



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**OBEZ ERKEKLERDE SEMEN MİKROBİYOMUNUN YENİ
NESİL DİZİLEME İLE FERTİLİTE AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Elzem Nisa BARHAN

Danışman
Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

SAMSUN
2023

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**OBEZ ERKEKLERDE SEMEN MİKROBİYOMUNUN YENİ NESİL
DİZİLEME İLE FERTİLİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Elzem Nisa BARHAN

Danışman

Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.22.022 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☒ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☐

23/06/2023

Elzem Nisa BARHAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : OBEZ ERKEKLERDE SEMEN MİKROBİYOMUNUN YENİ NESİL DİZİLEME İLE FERTİLİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 07.07.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

07/07/2023

Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

ÖZET

OBEZ ERKEKLERDE SEMEN MİKROBİYOMUNUN YENİ NESİL DİZİLEME İLE FERTİLİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elzem Nisa BARHAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Ağustos/2023

Danışman: Unvanı Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Amaç: Tez çalışmasında, obez erkeklerin semenlerinde bulunan mikrobiyal içerik ve çeşitliliğin incelenmesi, infertil ve fertil gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi, ayrıca seminal mikrobiyotanın semen parametreleri, sperm DNA fragmentasyonu (SDF), sperm kromatin kondensasyonu ve total antioksidan kapasite (TAC) üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Materyal ve metot: Vücut kitle indeksi (BMI) değeri 30 kg/m²'nin üzerinde olan 18-55 yaşları arasında 13 obez infertil ve kontrol grubu olarak 5 obez fertil erkek çalışmaya dahil edilmiştir. Mikrobiyom analizi için 16S ribozomal RNA geninin V3 ve V4 bölgeleri, yeni nesil dizileme tekniklerinden amplikon dizileme yöntemiyle dizilenmiştir. SDF, TUNEL testi ile; TAC, ELISA testi ile ve histonca zengin sperm yüzdesi, anilin mavisi boyama yöntemi ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Her iki grupta da en bol bulunan bakterilerin *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* ve *Bacteroidota* şubelerine ait olduğu görüldü. Cins düzeyinde en yaygın bulunan bakteriler ise iki grupta da benzer dağılımlara sahip olan *Pseudodescherichia*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Streptococcus*, *Klebsiella* ve *Moraxella* olarak belirlendi. TAC değerleri, infertil grupta $2,87 \pm 0,21$ ve kontrol grubunda $2,69 \pm 0,20$ ortalamaya sahipti. SDF'in obez infertil erkeklerde (ort: $1,39 \pm 3,27$), obez fertil erkeklerden (ort: $12,10 \pm 4,93$) daha yüksek olduğu görüldü. Kontrol grubunda histonca zengin sperm yüzdesi değerlerinin (ort: $33,68 \pm 15,65$) infertil gruptan (ortalama: $48,15 \pm 19,14$) daha düşük olduğu gözlemlendi. Ancak, bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla, $p=0,127$; $p=0,564$; $p=0,172$). Anilin pozitif sperm yüzdesi ile motilite ($p<0,0001$), sperm konsantrasyonu ($p=0,0001$) ve total sperm sayısı ($p=0,001$) arasında negatif yönlü ilişki gözlemlendi. *Brevibacterium*, *Paenibacillus*, *Alistipes*, *Lactiplantibacillus*, *Rhizobacter*, *Sphingomonas* ve *Veillonella* cinslerinin sperm DNA fragmentasyonu; *Pantoea*, *Devosia*, *Bacteroides*, *Acidovorax* cinslerinin total antioksidan kapasite; *Fusobacterium* cinsinin anilin pozitif sperm yüzdesi; *Corynebacterium*, *Hydrogenophaga*, *Paenalcagenes* cinslerinin BMI ile korelasyon gösterdiği belirlendi.

Sonuç: Semende bulunan bakteri cinsleri, semen kalitesi, sperm DNA fragmentasyonu veya total antioksidan kapasite üzerinde etkili olarak erkek infertilitesinde rol oynuyor olabilir. Çalışma örnekleminin oldukça küçük oluşu ($n=18$) göz önünde bulundurulduğunda, daha büyük bir örneklem ile daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi beklenebilir.

Anahtar Sözcükler: Erkek infertilitesi, Seminal mikrobiyom, Obezite, Sperm DNA fragmentasyonu, Total antioksidan kapasite, Sperm kromatin kondensasyonu

ABSTRACT

EVALUATION OF THE SEMEN MICROBIOME FOR FERTILITY IN OBESE MEN WITH NEXT-GENERATION SEQUENCING

Elzem Nisa BARHAN
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Medical Biology Programme
Master, August/2023
Supervisor: Prof. Dr. Sezgin GUNES

Objective: In the thesis study, it was aimed to examine the microbial content and diversity in semen samples of obese men, to determine the differences between infertile and fertile groups, and to investigate the effects of seminal microbiota on semen parameters, sperm DNA fragmentation (SDF), sperm chromatin condensation, and total antioxidant capacity.

Material and method: Thirteen obese infertile men aged 18-55 years with a BMI over 30 kg/m² and five obese fertile men as the control group were included in the study. For microbiome analysis, the V3 and V4 regions of the 16S ribosomal RNA gene were sequenced using the amplicon sequencing method, which is one of the next-generation sequencing techniques. Sperm DNA fragmentation was analyzed by TUNEL test, total antioxidant capacity was analyzed by ELISA test and histone-rich sperm percentage was analyzed by the aniline blue staining method.

Results: It was seen that the most abundant bacteria in both groups belonged to the phylum of *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* and *Bacteroidota*. The most common bacteria at the genus level were *Pseudodescherichia*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, and *Moraxella*, which had similar distributions in both groups. Total antioxidant capacity values were 2.87 ± 0.21 in the infertile group and 2.69 ± 0.20 in the control group. Sperm DNA fragmentation was found to be higher in obese infertile men (mean: 1.39 ± 3.27) than in obese fertile men (mean: 12.10 ± 4.93). It was observed that histone-rich sperm percentage values in the control group (mean: 33.68 ± 15.65) were lower than the infertile group (mean: 48.15 ± 19.14). However, these differences were not statistically significant ($p=0.127$; $p=0.564$; $p=0.172$, respectively). A negative correlation was observed between the percentage of aniline-positive sperm and motility ($p<0.0001$), sperm concentration ($p=0.0001$) and total sperm count ($p=0.001$). It was determined that *Brevibacterium*, *Paenibacillus*, *Alistipes*, *Lactiplantibacillus*, *Rhizobacter*, *Sphingomonas* and *Venlonella* genera were correlated with SDF; *Pantoea*, *Devosia*, *Bacteroides*, *Acidovorax* genera were correlated with TAC, *Fusobacterium* genera was correlated with the percentage of aniline-positive sperm, and *Corynebacterium*, *Hydrogenophaga*, and *Paenalcagenes* genera were correlated with BMI.

Conclusion: Bacterial species in semen may play a role in male infertility by affecting semen quality, sperm DNA fragmentation or total antioxidant capacity. Considering the relatively small size of the study sample ($n=18$), more meaningful results can be expected with a larger sample.

Keywords: Male infertility, Seminal microbiome, Obesity, Sperm DNA fragmentation, Total antioxidant capacity, Sperm chromatin condensation

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yalnızca tez çalışmam konusunda değil aynı zamanda hayatımın pek çok alanında bana sonsuz katkılar sunan, zaman mekan ayırt etmeksizin değerli vaktini ve ilgisini asla esirgemeyen, her an desteğini hissettiğim, öğrencisi olmaktan daima gurur duyacağım sayın danışman hocam Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e; gerek laboratuvar çalışmaları sırasında gerekse ihtiyaç duyduğum her anda çekinmeden kapısını çaldığım ve kıymetli tecrübelerinden sonuna kadar faydalandığım Dr. Öğr. Üyesi Gülgeç Neslihan TAŞKURT HEKİM'e, takıldığım her noktada fikirlerine başvurduğum Doç. Dr. Sercan ERGÜN'e; çalışmanın şekillenmesi ve hastaların katılımıyla hayat bulması noktasındaki desteği için sayın Prof. Dr. Ramazan AŞÇI'ya, verilerin istatistiksel analizini gerçekleştirerek çalışmanın nihayete ermesine yardım eden Dr. Ralf HENKEL'e, çalışmanın en önemli aşamalarından olan örneklerin toplanması sırasındaki yardımları için Biyolog Gökhan ZENGİN'e, yüksek lisans ders aşamasındaki katkıları için değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten KARA, Doç. Dr. Şengül TURAL ve Doç. Dr. Mehmet Alper ARSLAN'a ve birlikte olmaktan son derece keyif aldığım bölüm arkadaşlarıma,

Son olarak, her zaman yanımda olan, yüzümü güldüren, yol arkadaşım, sevgili eşim Alihan ALKAN'a, tez sürecimde hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, işimi kolaylaştırmak için elinden ne gelirse yapan ve benden çok yorulan aileme; varlığından güç aldığım kıymetli annem Sevda BARHAN ve babam Ahmet BARHAN'a sabırları, anlayışları ve katkıları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elzem Nisa BARHAN

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İnfertilite	4
2.1.1. İnfertilite Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Erkek İnfertilitesi	5
2.1.3. Spermatogenez.....	6
2.1.4. Semen Analizi.....	8
2.1.5. Sperm DNA Fragmentasyonu.....	10
2.1.6. Total Antioksidan Kapasite	12
2.2. Mikrobiyota	14
2.2.1. Beslenme, Obezite ve Mikrobiyota	16
2.3. Obezite ve Erkek İnfertilitesi.....	18
2.4. Beslenme ve İnfertilite	18
2.5. Mikrobiyota ve Erkek İnfertilitesi	19
2.5.1. Seminal Mikrobiyom	19
2.6. Mikrobiyota Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler.....	26
2.6.1. Kültür Temelli Yöntemler	26
2.6.2. Kültürden Bağımsız Yöntemler	26
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Etik Kurul İzni.....	31
3.2. Materyal.....	31
3.2.1. Örneklerin Eldesi	32
3.3. Metot.....	33
3.3.1. Örneklerin Ön Hazırlığı.....	33
3.3.2. Anilin Mavisı Boyaması	35
3.3.3. TUNEL Analizi	35
3.3.4. ELISA Testi	38
3.3.5. Mikrobiyom Analizi	39
3.3.6. İstatistiksel Analiz	41

3.3.6. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Semen Parametreleri.....	42
4.2. Anilin Mavisi Boyaması.....	44
4.4. Total Antioksidan Kapasite	46
4.5. Mikrobiyom Analizi	47
4.5.1. Şube Seviyesi.....	48
4.5.2. Sınıf Seviyesi	49
4.5.3. Takım Seviyesi	50
4.5.4. Aile Seviyesi	51
4.5.5. Cins Seviyesi	52
4.6. Parametreler Arasındaki İlişkiler.....	55
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ	64
KAYNAKLAR.....	65
EKLER.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	765

