. Irshid, & S.A. Mhanna, "Does cigarette smoking affect seminal fluid parameters? A comparative study," *Oman Med J*, c. 28 sayı 1 ss. 12-5, 2013.
- [44] Y. Li, , H. Lin, Y. Li, & J. Cao, "Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses," *Fertil Steril*, c. 95 sayı 1, ss. 116-23, 2011.
- [45] R. Künzle, M.D. Mueller, W. Hänggi, M.H. Birkhäuser, H. Drescher, & N.A Bersinger, "*Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples: a study of 1,578 patients:*" c. 79, sayı 2, ss. 287-91, *Fertil Steril*, 2003.
- [46] W. Bielke, R.J. Blaschke, G.C. Miescher, G. Zürcher, A.C. Andres, & A. Ziemiecki "Characterization of a novel murine testis-specific serine/threonine kinase," *Gene*, c. 139, sayı 2, ss. 235-9, 1994.
- [47] Z. Hao, , K.N. Jha, Y.H. Kim, S. Vemuganti, V.A. Westbrook, O. Chertihin, ...& P.E. Visconti "Expression analysis of the human testis-specific serine/threonine kinase (TSSK) homo logues. A TSSK member is present in the equatorial segment of human sperm," *Mol Hum Reprod* c. 10, sayı 6, ss. 433-444, 2004.
- [48] P. Shang, W.M. Baarends, J. Hoogerbrugge, M.P. Ooms, W.A Cappellen, A.A.W. Jong, ...& J.A. Grootegeod "Functional transformation of the chromatid body in mouse spermatids requires testis-specific serine/threonine kinases" *J Cell Sci*, c. 123, sayı 1, ss. 331-339, 2010.
- [49] Y. Li, J. Sosnik, L. Brassard, M. Reese, N.A. Spiridonov, T.C. Bates, ...& A.M. Salicioni, "Expression and local ization of five members of the testis-specific serine kinase (Tssk) fam ily in mouse and human sperm and testis," *Mol Hum Reprod*. c. 17 sayı 1, ss. 42-56, 2011.
- [50] P.E. Visconti, Z. Hao, M.A. Purdon, P. Stein, B.R. Balsara, J.R. Testa, ...& G.S Kopf, "Cloning and chromosomal localization of a gene encoding a novel serine/threonine kinase belonging to the subfamily of testis-specific kinases," *Genomics*, c. 77, sayı 3, ss. 163-170, 2001.
- [51] Y. Li, J. Sosnik, L. Brassard, M. Reese, N.A. Spiridonov, T.C. Bates, ...& A.M. Salicioni, "Expression and local ization of five members of the testis-specific serine kinase (Tssk) fam ily in mouse and human sperm and testis," *Mol Hum Reprod*. c. 17 sayı 1, ss. 42-56, 2011.
- [52] F.F. Pasqualotto, F.M. Umezu, M. Salvador, E. Borges, B.P. Sobreiro, & E.B. Pasqualotto, "Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study," *Fertil Steril*, c. 90 sayı 2, ss. 278-83, 2008.

- [53] T.M. Said, , G. Ranga, & A. Agarwal, "Relationship between semen quality and tobacco chewing in men undergoing infertility evaluation," *Fertil Steril*, c. 84, sayı 3, ss. 649-53, 2005.
- [54] N.A. Spiridonov, L. Wong, P.M. Zerfas, M.F. Starost, S.D. Pack, C.P. Paweletz, & Gibbes R Johnson, "Identification and characterization of SSTK, a serine/threonine protein kinase essential for male fertility," *Mol Cell Biol*, c. 25 sayı 10, ss. 4250-61, 2005.
- [55] K.N. Jha, S.K. Tripurani, & G.R. Johnson, "TSSK6 is required for gammaH2AX formation and the histone-to-protamine transition during spermiogenesis," *J Cell Sci*, c. 130 sayı 10, ss. 1835-1844, 2017.



7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Fulya ÖZARAS

Yabancı Dili: İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU			
Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Mikrobiyoloji	Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Düzce Üniversitesi	2011
Lisans	Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi / Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2007
Ön Lisans		Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu / Uludağ Üniversitesi	1999
Lise		Atatürk Lisesi	1997

YAYINLAR

1. F. Özaras, E. Çalışkan & E.C. Öztürk, “Bayan Kuaför ve Güzellik Merkezi Çalışanlarının Hijyen-Bulaşıcı Hastalıklar Konularında Bilgi Düzeylerinin Değerlendirilmesi ve Kan Yoluyla Bulaşan Hastalıklar ile Onikomikoz Yönünden İncelenmesi”, *Viral Hepatitis Journal*, c. 19, sayı 3, ss. 115-118, 2013.
2. E.C. Öztürk, E. Çalışkan, H. Ankaralı & F. Özaras, “Öğrencilerde Bağırsak Parazitlerinin ve Hijyen Bilgi Düzeylerinin Araştırılması”, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, c. 39, sayı 4, ss. 277-285, 2015.