SİMGELER VE KISALTMALAR

BMI	: Vücut Kitle İndeksi
CF	: Kistik Fibrozis
CFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör
DFI	: DNA Fragmentasyon İndeksi
DGGE	: Denatüre Gradyan Jel Elektroforez
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil Yöntemi
ECL	: Geliştirilmiş Kemilüminesans (ECL) Testi
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
FISH	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
FRAP	: Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç Testi
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
HMP	: İnsan Mikrobiyom Projesi
LH	: Luteinizan Hormon
ORAC	: Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi testi
PBS	: Fosfat Tuz Tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	: Paraformaldehit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDF	: Sperm DNA Fragmentasyonu
TAC	: Total Antioksidan Kapasite
TEAC	: Trolox Eşdeğerliği Antioksidan Kapasite Yöntemi
TGGE	: Sıcaklık Gradyan Jel Elektroforez
T-RFLP	: Terminal Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı dUTP-çentik uç Etiketleme
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	İnfertilite olgularının cinsiyete göre dağılımı	5
Şekil 2.2.	Spermatogenez aşamaları.....	7
Şekil 2.3.	SDF'nin altında yatan potansiyel mekanizmalar ve risk faktörleri.....	11
Şekil 2.4.	Bir sistem olarak mikrobiyom kavramı.....	15
Şekil 2.5.	Erkek ürogenital sisteminde bulunan bakteri topluluklarının şube düzeyinde dağılımı	21
Şekil 2.6.	Semende bulunan bakteri cinslerinin nisbi bolluk değerleri	23
Şekil 3.1.	Tezin akış şeması	34
Şekil 3.2.	TUNEL analizi ekim işlemi adımları	36
Şekil 3.3.	Image J programı ile gerçekleştirilen sayım işlemi.....	37
Şekil 3.4.	ELISA testi için plaka düzeneği.....	39
Şekil 3.5.	Mikrobiyom analizi adımları.....	40
Şekil 4.1.	Hasta ve kontrol gruplarına ait bazı örneklerin anilin mavisi boyamasından sonra ışık mikroskobu altındaki görüntüleri	44
Şekil 4.2.	DNA fragmentasyonu az ve fazla olan iki farklı örneğe ait DAPI ve FITC sinyallerinin floresan mikroskoptaki görüntüsü	45
Şekil 4.3.	ELISA reaksiyonu sonrası kuyucuklardaki renk değişimin görüldüğü mikropilaka.....	46
Şekil 4.4.	Hasta ve kontrol gruplarından birer örneğin mikrobiyom analizi sonuçları doğrultusunda bakteriyel dağılımlarını gösteren grafikler	47
Şekil 4.5.	Shannon indeksi ile gruplar arası mikrobiyota çeşitliliğinin karşılaştırılması	48
Şekil 4.6.	Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin şube seviyesinde nisbi bolluk dağılımları.....	48
Şekil 4.7.	Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin sınıf seviyesinde nisbi bolluk dağılımları.....	49
Şekil 4.8.	Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin takım seviyesinde nisbi bolluk dağılımları.....	50
Şekil 4.9.	Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin aile seviyesinde nisbi bolluk dağılımları.....	51
Şekil 4.10.	Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin cins seviyesinde nisbi bolluk dağılımları.....	52
Şekil 4.11.	LEfSe analizi sonucu	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	Tournaye ve arkadaşlarının erkek infertilitesi sınıflandırması.....	5
Tablo 2.2.	Korunma olmadan gerçekleştirilen cinsel ilişkinin bir yıl içinde doğal gebelik ile sonuçlandığı çiftlerde erkeğe ait semen parametrelerinin alt beşinci yüzdalık dilimine ait değerler	9
Tablo 3.1.	Hasta ve kontrollerin seçiminde kullanılan kriterler	32
Tablo 3.2.	Trolox standartlarının içerik ve konsantrasyonları	39
Tablo 4.1.	Hasta ve kontrol gruplarının demografik bilgilerine ilişkin istatistiksel veriler	42
Tablo 4.2.	Hasta ve kontrol gruplarının semen parametrelerine ilişkin istatistiksel veriler	43
Tablo 4.3.	Gruplar arası anilin pozitif sperm yüzdelerinin karşılaştırması	44
Tablo 4.4.	Gruplar arası DFI karşılaştırması	45
Tablo 4.5.	Gruplar arası total antioksidan kapasitesi karşılaştırması	46
Tablo 4.6.	Gruplar arasında farklılık gösteren bakteri cinsleri.....	53
Tablo 4.7.	Yaş, BMI ve semen parametreleri arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu.....	56
Tablo 4.8.	Bakteri cinsleri ile DFI, TAC ve anilin pozitif sperm yüzdesi arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu.....	57
Tablo 4.9.	Bakteri cinsleri ile yaş ve BMI arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu.....	58
Tablo 4.10.	Bakteri cinsleri ile semen parametreleri arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu.....	59

1. GİRİŞ

Bir yıl süreyle korunmaksızın devam eden düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi olarak tanımlanan infertilite, üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %15'ini etkilemektedir (WHO, 2018). İnfertilite, dünya genelinde 48 milyon çift ve 186 milyondan fazla bireyi etkilemekte ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından küresel bir sağlık sorunu olarak değerlendirilmektedir. Değişen yaşam tarzları ile birlikte infertilite insidansında dramatik bir artış söz konusudur (Sun, vd., 2019). Erkekler, toplamda infertilite olgularının %20-70'inden sorumlu görünmektedir (Tournaye, vd., 2017). Hem bu oranda hem de yardımcı üreme tekniklerine harcanan bütçedeki süregelen ve ileriye dönük beklenen artış (Winters ve Walsh, 2014), infertilitenin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması ve daha düşük maliyetli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların önemini ortaya koymaktadır.

Erkek infertilitesi, hem genetik hem çevresel faktörlere dayanan heterojen bir bozukluktur. Hormonal dengesizlikler, anatomik bozukluklar ve genetik faktörlerin neden olabildiği olguların %90'ından fazlası, sperm sayısı ve kalitesindeki anomaliler ile ilişkilidir (Leaver, 2016). Yapılan çalışmalar, seneler içerisinde sperm parametrelerinde önemli ölçüde bir düşüş meydana geldiğini göstermektedir (Levine, vd., 2017). Bununla birlikte, artan erkek infertilitesi insidansında değişen yaşam tarzı, beslenme ve çevresel koşulların önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Leisegang, vd., 2021).

Beslenmenin önemli ölçüde etkilediği bir bileşen de mikrobiyotadır. Mikrobiyota, insan vücudunda yer alan ve sayıları trilyonları bulan mikroorganizmalar topluluğudur (Hayes ve Sahu, 2020). Bu mikroorganizmalar, konakçısı olduğu insan ile kommensal veya simbiyotik ilişki içinde bulunan non-patojen türler ve hastalık yapıcı patojen türlerden oluşabilmektedir. Çoğunlukla mikrobiyota ile aynı anlamda kullanılan mikrobiyom kavramı ise mikrobiyotayı oluşturan elemanlarla beraber açığa çıkardıkları ürünlerin de dahil edildiği bir sistem olarak tanımlanmaktadır (Berg, vd., 2020). Mikrobiyomun özellikle immün sistem ve metabolik süreçlerde önemli bir rol oynadığı ve başta obezite gibi inflamatuvar hastalıklar olmak üzere pek çok hastalık ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Meldrum, vd., 2017; Young, 2017). Araştırmalar, obezitenin belirli bir mikrobiyota

profili ile bağlantılı olduğunu ve mikrobiyota bileşiminin obeziteye yatkınlık oluşturabileceğini ortaya koymaktadır (Leocádio, vd., 2020; Ley, vd., 2006).

İnfertilite ile yakından bağlantılı olduğu bilinen obezite, başta hormonal bozukluklar olmak üzere, spermatogenezdeki bozukluklar, testiküler ısı artışı, düşük sperm kalitesi, sperm DNA fragmentasyonu ve erektil disfonksiyon gibi faktörlerle ilişkili olarak fertilitiyi olumsuz etkilemektedir (Hammoud, vd., 2008; Kahn ve Brannigan, 2017; Leisegang, vd., 2021).

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde standart inceleme, semen analizidir. Ancak infertilite olgularının göz ardı edilemez bir kısmında erkeğin normal semen parametrelerine sahip olması, daha ileri testlere olan ihtiyacı ortaya koymaktadır (Agarwal, vd., 2016; Saleh, vd., 2002). Spermin biyokimyasal ve moleküler fonksiyonlarını ölçmeye yönelik ileri testlerin üreme potansiyelinin tahmininde semen parametrelerine kıyasla daha etkili olabileceği düşünülmektedir (Minhas, vd., 2021). Bu testler ile sperm DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu (histonca zengin sperm yüzdesi) ve antioksidan kapasite gibi özellikler ölçülebilmektedir. İnfertil erkeklerde sperm DNA fragmentasyonu ve histonca zengin sperm oranının daha yüksek, seminal plazmadaki total antioksidan kapasite seviyesinin ise daha düşük olduğu görülmüştür (Lewis, vd., 1995; Santi, vd., 2018; Smith, vd., 1996; Zeqiraj, vd., 2018). Bu parametreler, özellikle idiyopatik infertilite olgularının aydınlatılmasına katkı sağlayabilmektedir.

Erkek infertilitesi ve mikrobiyota arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Fertil erkekler ile infertil erkeklerin seminal mikrobiyomlarının karşılaştırıldığı çalışmaların bazılarında bu iki gruba ait örneklerde anlamlı bir farklılık belirlenememişken bazı çalışmalar semendeki mikrobiyal içerik ve çeşitliliğin sperm parametreleri ve dolayısıyla infertilite ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Altmäe, vd., 2019; Monteiro, vd., 2018; Weng, vd., 2014). Obezitenin mikrobiyota üzerindeki etkilerini ortaya koyan çeşitli araştırmalar bulunmakla beraber, genellikle bağırsak mikrobiyotasına odaklanılmaktadır. Obezite-infertilite ilişkisine dair kanıtlar göz önünde bulundurulduğunda obezitenin seminal mikrobiyotayı etkileyebileceği ve bu şekilde fertilité üzerinde etkili olabileceği varsayımında bulunmak mümkündür.

Tez çalışmasında, obezitenin infertiliteyle ilişkisinde mikrobiyotanın olası rolünü araştırmak hedeflenmiştir. Bu doğrultuda obez fertil ve obez infertil bireylerin

seminal mikrobiyomlarının karşılaştırılması, semendeki bakterilerin semen parametreleri, sperm DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve total antioksidan kapasite üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi planlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin özellikle açıklanamayan erkek infertilitesi konusunda literatüre katkı sağlayacağı düşünülmüştür.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

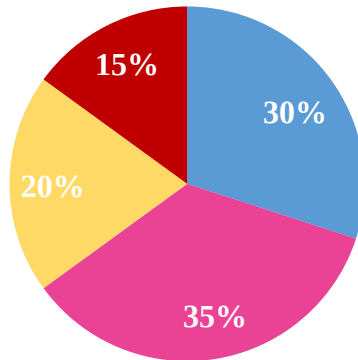
2.1.1. İnfertilite Epidemiyolojisi

İnfertilite, bir yıl süreyle korunmaksızın devam eden düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi şeklinde tanımlanmaktadır (WHO, 2018). Primer infertilite, daha önce başarılı gebelik öyküsü olmayan bireyin çocuk sahibi olmakta sorun yaşamasını ifade ederken; sekonder infertilite, geçmişte bir veya daha fazla sayıda başarılı gebeliğe rağmen tekrar çocuk sahibi olamama anlamına gelmektedir (Zegers-Hochschild, vd., 2017).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından küresel bir sağlık sorunu olarak değerlendirilen infertilite, üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %15'ini etkilemektedir (Barati, vd., 2020; Sun, vd., 2019). Dünya genelinde 48 milyon çift ve 186 milyondan fazla bireyin infertilite sorunu yaşadığı tahmin edilmektedir. Değişen yaşam tarzları ile birlikte dünya genelinde infertilite insidansında dramatik bir artış söz konusudur. Olguların %15'inin nedeni açıklanamazken, %20'si hem kadın hem erkek, %35'i yalnızca kadın, %30'u ise yalnızca erkek kaynaklıdır (Şekil 2.1). Erkekler, toplamda infertilite olgularının %20-70'inden sorumlu görünmektedir (Tournaye, vd., 2017). Erkek infertilitesinin dünya çapında erkeklerin %12'sini etkilediği bilinmektedir (Lotti ve Maggi, 2018).

İnfertilite Olguları

■ Erkek ■ Kadın ■ Kadın ve Erkek ■ Açıklanamayan



Şekil 2.1. İnfertilite olgularının cinsiyete göre dağılımı

2.1.2. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite olgularının yaklaşık olarak yarısında erkek faktörü etkilidir. Hem genetik hem de çevresel faktörlere dayanan heterojen bir hastalık olan erkek infertilitesi, genellikle pretestiküler, testiküler ve posttestiküler olmak üzere üç ana grupta değerlendirilmektedir. Tournaye ve ark. ise, erkek infertilitesinin hipotalamus-hipofiz aksındaki bozukluklar, duktal obstrüksiyon veya disfonksiyon, nitelikle ilgili spermatogenik bozukluklar ve nicelikle ilgili spermatogenik bozukluklar şeklinde dört ana grupta sınıflandırılması önerisinde bulunmuşlardır (Tablo 2.1) (Tournaye, vd., 2017).

Tablo 2.1. Tournaye ve arkadaşlarının erkek infertilitesi sınıflandırması (Tournaye, vd., 2017)

Hipotalamus-hipofiz aksındaki bozukluklar	Genetik	Anosmi (örn. Kallmann sendromu) veya normosmi ile birlikte konjenital hipogonadotropik hipogonadizm
	Genetik olmayan	CNS malignitesi veya transfenoidal rezeksiyon veya radyasyon; hemokromatoz, sarkoidoz, tüberküloz veya mantar; hipofiz adenomu; ve ekzojen androjen veya testosteron kullanımı
Duktal obstrüksiyon veya disfonksiyon	Genetik	Normal böbrek anatomisiyle birlikte vas deferensin konjenital yokluğu
	Genetik olduğu farz edilen	Tek taraflı böbrek ageneziyle birlikte vasın konjenital bilateral yokluğu, Young sendromu
	Genetik olmayan	Vazektomi geçmişi, idiyopatik epididimal oklüzyon, bilateral kasık fıtığı onarımı, ejakülatör kanal tıkanıklığı, vazal peristaltik eksikliğiyle birlikte DM, omurilik yaralanması, MS, nöral tüp defektleri, retroperitoneal lenf nodu diseksiyonu, pelvik cerrahi ve ejakülatör veya erektil disfonksiyon
Spermatogenik niteliksel defektler	Genetik	Globozoospermi, immotil silia sendromu, küt-kuyruk sendromu, mikrosefalik sperm başı ve ileri baba yaşı
	Genetik olduğu farz edilen	Fosfolipaz C eksikliği, idiyopatik astenozoospermi veya teratozoospermi, otoimmünite
	Genetik olmayan	Oksidatif stres veya DNA hasarı
Spermatogenik niceliksel defektler	Genetik	Y kromozomal mikrolelesyonlar, 47,XXY Klinefelter sendromu, 46,XX sendromu veya izodisentrik Y kromozomları, parsiyel androjen duyarsızlık sendromu, kromozomal yapısal anomaliler, X kromozomal <i>TEX11</i> mutasyonu
	Genetik olduğu farz edilen	İdiyopatik oligozoospermi veya azospermi, kriptorşidizm veya testiküler disgenezi sendromu
	Genetik olmayan	Varikosel (3. derece), sitotoksik kemoterapi veya radyoterapi geçmişi, testis kaybına yol açan testis torsiyonu öyküsü, bilateral kabakulak orşiti, bilateral testis malignitesi ve orşiektomi ve sistemik hastalıklar

Spermatogenezin başarılı bir şekilde gerçekleşmesinde hipotalamus, hipofiz ve testisler birlikte görev almaktadır (Fraietta, vd., 2013). Hipotalamus-hipofiz aksındaki bozukluklar, üreme ve cinsel işlev için gereken gonadotropinler olan luteinizan hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) veya bunların salgılanmasında etkili olan gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) üretimindeki eksiklikleri ifade etmektedir. Hipogonadotropik hipogonadizm olarak adlandırılan bu durum, genetik veya genetik olmayan faktörlerin etkili olduğu şekilde konjenital ya da kazanılmış nedenlere bağlı olabilir.

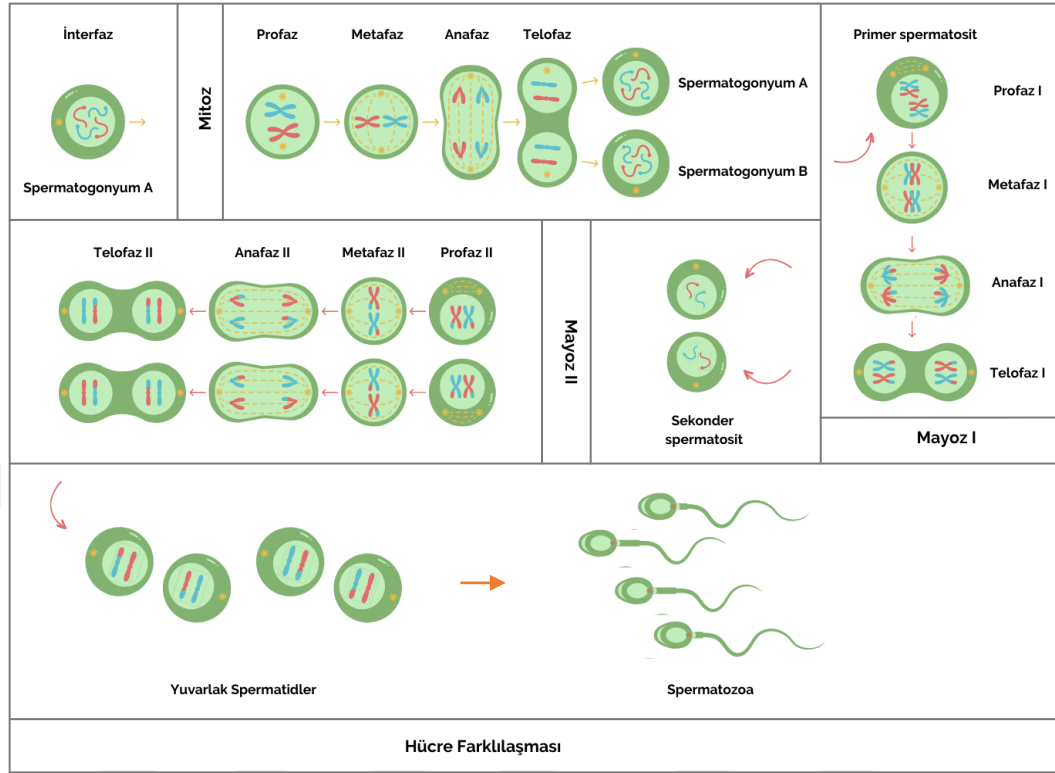
Duktal obstrüksiyon veya disfonksiyon, spermin iletilmesi ile ilgili bozuklukları tanımlamaktadır. Testislerde üretilen spermatozoanın taşınması ve depolanmasında pek çok yapı görev almaktadır (Giuliano ve Clement 2005; Sheu, vd., 2014). Epididimde matürasyonunu tamamlayan sperm hücreleri, vaz deferens aracılığıyla üretraya taşınır. Seminal veziküller ve prostat bezi, sperm hücrelerinin korunması ve beslenmesi için gerekli olan elementleri içeren seminal sıvının üretilmesinde rol oynar. Büyük ölçüde sinir sistemi tarafından kontrol edilen ejakülasyon süreci, nörokimyasal ve hormonal düzenlemeyi gerektirmektedir (Alwaal, vd., 2015). Bu işleyişte meydana gelen anatomik veya nörolojik aksaklıklar, fertilizasyonun gerçekleşmesini olanaksız hale getirebilmektedir.

Erkek infertilitesi, anatomik bozukluklar, hormonal dengesizlikler ve genetik faktörlerden kaynaklanabileceği gibi olguların %90'ından fazlası sperm sayısı ve kalitesindeki anomaliler ile ilişkilidir (Leaver, 2016). Spermatogenez sürecinde meydana gelen aksaklıklar sonucunda yeterli sayıda ve kalitede sperm üretilmemesi, spermatogonik bozukluklar grubunu oluşturmaktadır.

2.1.3. Spermatogenez

Spermatogenez, olgunlaşmamış sperm hücresinin bir dizi mitotik ve mayotik bölünmeler ve hücrel farklılaşmalarla olgun sperm hücresine dönüşüm sürecini ifade etmektedir (Şekil 2.2). Erkeklerde puberte ile başlayıp ömür boyu süren bu karmaşık süreçte, çok sayıda genin rol oynadığı belirlenmiştir (Linn, vd, 2021; Schultz, vd., 2003). Seminifer tübülde gerçekleşen süreç temel olarak şu aşamalardan oluşmaktadır: spermatogonyumun mitotik proliferasyonu, spermatogonyal farklılaşma ile spermatositlerin oluşması, spermatositlerin mayoz bölünmesi ile spermatidlerin meydana gelmesi, yuvarlak spermatidlerin olgunlaşması ve ileri

derecede özelleşmiş olgun spermatozoaların testiküler tübül lümenine salınması (Neto, vd., 2016).



Şekil 2.2. Spermatogenez aşamaları

İnsanlarda üç ayrı spermatogonyal kök hücre tipi tanımlanmıştır. Bunlar, çekirdeklerinin boyanma özelliklerine göre A tipi koyu spermatogonyum, A tipi soluk spermatogonyum ve B tipi spermatogonyum olarak adlandırılmıştır (Minelli ve Bellezza, 2011). Spermatogenez sürecine doğrudan katılmayan A tipi koyu spermatogonyum, hücre hattının devamlılığını sağlarken, A tipi soluk spermatogonyum, tekrar tekrar mitotik bölünerek hücre klonlarını arttırmaktadır. Bölünme sonucunda oluşan hücreler ise spermatogonial faz adı verilen süreç ile B tipi spermatogonyuma farklılaşmaktadır. B tipi spermatogonyum, sperm üretimine doğrudan katılır, primer spermatositlere dönüşmek üzere büyür ve mitoz bölünür. Diploid primer spermatositlerden, mayoz bölünmenin ilk evresi sonucunda haploid sekonder spermatositler üretilir. Bu süreç spermatositogenez olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra sekonder spermatositler, mayoz II evresini tamamlayarak spermatidleri oluşturur. Spermatidogenez denen bu süreç sonucunda üretilen spermatidler, yuvarlak hücrelerdir ve spermatozoayı oluşturmak için önemli oranda farklılaşmaları gerekir. Spermatidlerin spermatozoalara dönüşümünü ifade

eden spermiyogenez sürecinde, bir dizi morfolojik değişim meydana gelir (Sharma ve Agarwal, 2011). Bu değişimler, spermatozoanın hareket ve fertilizasyon kabiliyeti gibi fonksiyonel özelliklerini kazanmasını sağlar.

Spermiyogenez sürecinde temel olarak akrozom oluşumu, çekirdeğin yoğunlaşması ve şekil değiştirmesi, flagellumun meydana gelmesi ve sitoplazmanın büyük bir kısmının kaybolması aşamaları görülmektedir. Merkezi, küresel bir çekirdek ve yuvarlak bir şekle sahip olan spermatidlerde öncelikle, sperme fertilizasyon ve hareket yeteneği kazandıran akrozom ve aksonem oluşumu gerçekleşir (O'Donnell, 2014). Bunlar, Golgi aygıtı, mitokondri ve hücre iskeleti elemanlarının katılımıyla meydana gelir. Golgi kompleksinde biriken proakrozomal granüller, birleşir ve çekirdeği çevreleyecek şekilde gelişen akrozomal vezikülün içerisinde akrozomal granülü oluşturur. Bu yapının çekirdek çevresinde yayılarak çekirdek yüzeyinin üçte ikisini kaplamasıyla akrozom oluşumu tamamlanır (Muciaccia, vd., 2013). Aynı zamanda sentriyoller karşı kutba göç ederek aksonem oluşumuna katılır. Sentriyollerden biri flagellumu oluşturmak üzere uzar, flagella işlevi için gerekli aksesuar yapılar aksonem etrafında toplanır (O'Donnell, 2014). Bu bölgede biriken mitokondriler, boyun bölgesinde aksonemi çevreleyerek orta parçayı meydana getirir (Minelli ve Bellezza, 2011). Akrozomu oluşturan Golgi ve hücre iskeleti yapıları ile flagellumu oluşturan sentriyol ve mitokondrilerin bu zıt yönlü hareketi, hücrede polarizasyona neden olarak spermin kendine özgü yassı ve uzun şeklini almasına yol açar. Bu esnada çekirdek de küresel yapısını kaybederek uzar ve yoğunlaşır. DNA, histonların yerini alan ve ileride protaminlere dönüşecek olan geçiş proteinleri ile oldukça sıkı bir şekilde paketlenerek transkripsiyonel olarak inaktif hale gelir (Meistrich, vd., 2003). Spermatozoanın hareket kabiliyetini arttırmak üzere ihtiyaç fazlası sitoplazma, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoa, Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübüllerin lümenine salınır. Spermiyasyon adı verilen bu aşamanın sonucunda spermatozoa, olgunlaşmanın tamamlanması ve depolama için epididime taşınır (O'Donnell, vd., 2011).

2.1.4. Semen Analizi

Erkek infertilitesinin tanısı ve değerlendirilmesinde standart olarak sperm parametreleri incelenmektedir. WHO, düzenli aralıklarla, semen analizinin gerçekleştirilmesi ve fertilitenin değerlendirilmesine yönelik bir laboratuvar kılavuzu (WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen)

yayınlanmaktadır. Son olarak 2021 yılında altıncısı yayımlanan bu kılavuzda, semenin değerlendirilmesine yönelik işlemler, temel düzeydeki incelemeler, genişletilmiş incelemeler ve ileri düzey incelemeler olarak sınıflandırılmıştır. Rutin olarak gerçekleştirilen testlerden oluşan temel düzeydeki incelemeler sperm sayısının, motilitesinin ve morfolojisinin değerlendirilmesini içermektedir. Genişletilmiş incelemeler semende yer alan lökositler, olgunlaşmamış germ hücreleri ve sperm antikorlarının tespiti, çeşitli sperm kusurlarının indekslerinin belirlenmesi, yardımcı organ fonksiyonlarının ölçümü için biyokimyasal analizler, sperm anöploidisi ve sperm genetiğini incelemeye yönelik genetik ve genomik testleri ve ayrıca sperm DNA fragmentasyonunu saptamaya yönelik yöntemleri içermektedir. İleri düzey incelemeler ise reaktif oksijen türlerinin ve oksidatif stresin, membran iyon kanallarının, akrozom reaksiyonunun ve sperm kromatinin değerlendirilmesine yönelik testleri içermektedir.

WHO kılavuzunun altıncı basımında yer alan ve korunma olmadan gerçekleştirilen cinsel ilişkinin bir yıl içinde doğal gebelik ile sonuçlandığı çiftlerde erkeğe ait semen parametrelerinin alt beşinci yüzdalık dilimine ait değerler Tablo 2.2’de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Korunma olmadan gerçekleştirilen cinsel ilişkinin bir yıl içinde doğal gebelik ile sonuçlandığı çiftlerde erkeğe ait semen parametrelerinin alt beşinci yüzdalık dilimine ait değerler (WHO, 2021)

Semen Parametreleri	WHO 2021
Semen hacmi (mL)	1,4 (1,3–1,5)
Sperm konsantrasyonu (10^6 /mL)	16 (15–18)
Toplam sperm sayısı (10^6 /ejakülat)	39 (35–40)
Toplam motilite (%)	42 (40–43)
Progresif motilite (%)	30 (29–31)
Progresif olmayan motilite (%)	1 (1–1)
İmmotil sperm (%)	20 (19–20)
Vitalite (%)	54 (50–56)
Normal morfoloji (%)	4 (3,9–4)

2017 yılında yayınlanan bir araştırmada, 1973-2011 yılları arasında yapılmış çalışmalardan elde edilen veriler kullanılarak 42.935 erkeğin semen analizi sonuçları değerlendirmiş ve oldukça çarpıcı bulgular ortaya konmuştur. Bu geniş kapsamlı meta-regresyon analizi, belirtilen 38 yıllık süre içerisinde erkeklerin sperm

konsantrasyonunda yılda ortalama %1,4 ve toplamda %52,4; total sperm sayısında ise yılda ortalama %1,6 ve toplamda %59,3 azalmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Levine, vd., 2017). Artan infertilite insidansında, semen parametrelerinde gözlenen bu düşüşün önemli bir rolü olduğu açıktır.

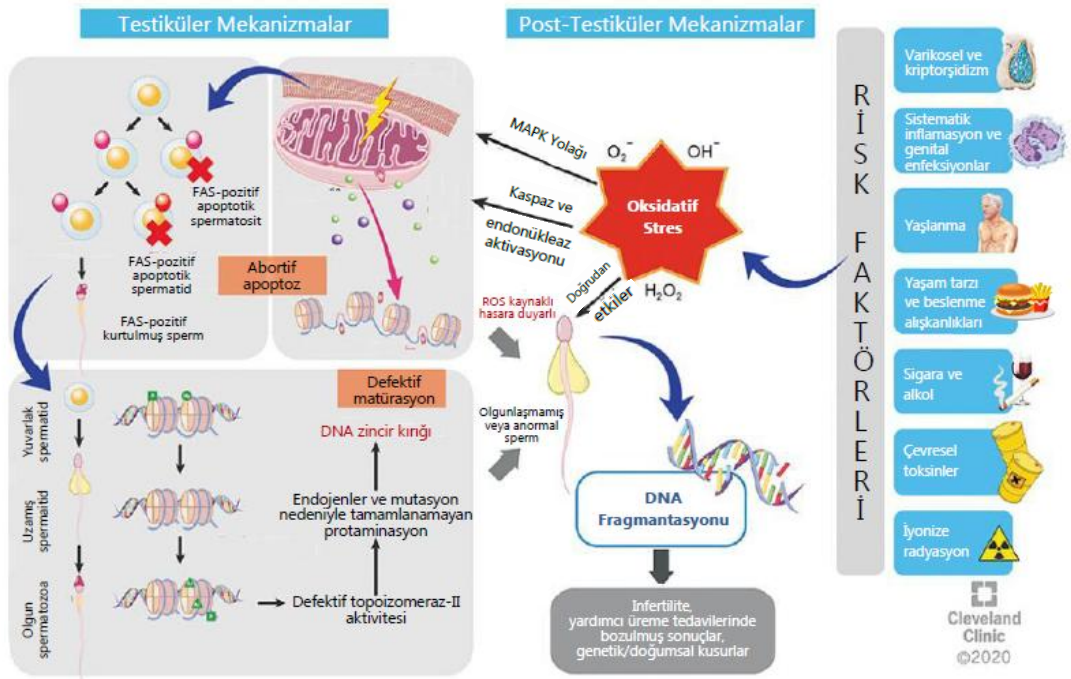
Sperm parametreleri, erkek fertilesine yönelik önemli bilgiler sağlamasına rağmen hem fertilité potansiyelinin değerlendirilmesi hem de erkek infertilitesinin anlaşılması için yeterli olamamaktadır. Erkek infertilitesiyle ilişkili genetik ve genetik olmayan pek çok faktör tanımlanmış olsa da olguların neredeyse yarısı halen açıklanamamaktır. Bu olgular idiyopatik veya açıklanamayan erkek infertilitesi olarak adlandırılmaktadır. Aralarındaki fark, idiyopatik erkek infertilitesinde semen kalitesinde sebebi bilinmeyen bir düşüş söz konusu iken açıklanamayan erkek infertilisinin normal semen parametrelerine rağmen kaynağı bilinmeyen infertiliteyi tanımlıyor olmasıdır (Jung ve Seo, 2014). Açıklanamayan infertilitenin altında seminal reaktif oksijen türleri miktarının (ROS) yükselmesi ve SDF'in artışı gibi moleküler bozukluklarla birlikte sperm disfonksiyonu veya antisperm antikorlarının yatabileceği gösterilmiştir (Hamada, vd., 2012). Bu nedenle spermin biyokimyasal ve moleküler fonksiyonlarını ölçmeye yönelik ileri testlerin üreme potansiyelinin tahmininde semen parametrelerine kıyasla daha etkili olabileceği düşünülmektedir (Minhas, vd., 2021). Bu testlerin başında SDF'in ve seminal ROS seviyesinin ölçümü gelmektedir.

2.1.5. Sperm DNA Fragmentasyonu

Sperm DNA bütünlüğü, başarılı bir fertilizasyon, embriyonik gelişim, implantasyon ve gebelik için son derece önemlidir (Alvarez Sedó, vd., 2017; Esteves, vd., 2021; Panner Selvam, vd., 2021; Simon, vd., 2014). Babaya ait genetik bilgiyi taşıyan ve embriyonik genomun yarısını oluşturacak olan sperm DNA'sı yalnızca gebeliğin meydana gelmesinde değil aynı zamanda bebeğin gelişimi ve gelecek nesillerin sağlığı açısından da hayati öneme sahiptir (Lewis ve Simon, 2010). Dolayısıyla, bu kritik molekülde meydana gelen hasarlar fertilitéyi de ciddi oranda etkilemektedir. Yüksek seviyedeki DNA hasarının varikosel, açıklanamayan erkek infertilitesi ve idiyopatik erkek infertilitesi gibi çeşitli durumlarla ilişkili olduğu ve yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarını önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (Baskaran, vd., 2019).

Sperm DNA fragmentasyonu, sperm hücresinin genomunda meydana gelen tek veya çift zincir kırıklarıyla karakterize DNA hasarı çeşididir. Normal koşullarda DNA’da oluşan kırıklar, çeşitli DNA tamir mekanizmalarıyla onarılabilmektedir. Sperm genomunun onarımının yetersiz kaldığı durumlarda ise sperm DNA’sındaki hasar kalıcı hale gelmekte ve sperm kalitesini önemli ölçüde düşürerek üreme potansiyelini olumsuz etkilemektedir (Agarwal, vd., 2022).

Sperm DNA’sının fragmanite olmasında rol oynayan üç mekanizma öne sürülmüştür (Şekil 2.3). Bu mekanizmalar, apoptoza giden sperm hücresinin süreci tamamlayamaması, sperm kromatin olgunlaşmasındaki bozukluklar ve oksidatif stresin doğrudan sperm DNA’sına verdiği hasarlardır (Agarwal, vd., 2022). Yaşlanma, çevresel toksinler, kemoterapi/radyoterapi, sistemik inflamasyon veya genital enfeksiyonlar, varikosel, testiküler travma, testislerin ısı maruziyeti, sigara, beslenme ve yaşam tarzı alışkanlıkları gibi erkek infertilitesinde rol oynayan pek çok faktör, SDF ile ilişkili bulunmaktadır (Agarwal, vd., 2020; Panner Selvam, vd., 2020).



Şekil 2.3. SDF’nin altında yatan potansiyel mekanizmalar ve risk faktörleri (Agarwal, vd., 2020)

Konvansiyonel semen analizinin başarılı gebeliğin ön görülmesinde yetersiz kalıyor olması, ileri testlere ve yeni göstergelere duyulan ihtiyacı arttırmıştır. Artan kanıtlar, sperm DNA fragmentasyonunun hem fertilite potansiyelinin belirlenmesinde hem de uygun yardımcı üreme tekniğinin planlanmasında kullanılabilecek güvenilir bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Özellikle semen parametrelerinin normal sınırlar içinde olduğu açıklanamayan erkek infertilitesinden sperm DNA hasarının sorumlu olabileceği ve bu nedenle DNA fragmentasyon indeksi (DFI) gibi ölçümlerin infertilitenin anlaşılmasına yönelik önemli bilgiler sağlayabileceği düşünülmektedir (Saleh, vd., 2002). Sperm konsantrasyonu, morfolojisi ve motilitesi normal olan erkeklerde DFI seviyesinin %20'yi aşmasının fertiliteyi azalttığı bildirilmiştir (Oleszczuk, vd., 2013). Fertil ve infertil erkekler arasında DFI'nin karşılaştırıldığı çalışmalar, infertil erkeklerde SDF'nin anlamlı oranda daha yüksek olduğunu göstermektedir (Santi, vd., 2018; Zeqiraj, vd., 2018).

2.1.6. Total Antioksidan Kapasite

ROS ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu, nükleik asit oksidasyonu gibi mekanizmalarla hücrelere zarar verebilmektedir. Bununla beraber, ROS'un spermin kapasitasyonu ve akrozom aktivitesi gibi fertilizasyon için oldukça önemli süreçlerde rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (de Lamirande, vd., 1998; Ford, 2004). Fizyolojik düzeydeki ROS üretimi, sperm fonksiyonlarının düzenlenmesi için gerekli görünmekle birlikte, aşırı ROS maruziyetinin spermin işlevselliği ve canlılığındaki kayıplar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Saleh ve Agarwall, 2002). Sperm hücreleri, sınırlı antioksidan savunma ve DNA tamir mekanizmalarına sahip olmaları nedeniyle oksidatif strese karşı son derece hassastır (Bisht, vd., 2017). Oksidatif stresin, sperm membranına ve DNA bütünlüğüne zarar vererek infertilitede rol oynadığı öne sürülmüştür (Tremellen, 2008).

Oksidatif stres ile erkek infertilitesi arasındaki ilişkiye dair kanıtların artışıyla beraber antioksidan kapasitenin ölçümü de ilgi çeker hale gelmiştir (Aitken, vd., 2003; Bisht vd., 2017). Seminal plazma, sperm hücrelerini oksidatif stresin yol açtığı hasarlara karşı korumakla görevli çeşitli antioksidan bileşenler içermektedir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimatik yapıda veya E vitamini, C vitamini, çinko gibi non-enzimatik yapıda olabilen bu antioksidan bileşenlerin ayrı ayrı ölçümünün hem meşakkatli hem de maliyetli olması nedeniyle

bir biyolojik örnekteki tüm antioksidanların toplamına yönelik genel bilgi veren total antioksidan kapasitesi (TAC) ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir (Pahune, vd., 2013).

Yapılan çalışmalar, infertil erkeklerin seminal plazmalarında TAC seviyelerinin daha düşük olduğunu göstermektedir (Lewis, vd., 1995; Smith, vd., 1996). Hasta grupları arasında özellikle idiyopatik infertil erkeklerde en düşük TAC seviyeleri gözlenmiş ve TAC ile başta motilite olmak üzere sayı, konsantrasyon ve morfoloji gibi sperm parametreleri arasında güçlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Colagar, vd., 2013; Eroglu vd., 2014; Pasqualotto, vd., 2000; Sharma, vd., 1999).

Total antioksidan kapasitenin ölçülmesine yönelik farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler, özellikle farklı antioksidanları belirlemedeki hassasiyetlerine göre çeşitlilik göstermektedir. Başlıcaları, 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi, Trolox eşdeğerliği antioksidan kapasite (TEAC) tekniği, ABTS radikalinin oluşumuna dayalı ELISA (enzime bağlı immünosorbent testi), oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi (ORAC) testi, ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testi ve geliştirilmiş kemilüminesans (ECL) testidir (Gupta, vd., 2021).

TAC ölçümü için hücresel içeriğin tamamen uzaklaştırılmasıyla elde edilen berrak seminal plazma kullanılmaktadır. Yöntemlerin çoğu, indüklenen oksidatif reaksiyon sonucu açığa çıkan kolorimetrik değişimlerin spektrofotometrik olarak incelenmesine dayanmaktadır. TEAC ve ELISA tekniklerinde oksidatif reaksiyonu indüklemek için hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmaktadır. H_2O_2 , metmyoglobin varlığında 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit, ABTS)'i okside ederek $ABTS^+$ radikaline dönüştürür (Agarwal, vd., 2018). TAC ölçümü temelinde, numune içerisindeki antioksidanların ABTS'nin oksidasyonunu engelleme kapasitesinin belirlenmesine dayanır (Agarwal, vd., 2016). Reaksiyon sonucu oluşan bu renkli ürün, 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak görüntülenebilmektedir. Renk değişiminin az olması, antioksidan konsantrasyonunun yüksek olduğuna, mavi/yeşil rengin artışı ise düşük TAC seviyesine işaret eder. TEAC ve ELISA yöntemleri arasındaki temel fark, görüntülemeye kullanılan teknolojidir. ELISA, spektrofotometre kullanılarak radikal tespiti yapan TEAC'tan farklı olarak, tek seferde birden fazla numunenin incelenebildiği bir mikroparka ve ELISA okuyucu kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Gupta, vd., 2021). Her iki yöntemde de elde

edilen kolorimetrik sinyaller, E vitamininin suda çözünen bir analogu olan Trolox'un standart eğrisi ile karşılaştırılır.

2.1.7. Sperm Kromatin Kondensasyonu

Spermatidlerin olgun spermatozaları oluşturduğu spermiyogenez sürecindeki en önemli değişikliklerden biri sperm kromatin kondensasyonudur. DNA, ökaryot hücrelerin çekirdeklerinde oldukça sıkı bir şekilde paketlenmiş halde bulunur. Bu formu sağlayan ise “histon” adı verilen proteinlerdir. Olgunlaşmış sperm hücrelerinde ise diğer hücrelerden farklı olarak histon proteinlerinin yerini büyük oranda “protamin” olarak isimlendiren küçük proteinler almaktadır. Spermatogenezin ileri evrelerinde protamin sentezinin artışıyla protamin/histon oranı da artar. Protaminler, sperm DNA'sının daha da sıkı bir şekilde paketlenmesini sağlar. Kromatin kondensasyonu olarak adlandırılan bu süreç, hem sperm motilitesinde hem de sperme ait genetik materyalin korunmasında ve sağlıklı bir şekilde taşınabilmesinde oldukça önemli bir etkiye sahiptir (Gunes ve Kulac, 2013).

Sperm kromatin kondensasyonunun değerlendirilmesinde sık kullanılan yöntemlerden biri anilin mavisi ile boyamadır. Anilin mavisi boyası, histon proteinlerine bağlanarak sperm hücrelerini renklendirir. Boyamanın ardından ışık mikroskopu altında yapılan incelemede, protaminasyonun yetersiz şekilde gerçekleştiği, histonca zengin sperm, koyu renkli görünürken; histon oranı düşük olan olgun sperm hücreleri, soluk renkte görünmektedir. Histonca zengin sperm hücrelerinin histonca fakir olanlara oranlanmasıyla elde edilen değerin semen kalitesine yönelik bilgi verdiği düşünülmektedir.

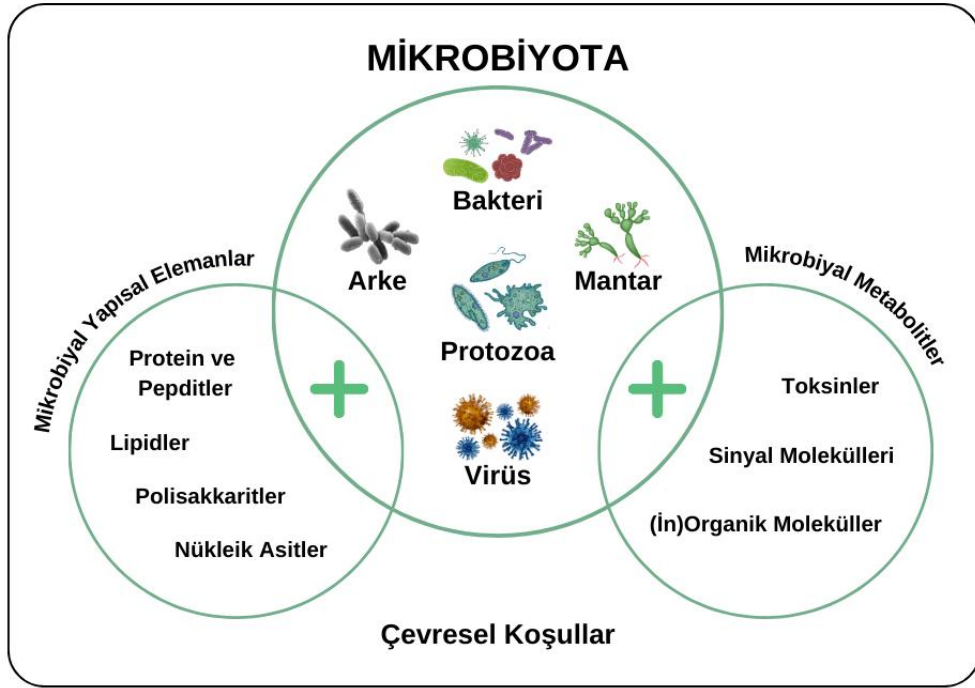
2.2. Mikrobiyota

Mikrobiyota, belirli bir çevrede bulunan mikroorganizmalar topluluğudur. İnsan vücudunda yer alan ve sayıları trilyonları bulan mikroorganizmalar, insan mikrobiyotasını oluşturur (Hayes ve Sahu, 2020). Çeşitli bakteri, mantar, arke, virüs ve protoza gibi türleri içeren mikrobiyota elemanları arasında konakçısı olduğu insan ile kommensal veya simbiyotik ilişki içinde bulunan non-patojen türler ve hastalık yapıcı patojen türler yer alabilir. Mikrobiyom kavramı ise önceleri mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmalara ait genomların bir toplamı olarak kullanılmış ancak yapılan çalışmalar, bu kavramın tanımında önemli değişikliklere yol açmıştır (Şekil 2.4). Güncel yaklaşım, mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmalarla beraber açığa

çıkardıkları ürünlerin de dahil edildiği bir sistem olarak mikrobiyom kavramının üzerinde durmaktadır (Berg, vd., 2020).

Her ne kadar insan vücudunun yalnızca insan hücrelerinden, genomunun ise yalnızca insan genomundan oluşmadığının keşfedilmesi görece eski bir zamana dayansa da mikrobiyota hakkındaki araştırmalar, 21. Yüzyılın başlarında yoğunlaşmıştır. Dizileme teknolojilerinde meydana gelen önemli ilerlemeler ve yeni nesil dizilemenin ortaya çıkışı, mikrobiyota çalışmalarının yürütülmesine de büyük kolaylık sağlamıştır.

MİKROBİYOM



Şekil 2.4. Bir sistem olarak mikrobiyom kavramı (Berg ve ark., 2020)

Mikrobiyomun özellikle immün sistem ve metabolik süreçlerde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Meldrum, vd., 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, parmak izi gibi bireye özgü olan mikrobiyomun başta obezite gibi inflamatuvar hastalıklar olmak üzere pek çok çeşitli hastalık ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Young, 2017). İnsan Genom Projesinin ardından başlatılan İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP), mikrobiyomun araştırılmasına yönelik girişimlere öncülük etmiştir. HMP, pek çok önemli kuruluş ve bilim insanının dahil olduğu, oldukça geniş çaplı, uluslararası bir projedir (Turnbaugh, vd., 2007). On yılı aşkın

sürede yürütülen ve iki ayrı fazdan oluşan projenin ikinci fazı 2016'da tamamlanmıştır. İlk faz çalışmalarında, mikrobiyomun yapısı, fonksiyonu ve çeşitliliği incelenerek sağlıklı bir mikrobiyota tanımı yapılmak istenmiştir (Human Microbiome Project, 2012). Bu doğrultuda metagenomik bir yaklaşım benimsenmiş, mikrobiyomun karakterizasyonu, bireyler arası farklılıkların ve mikrobiyotayı etkileyen faktörlerin anlaşılması, mikrobiyota kompozisyonu veya belli spesifik türler ile fenotip arasındaki korelasyonların belirlenmesi hedeflenmiştir (Human Microbiome Project, 2012). İnsan mikrobiyomuna ait oldukça önemli bilgilerin elde edildiği bu projede mikrobiyomun taksonomik kompozisyonunun belirlenmesinin, konağın fenotipi ile korelasyon kurmak için tek başına yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır (The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2019). Multi-omiks yaklaşımın benimsendiği ikinci fazda ise immünite, metabolizma, dinamik moleküler aktivite gibi bileşenleri içeren mikrobiyom-konak ilişkisi, zaman içerisinde ve farklı koşullarda meydana gelen değişimler ve bunların etkisi, mikrobiyotayı oluşturan elemanlara ek olarak kullandıkları ve açığa çıkardıkları metabolitler, gen ekspresyon profilleri, kodladıkları transkriptler, ürettikleri proteinler de incelenmiştir (Lloyd-Price, vd., 2017). Mikrobiyom kompozisyonu üzerinde etkili olduğu bilinen, gebelik ve erken doğum, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve prediyabetli bireyleri etkileyen stresörleri içeren üç farklı koşulun da modellendiği bu faz, mikrobiyal dinamiklere ek olarak bunlarla ilişkili konak tepkileri ve mikrobiyal karşılıklı ilişkiler hakkında da oldukça önemli bilgiler sunmuştur (The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2019).

HMP ve takip eden çalışmalar, mikrobiyotanın insan sağlığı ve hastalıklar üzerindeki önemli fonksiyonlarını gözler önüne sermektedir. Bu fonksiyonların anlaşılması ve mikrobiyotanın manipülasyonuna yönelik yöntemlerin geliştirilerek çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılması, günümüzde yoğun ilgi gören ve önem arz eden hedefler haline gelmiştir.

2.2.1. Beslenme, Obezite ve Mikrobiyota

Beslenme, mikrobiyotayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Özellikle yüksek yağlı beslenmenin başta bağırsak florası olmak üzere genel olarak mikrobiyotada ciddi dengesizliklere neden olabildiği bilinmektedir (Bisanz vd., 2019; David vd., 2014). Sağlıksız beslenme ve hareketsizliğin birincil sonuçlarından olan obezite, 2013 yılında Amerikan Tıp Birliği tarafından bir hastalık olarak kabul

edilmiştir. Obezite, eşlik eden hastalıklar ve mortalite nedeniyle tedavi edilmesi ve önlenmesi gereken bir pandemi olarak değerlendirilmektedir (Meldrum, vd., 2017). Dünya genelinde artan prevelansa ülkemizdeki tablo da eşlik etmektedir. TÜİK verilerine göre 15 yaş ve üstü obez bireylerin oranı 2016 yılında %19,6 iken 2019 yılında %21,1'e yükselmiştir. Erkeklerde ise bu oran 2008 yılında %12,3'ken 2019 yılında %17,3 seviyesine ulaşmıştır (TÜİK, 2019).

Obezite, beslenme şekli, hareketsizlik gibi yaşam tarzı alışkanlıkları, çevresel ve genetik faktörlerden kaynaklanabilmektedir. Güncel çalışmalar, mikrobiyotada meydana gelen değişimleri ifade eden disbiyozisin de obezite gelişimine katkı sağladığını bildirilmektedir. Son zamanlarda obezite ile mikrobiyota arasında karşılıklı bir ilişkinin var olabileceği üzerinde durulmaktadır. Bu konudaki ilk araştırmalardan birinde Ley ve ark., obezitenin belirli bir mikrobiyota profili ile bağlantılı olduğunu ve bağırsak florasında *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* grupları arasındaki dengeyi *Firmicutes* lehine çevirdiğini göstermişlerdir (Ley, vd., 2006). Buna ek olarak fekal transplantasyon çalışmaları, obez mikrobiyotasının aktarımının germ-free farelerde obeziteyle sonuçlandığını göstermektedir. Benzer şekilde, düşük kilolu bireylere ait mikrobiyotanın germ-free farelere aktarımı da farelerin düşük kilolu olmasıyla sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar, mikrobiyota bileşiminin obeziteye yatkınlık oluşturabileceğini ortaya koymaktadır (Leocádio, vd., 2020).

Mikrobiyotanın obezite ile ilişkisinin altında yatan temel mekanizmalar, enerji tüketimi, metabolik aktiviteler ve inflamatuvar fonksiyonlarla ilgilidir (Tilg ve Kaser, 2011). Mikrobiyota elemanlarının ana görevlerinden biri, diyetle alınan ve sindirilemeyen polisakkaritlerin hidrolizi ve fermentasyonudur. Aynı zamanda bazı vitaminler, metabolitler ve aktif sinyal molekülleri olan kısa zincirli yağ asitlerini üreterek metabolik yollarda görev alırlar (Durmaz, 2019). Fareler üzerinde yapılan çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının diyetten elde edilen enerji ve bu enerjinin depolanmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Bäckhed, vd., 2004).

Obezite ve obezite ile ilişkili hastalıkların patofizyolojisinde yer alan önemli özelliklerden biri de inflamasyondur (Ferrante Jr, 2007). Cani ve ark., tarafından tanımlanan metabolik endotoksemi, plazmada bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) miktarının anormal artışıyla karakterize edilir ve obezite, insülin direnci ve diyabetin gelişiminde rol oynar (Cani, vd., 2007). Yüksek yağlı diyet, bağırsak mikrobiyotasında LPS içeren mikrobiyal içerik oranını arttırmakta ve böylece

metabolik endotoksemiye tetiklemektedir. Obezlerde bağırsak bariyerinde görülen disfonksiyonun bağırsak geçirgenliğini arttırdığı ve bu şekilde metabolik endotoksemiye yol açan mikrobiyal içeriğin sistemik dolaşıma katılarak inflamasyonu tetiklediği ileri sürülmüştür (Patterson, vd., 2016).

2.3. Obezite ve Erkek İnfertilitesi

Obezite ile erkek infertilitesi arasında pek çok yönden önemli bir bağlantı olduğu bilinmekte ve altta yatan mekanizmalar halen araştırılmaktadır (Hammoud vd., 2008; Kahn vd., 2017). Obezite, başta hormonal bozukluklar olmak üzere, spermatogenezdeki bozukluklar, testiküler ısı artışı, düşük sperm kalitesi, SDF ve erektil disfonksiyon ile ilişkili olarak fertilitiyi olumsuz etkilemektedir (Leisegang, vd., 2021). Adipoz dokudan salgılanan çeşitli elemanların da desteğiyle artan inflamasyon, reaktif oksijen türlerinin birikmesiyle oksidatif strese neden olmakta ve sperm hücreleri de dahil pek çok hücrede hasara ve SDF'na yol açmaktadır (Kahn ve Brannigan, 2017). Sperm DNA'sının bütünlüğü, sperm fonksiyonları ve üreme sağlığı üzerinde oldukça önemli bir role sahiptir. Dolayısıyla çeşitli faktörlere bağlı olarak meydana gelen SDF, sperm hücrelerinde fonksiyonel ve yapısal bozukluklara sebep olarak fertilitiyi doğrudan etkileyebilmektedir. Obez erkeklerde SDF'nun daha fazla; sperm motilitesinin ve sperm kalitesinin daha düşük olduğu gösterilmiştir (Dupont, vd., 2013) Obezitenin değerlendirilmesinde temel tanı kriteri olan beden kitle indeksinin (BMI) artışının, ejakulat hacmi, sperm konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi ile negatif korelasyon gösterdiği ve obezler arasında azospermi ve oligospermi prevalansının daha yüksek olduğu görülmüştür (Bieniek vd., 2016; Sermondade vd., 2013). Yüksek BMI değeri, aynı zamanda üreme hormonlarını da olumsuz etkilemektedir.

2.4. Beslenme ve İnfertilite

Beslenmenin üreme sağlığı üzerindeki etkisini araştıran pek çok çalışma mevcuttur. Diyet bileşenleri, spermatogenezi ve sperm kalitesini etkileyerek veya üreme hormonları ile ilişkili olarak fertilitiyi üzerinde rol oynuyor olabilir (Nassan, vd., 2018). Çalışmalar, çoğunlukla besinlerin yağ asidi ve antioksidan içeriklerine odaklanmaktadır. ROS aşırı üretiminin, erkek infertilitesinin altında yatan mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir. Antioksidanlar, hücreleri reaktif oksijen türlerinin yol açtığı oksidatif stresten ve oksidatif stres kaynaklı hasarlardan korumaktadır. C vitamini, E vitamini ve koenzim Q10, erkek infertilitesinin

tedavisinde etkinliği kanıtlanmış antioksidan bileşenlerdir (Sheweita, Tilmisany vd., 2005).

Fertilizasyonun gerçekleşmesinde sperm membranının rolü oldukça önemlidir ve membranın içerdđi yağ asitleri, sağlıklı sperm fonksiyonunun güçlü bir bileşenidir. Bitkisel gıdalarda ve balıklarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) miktarı, spermde yüksek bir orana sahiptir ve spermin olgunlaşmasıyla birlikte artış gösterir (Benatta, vd., 2020). Çoklu doymamış yağ asitleri vücutta üretilemedikleri için diyetle karşılanmalıdır. Bu nedenle, çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin beslenme, sperm fonksiyonu açısından önemli görünmektedir. Bunun aksine doymuş yağ asitlerinin fazla tüketimi, düşük sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı ile ilişkili bulunmuştur (Jensen, vd., 2012). Batı tipi beslenmenin yaygınlaşmasıyla birlikte artan yüksek yağlı diyet tüketiminin mikrobiyotanın disbiyozisine yol açtığı ve obezite de dahil birçok kronik hastalıkla ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Murphy, vd., 2015; Wilkins, vd., 2019). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyetin seminal sıvıda ve dışkıda bulunan mikrobiyal içeriği değiştirdiği rapor edilmiştir (Javurek, vd., 2017).

2.5. Mikrobiyota ve Erkek İnfertilitesi

2.5.1. Seminal Mikrobiyom

Mikrobiyotanın keşfinden itibaren konuyla ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Başta bağırsak mikrobiyotası olmak üzere gastrointestinal kanal, ağız içi, burun boşluğu, deri gibi vücudun farklı bölgelerinden alınan örneklerden izole edilen türler incelenmiştir. Yakın zamana kadar ürogenital sistemin steril olduğuna yönelik inanç, genital kanallara ait mikrobiyotanın keşfini geciktirmiştir. Dizileme teknolojilerindeki gelişmeler sonucunda ürogenital sistemin steril olmadığının anlaşılmasıyla birlikte araştırmalar, öncelikle vajinal mikrobiyotaya odaklanmıştır. Anne-bebek arasındaki aktarım, özellikle ilgi çeken bir nokta olmuştur. Erkek genital sistemi ve semenin mikrobiyal içeriği ise nispeten yeni bir konudur (Kim, M.S. ve Jung, S.I., 2021).

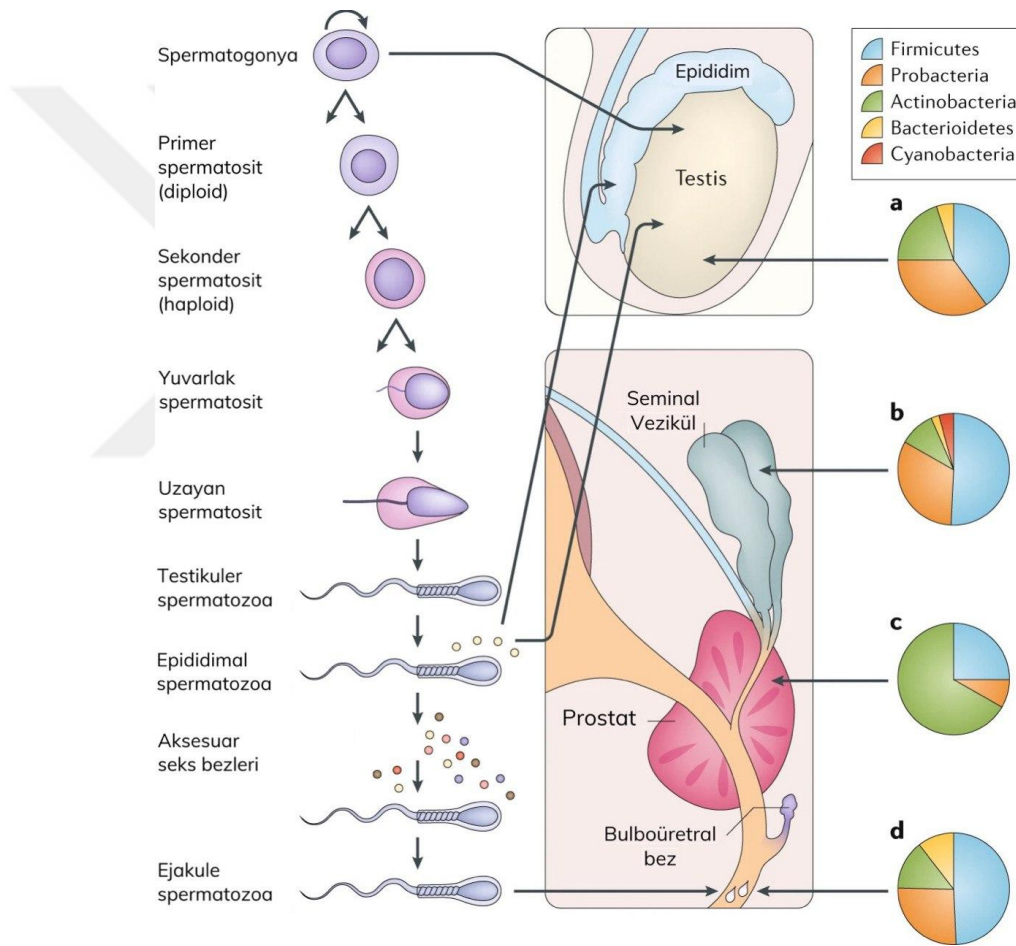
Testiste üretilen sperm hücreleri, epididimde matürasyonunu tamamladıktan sonra üretraya ulaşır ejaküle olana dek ejakulatör kanallar boyunca ilerler ve seminal veziküller, prostat, periüretral ve bulboüretral bezlerdeki sıvılar ile karışarak semeni oluşturur. Semen, spermatozoanın korunması ve beslenmesi için gerekli ortamı

sağlayacak şekilde çeşitli lipidler, sakkaritler, glikanlar, tuzlar, inorganik iyonlar, vitaminler, proteinler, peptidler ve bağışıklık bileşenlerini içeren oldukça zengin bir karışımdır (Hopkins, vd., 2017). Hafif bazik yapıdaki bu sıvı (pH 7,2-8), mikroorganizmaların yaşaması ve taşınması için de son derece elverişli bir ortam oluşturmaktadır. Spermatazoanın temel enerji kaynağı olan fruktoz ve semen içeriğinde yer alan diğer karbonhidratlar, bakterilerin de beslenmesine olanak tanımaktadır.

2.5.1.1. Seminal Mikrobiyomun Kaynağı

Önceleri patolojik bir durum olarak değerlendirilen bakteriospermi, infertiliteyle ilişkilendirilmiştir (Baud, vd., 2019). Dolayısıyla, seminal bakterilerle ilgili araştırmalar öncelikle potansiyel patojen türleri belirlemeye yönelik olmuştur ancak bazı çalışmalar bakterilerin sağlıklı donörlerde de bulunabildiğini göstermiştir. Bu durum, semende yer alan bakterilerin daima enfeksiyonla ilişkili olmadığını düşündürmüş ve fertilité üzerindeki etkilerinin incelenmesi için teşvik edici olmuştur. Hou ve ark., inceledikleri 30 semen örneğinin 28'inde seminal sıvıda bulunan bakteri sayısının sperm hücresinden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Hou, vd., 2013). Bakterilerin bu bolluğu tespit edilmiş olsa da seminal mikrobiyomun nereden kaynaklandığı ve gözlemlenen bu türlerin ne kadar kalıcı olduğu hakkındaki soru işaretleri tam olarak giderilememiştir. Kermes ve ark., semen ve idrar mikrobiyomunu karşılaştırdıkları çalışmada, bu iki örnekte bulunan mikroorganizmaların yalnızca üçte bir oranında benzerlik gösterdiğini ve semendeki bakteriyel yükün idrara kıyasla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (Kermes, vd., 2003). Bu sonuçlar, semen mikrobiyomunun sadece üretradan kaynaklanmadığını ve ürogenital kanalın daha üst üyelerinden köken alabileceğini göstermektedir. Erkek üreme sisteminin farklı anatomik bölgelerinden izole edilen mikrobiyal içerikler incelendiğinde, her bölgenin kendine özgü bir mikrobiyoma sahip olduğu görülmüştür (Koedooder, 2018). Ejaküle olana denk tüm bu sistemi dolaşan ve aslında farklı elemanların salgılarının bir karışımı olan semenin mikrobiyomunun ise her bir bölgeye ait çeşitli türleri içerdiği ve bir koleksiyon olarak değerlendirilmesi gerektiği öne sürülmüştür (Şekil 2.5). Aynı zamanda bağırsak mikrobiyotası ve oral mikrobiyotanın da hematojen veya lenfojen yayılım yoluyla seminal mikrobiyoma katkı sağlayabileceği ifade edilmiştir (Altmäe, vd., 2019).

Seminal mikrobiyomun içeriğinde etkili olan bir diğer faktör ise seks partneridir. Yapılan çalışmalar, seminal mikrobiyom ile vajinal mikrobiyomun etkileşim içerisinde olduğunu ve partnerlerin mikroorganizmaları paylaşarak ortak bir seminovajinal mikrobiyom geliştiriyor olabileceğini göstermiştir (Hou, vd., 2013; Koedooder vd., 2018; Mandar, vd., 2015). *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Porphyromonas* ve *Atopobium* başta olmak üzere seminal ve vajinal mikrobiyom arasında pek çok ortak türün yer aldığı tespit edilmiştir. Bu benzerlik, partnerin vajinal mikrobiyomunun da semen mikrobiyomunun kaynaklarından olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 2.5. Erkek ürogenital sisteminde bulunan bakteri topluluklarının şube düzeyinde dağılımı (Altmae, vd., 2019)

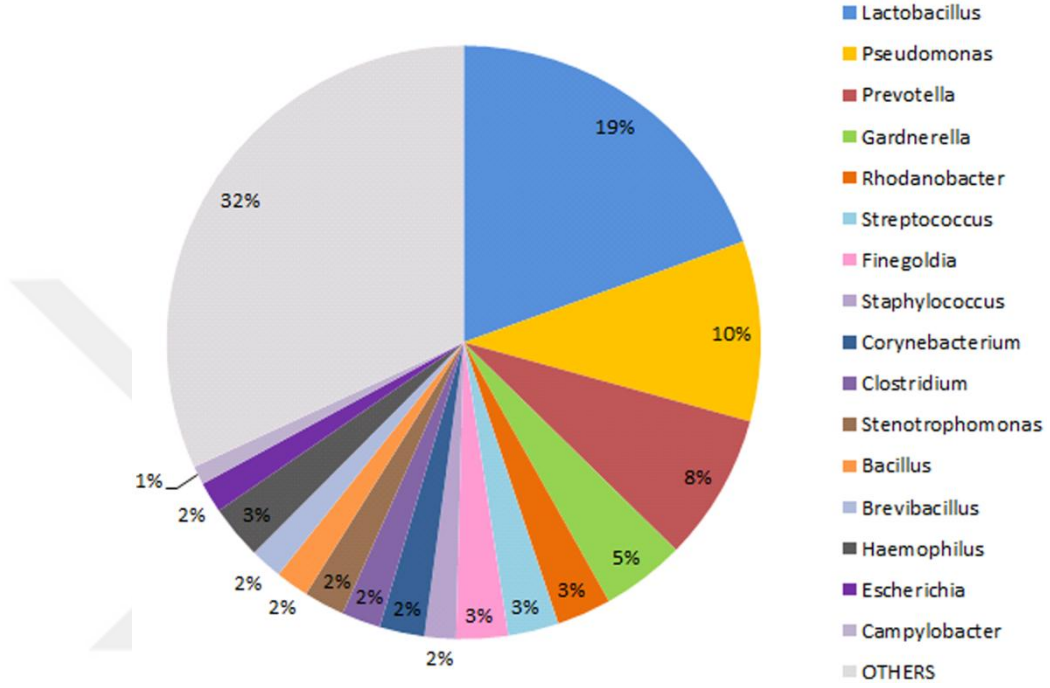
2.5.1.2. Seminal Mikrobiyomun İçeriği

Yapılan çalışmalar, farklı erkeklerin semenlerinde yer alan bakteriyel toplulukların önemli oranda çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymuştur (Weng, vd., 2014). Bu çeşitlilik, her bireyin kendine özgü bir seminal mikrobiyoma sahip

olabileceği şeklinde yorumlanmaktadır. Mikrobiyotayı etkileyen temel faktörler, yaş, etnik köken, coğrafik konum, genetik, beden kitle indeksi, hastalıklar, başta antibiyotikler olmak üzere kullanılan ilaçlar ve uygulanan tedaviler, diyet, egzersiz gibi yaşam tarzı alışkanlıkları olarak bilinmektedir. Bunlara ek olarak, seminal mikrobiyomu, hijyen uygulamaları, sünnet durumu, cinsel aktivite, prostatit gibi faktörlerin de etkileyebildiği bildirilmiştir (Altmae, vd., 2019).

Semenin mikrobiyal içeriğinin incelendiği çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Konuyla ilgili ilk araştırmalardan birinde Weng ve ark., seminal mikrobiyotada yer alan en yaygın cinslerin *Lactobacillus* (~%20), *Pseudomonas* (~%10), *Prevotella* (~%9) ve *Gardnerella* (~%4) olduğunu bildirmişler ve seminal bakteri komünitelerini *Lactobacillus*'un, *Pseudomonas*'ın ve *Prevotella*'nın predominant olduğu üç ana gruba ayırmışlardır (Şekil 2.6) (Weng, vd., 2014). Yao ve ark., semen örnekleri için iki farklı mikrobiyota profili belirlemişler, bu profilleri *Lactobacillus*'tan zengin ve *Streptococcus*'tan zengin şeklinde isimlendirmişlerdir (Yao, vd., 2022). Şube seviyesindeki incelemeleri sonucunda seminal mikrobiyomdaki en baskın şubelerin *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Bacteroidetes* olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada cins seviyesinde *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, *Staphylococcus*, *Gardnerella*, *Ralstonia*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Actinobacter*, *Rhodococcus*, *Finegoldia*, *Peptoniphilus*, *Enterococcus*, *Prevotella* ve *Haemophilus*, seminal mikrobiyomda en bol bulunan bakteri cinsleri olarak tespit edilmiştir. Bukharin ve ark., semen mikrobiyotası ve sitokinlerini araştırdıkları çalışmalarında, sağlıklı erkeklerin semenlerinde en baskın bulunan bakteri cinsinin *Staphylococcus*; en az yaygın cinslerin ise *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Vellonella* ve *Enterococcus* olduğunu bulmuşlardır (Bukharin, vd., 2022). Konuyla ilgili en güncel çalışmalardan olan Garcia-Segura ve arkadaşlarının çalışmasında, seminal mikrobiyotanın temel olarak 4 şubeyi içerdiği gözlemlenmiştir. Aralarında en yaygın olanı, ~%59'luk bir oranla *Firmicutes*'tir ve bu şubeyi, ~%19 ile *Proteobacteria*, ~%8 ile *Actinobacteria* ve ~%5 ile *Bacteroidetes* takip etmektedir. Toplamda 168 cinsin tespit edildiği bu çalışmada, en yaygın cinslerin *Finegoldia*, *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Prevotella*, *Ezakiella*, *Corynebacterium* ve *Lactobacillus* olduğu görülmüştür (Garcia- Segura, vd., 2022). Seminal mikrobiyotanın sperm parametrelerine katkısına

bakıldığında *Ralstonia*, *Bacillus* ve *Steroidobacter* cinslerinin bolluğu seminal volümde artışla; *Flavobacterium* cinsi ise yüksek progresif motilite ile ilişkili bulunmuştur. Toplam motilite ise *Filifactor* ve *Gardnerella* cinslerinin varlığıyla artış göstermiştir. *Moraxella* ve *Massilia* cinslerinin artışının sperm morfolojisine katkı sağladığı görülmüştür (Garcia-Segura, vd., 2022).



Şekil 2.6. Semende bulunan bakteri cinslerinin nisbi bolluk değerleri (Weng, vd., 2014)

Birçok çalışmanın ortak sonuçlarından biri *Lactobacillus* türlerinin, sağlıklı erkeklerin semeninde daha fazla bulunuyor oluşudur. Dolayısıyla *Lactobacillus* bolluğu, sperm kalitesindeki artış ile ilişkilendirilebilmektedir. Probiyotik etkisi bilinen laktobasillerin aynı zamanda vajina, ağız boşluğu ve gastrointestinal sistemde de yaygın olarak bulunduğu ve vajinadaki predominant bakteri cinsi olduğu görülmektedir. Laktobasillerin enfeksiyonlara karşı koruyucu işlevlere sahip oldukları belirlenmiş ve bakteriyel vajinozisin tedavisindeki etkinliği kanıtlanmıştır (Anukam, vd., 2006; Mastromarino, vd., 2009). Bu kanıtlar, laktobasillerin sperm için de koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Üç farklı *Lactobacillus* türünün kombine halde uygulandığı semen örneklerinde, laktobasillerin sperm hücrelerini lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu ve bu yolla sperm motilite ve viabilitesine katkı sağladığı gösterilmiştir (Barbonetti, vd., 2011).

2.5.1.3. Seminal Mikrobiyom ve İnfertilite

İnfertil ve fertil erkeklerin seminal mikrobiyomlarının karşılaştırıldığı çalışmalar, semende bulunan mikrobiyal içerik ve çeşitliliğin sperm parametrelerini etkileyerek erkek infertilitesi ile ilişki olabileceğini ortaya koymaktadır. Seminal mikrobiyom ile infertilite arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmada Hou ve ark., donörler ve infertil hastaların semen mikrobiyotaları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlemeseler de *Anaerococcus*'un düşük sperm kalitesi için bir biyobelirteç olabileceğini öne sürmüşlerdir (Hou, vd., 2013). Weng ve ark., yedi klinik kriterin ölçümü ile semen kalitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, düşük kaliteli semen örnekleriyle normal örneklerde bulunan bakteri komünitelerini incelemiştir. *Lactobacillus* ve *Gardnerella* oranının normal örneklerde, *Prevotella* oranının ise düşük kaliteli örneklerde önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür (Weng, vd., 2014). Farklı fenotiplerdeki infertil gruplarda bakteriyel kompozisyonları inceleyen bir çalışmada, seminal hiperviskozite ve oligoastenoteratozoospermide bakteri komünitelerinin kompozisyonu, kontrol grubuyla anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, mikrobiyota değişimlerinin ve konağın immün yanıtlarının erkek infertilitesinin kompleks fenotipleri üzerindeki güçlü etkisini ortaya koyduğu şeklinde yorumlanmıştır (Monteiro, vd., 2018). Baud vd., sperm mikrobiyotasının semen parametreleri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, benzer şekilde *Prevotella* cinsinin anormal spermiogram parametrelerine sahip örneklerde; *Staphylococcus* cinsinin ise normospermik grupta daha zengin olduğunu ortaya koymuştur. Yine aynı çalışmada, normal sperm morfolojisine sahip semen örneklerinin *Lactobacillus* cinsinden zengin olduğu görülmüştür (Baud, vd., 2019). Primer idiyopatik infertil ve fertil erkeklerden alınan rektal sürüntü, idrar ve semen örneklerinin incelendiği bir diğer çalışmada ise *Prevotella* bolluğu, doğrudan BMI ile ilişkili ve semen konsantrasyonu ile ters orantılı; *Pseudomonas* bolluğu da toplam motil sperm sayısı ile doğrudan ilişkili bulunmuştur (Lundy, vd., 2021). Bukharin ve ark., infertil erkeklerin semenlerinde *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Enterococcus* olmak üzere üç ana grubun bulunduğunu belirtmiş ve bu üç bakteri cinsinin sağlıklı erkeklerdekine kıyasla infertil erkeklerde daha yüksek seviyede biyofilm oluşumuna katıldıklarını belirlemişlerdir (Bukharin, vd., 2022). İdiyopatik infertil erkeklerle yapılan bir çalışmada, *Paenibacillaceae* ve *Lachnospiraceae* ailelerine ait bakterilerin ve

Ralstonia cinsinin düşük sperm konsantrasyonu ile; *Peptoniphilus* cinsinin düşük progresif motilite ile ve *Sphingomonadaceae* ailesinin ise toplam motilitede azalma ile ilişkili olduğu görülmüştür (Garcia-Segura vd., 2022). *Ralstonia*, *Bacillus* ve *Steroidobacter* cinslerinin bolluğu, seminal volümde artışla; *Flavobacterium* cinsi ise yüksek progresif motilite ile ilişkili bulunmuştur. Toplam motilite ise *Filifactor* ve *Gardnerella* cinslerinin varlığıyla artış göstermiştir. Ayrıca, *Moraxella* ve *Massilia* cinslerinin artışının sperm morfolojisine katkı sağladığı görülmüştür. Aynı çalışmada, *Phylobacteria* ve *Vibrionacea* ailelerine ait bakterilerin donörlerde, infertil hastalara kıyasla daha fazla bulunduğu belirtilmiştir.

Farklı semen anomalilerine sahip olan hastalarda semen, bağırsak ve idrar mikrobiyotasının incelendiği bir çalışmada ise cins bazında *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Finegoldia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Ureaplasma* ve diğer tanımlanmamış bakterilerin semende predominant olduğu ifade edilmiştir (Cao, vd., 2023). Bu çalışmada, *Staphylococcus*'un semen için potansiyel bir patojen olduğu belirlenmiş, astenospermi ve seminal hiperviskozitenin görüldüğü semen örneklerinde önemli oranda artış gösterdiği tespit edilmiştir. Daha önce yapılan in-vitro bir çalışmada ise *Staphylococcus* türlerinin, sığır semeninde oksidatif stresi arttırarak DNA fragmentasyonunda artışa ve mitokondriyel membran potansiyelinde bozulmaya yol açtığı ve sperm motilitesini düşürdüğü gözlenmiştir (Duracka, vd., 2021).

Mikrobiyota ve sperm parametrelerinin incelendiği araştırmalarda özellikle *Prevotella* cinsi dikkat çekmektedir. Ortak sonuçlar, bu cinsin başta sperm motilitesinde bir azalmayla ilişkili olarak düşük sperm kalitesiyle bağlantılı olabileceğini göstermektedir.

Erkek infertilitesi, mikrobiyota ve obezite arasındaki üçlü ilişkiyi araştıran çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Ding vd., 2019 yılında yapmış oldukları çalışmalarında yüksek yağlı diyetle beslenen farelerden alınan fekal mikropların normal diyetle beslenen farelere aktarılmasının, sperm sayısı ve motilitesinde belirgin bir azalmaya neden olduğunu bulunmuştur (Ding, vd., 2019). Yakın zamanda zebra balıkları üzerinde yapılmış bir çalışmada ise obezitenin sperm motilitesinde ciddi oranda azalmayla beraber testiküler mikrobiyota kompozisyonunu bozduğu gösterilmiştir (Su vd., 2021). Her iki çalışmada da ortak olarak pro-inflamatuvar sitokinlerde bir artış gözlemlenmiştir. Ürogenital sistem

mikrobiyotasındaki bozulmalar, inflamasyonla ilişkili olarak sperm parametrelerini olumsuz etkiliyor olabilir. Obezite-infertilite ilişkisine dair kanıtlar göz önünde bulundurulduğunda obezitenin seminal mikrobiyotadaki değişiklikler ile fertilité üzerinde etkili olabileceği varsayımında bulunmak mümkündür.

2.6. Mikrobiyota Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

Mikrobiyota çalışmalarında temel olarak, belirli bir çevrede yaşamını sürdüren mikroorganizmaların tanımlanması, filogenetik sınıflandırmaların yapılması, baskın türlerin ve mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu çevreler, insan için çeşitli vücut bölgeleri, organlar veya salgılardır. Seçilen bölgeden alınan örneklerden izole edilen mikroorganizmalar, erken dönem çalışmalarında ışık mikroskobu altında incelenerek morfolojilerine göre tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu yöntem yalnızca çok iyi bilinen türlerin tanımlanabilmesine olanak tanımaktadır. Mikrobiyota içerisinde bakterilerin dışında virüsler, arkeler, mantarlar gibi farklı organizmalar da yer almakla beraber çalışmaların odak noktası çoğunlukla bakterilerdir.

2.6.1. Kültür Temelli Yöntemler

İlk mikrobiyota çalışmalarında mikroskopiden sonra geleneksel kültür yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerde örnekten izole edilen bakteriler, kültürlenerek çoğaltılmakta, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak fenotiplendirilmektedir. Kültür temelli yöntemler maliyet açısından uygundur ancak zahmetli ve zaman alıcı olmak gibi dezavantajlara sahiptir (Koedooder, vd., 2019). Aynı zamanda elde edilen sonuçların güvenilirliği tartışmalıdır. Bunun en önemli nedeni, oluşturulan kültür ortamının özelliklerinin her bakteri türü için uygun olmaması ve bazı bakteri türlerini avantajlı konuma getirmesidir. Böylece özel kültür ortamı tarafından metabolik ve fizyolojik ihtiyaçları karşılanan ve hızlı çoğalabilen, özellikle aerobik bakteri türleri baskın hale gelerek mikrobiyal dağılım hakkındaki sonuçların gerçeği yansıtmasını engelleyebilmektedir (Sarangi, vd., 2019).

2.6.2. Kültürden Bağımsız Yöntemler

Kültüre bağımlı yöntemlerin sınırlılıklarının fark edilmesi, kültürden bağımsız yöntemlerin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Bu moleküler yaklaşımlarla, örnekten elde edilen genetik materyal doğrudan incelenerek kalitatif ve kantitatif bilgiler elde

edilebilmektedir. Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olan bu yöntemlerde 16S ribozomal RNA (rRNA) önemli bir bilgi kaynağıdır.

16S rRNA, bakterilerde ribozomal RNA'nın küçük alt birimini oluşturmaktadır. Yaklaşık 1500 baz çiftinden oluşan bu yapı, bakteriyel genom tarafından kodlanır (Sarangi, vd., 2019). Bakteriler arasında yüksek oranda korunmakla birlikte değişken bölgelere de sahiptir. V1'den V9'a kadar isimlendirilen bu hiperdeğişken bölgeler, 16S rRNA genlerinin bakteri türleri hakkında filogenetik bilgi sunan önemli belirteçler haline gelmesine neden olmaktadır. Korunan bölgeler iyi bilindiği için polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılacak olan primerler kolaylıkla dizayn edilebilmekte, bakteri hücresi içerisinde çok sayıda 16S rRNA kopyasının bulunması ise çalışmaların duyarlılığını arttırmaktadır (Gürsoy ve Barış, 2017).

Kültürden bağımsız yöntemler, moleküler fingerprinting ve dizileme gibi yöntemlerden oluşmaktadır. Moleküler fingerprinting yöntemleri, örnekten izole edilen bakteriyel genomun doğrudan dizilemesi yapılmadan incelendiği teknikleri içermektedir. En sık kullanılan tekniklerden denatüre gradyan jel elektroforez (DGGE), sıcaklık gradyan jel elektroforez (TGGE) ve terminal restriksiyon uzunluk polimorfizmi (T-RFLP), 16S rRNA geninin PCR amplifikasyonundan sonra farklı şekillerde fragmanlara ayrıştırılarak jelde yürütülmesi ve DNA fragmanlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre incelenmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde gözlemlenen farklı bant örüntüleri, farklı taksonlara ait bilgi vermektedir. Her bir tekniğin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmakla birlikte parmak izi yöntemleri genel anlamda taksonomik sınıflandırmaya imkan tanımaktan yoksundur (Costa ve Weese, 2019). Bant örüntüleri incelenerek bakteriyel toplulukların farklılıkları hakkında bilgi edinilse de bu farklılığın hangi türlerden kaynaklandığı ve ne anlama geldiği hakkında yorum yapmak mümkün olmamaktadır.

Diğer teknikler arasında yer alan floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ve DNA mikroyarray ise prob hibridizasyonuna dayanmaktadır (Fraher, vd., 2012). Floresanla işaretlenmiş oligonükleotid problemlerinin hedeflenen komplementer 16S rRNA sekanslarıyla hibridizasyonu ile filogenetik identifikasyon gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemlerin temel sınırlılığı, spesifik problemlerin kullanılması nedeniyle yalnızca halihazırda sekansı bilinen türlerin varlığının ya da yokluğunun tespitine imkan tanımalarıdır. Bilinmeyen yeni türlerin identifikasyonu ise mümkün değildir. FISH,

PCR'dan bağımsızdır ve dolayısıyla PCR kaynaklı yanlışlıklardan muaftır. Bu yöntem ile örnek içerisinde yer alan karışık bir bakteri topluluğu hakkında kantitatif bilgi edinilebilir. Mikroarray ise FISH'ten farklı olarak aynı anda yüzlerce bakteri türü için tarama gerçekleştirebilmekle birlikte kantitatif olmayan bir yöntemdir. Mikroarray sonuçlarının PCR tabanlı yöntemlerle birleştirilmesiyle kantitatif bilgi eldesi de mümkün olmaktadır (Campbell, 2017).

Kantitatif PCR (qPCR), PCR'ın bu noktadaki eksikliğini bertaraf eden bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntemde klasik PCR'a ek olarak floresan veya boya ile işaretlenmiş probalar kullanılmakta ve belirlenen dizinin amplifikasyonu gerçek zamanlı olarak izlenmektedir (Fraher, vd., 2012). Böylece spesifik problemlerin hedeflediği dizilerin mevcudiyetine ek olarak miktarı hakkında da yorum yapılabilmektedir. qPCR ile spesifik bakteri türlerinin tespiti ve kantifikasyonu oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. TGGE, FISH gibi yöntemlere nazaran daha güvenilir sonuçlar vermekle beraber bu yöntemde de benzer şekilde yeni türler tanımlanamamaktadır (Ott, vd., 2004). Daha yeni bir PCR teknolojisi olan dijital PCR (dPCR) ise mikrobiyota çalışmalarında kullanılmaya başlanmış bir yöntemdir ve qPCR'dan daha güçlü ve güvenilir olarak değerlendirilmektedir (Ricchi, vd., 2017).

Dizileme, tür seviyesinde filogenetik tanımlamalar için altın standart olarak kabul edilmediği (Fraher, vd., 2012). Klonlanmış 16S rRNA geninin dizilenmesi, 16S rRNA ampikonlarının doğrudan dizilenmesi ya da tüm genomun dizilenmesi ile mikrobiyota elemanları hakkında detaylı bilgi edinilebilir.

Erken dönemde dizileme yöntemi olarak Sanger metodu kullanılmıştır. Bu klasik yöntemde 16S rRNA geninin tamamının vektörlere klonlanmasıyla klon kütüphanesi oluşturulmakta ve her gen ayrı ayrı dizilenmektedir. Oldukça zahmetli ve zaman alıcı olan bu yöntem, zamanla geliştirilerek otomatikleştirilmiştir (Costa ve Weese, 2019).

2.6.2.1. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme (NGS), nispeten düşük maliyetle, oldukça hızlı bir şekilde çok sayıda genetik materyalin dizilendiği dizileme teknolojileri için kullanılan bir terimdir. 454 Pyrosequencing, Illumina ve SOLiD gibi teknolojilerin başı çektiği yeni nesil dizileme, doğrudan ampikonların dizilenmesi ya da tüm genomun

dizilendiği metagenom dizilemesi şeklinde gerçekleştirilebilmektedir (Fraher, vd., 2012).

Hedeflenmiş ampliconların dizilenmesi yönteminde, 16S rRNA geninin belirli kısımları, klon kütüphanesi oluşturulmadan, PCR ile amplifiye edilerek dizilir. PCR amplifikasyonu, gen üzerinde yüksek oranda korunmuş bölgeleri hedefleyen evrensel primerler kullanılarak gerçekleştirilir. Türler arasında büyük ölçüde farklılık gösteren hiper-değişken bölgelerden faydalanılarak incelenen DNA'nın hangi taksona ait olduğu belirlenir (Costa ve Weese, 2019). Farklı türlere ait diziler birbirine ne kadar çok benzerlik gösterirse, bu bakterilerin o kadar üst düzeyde bir taksonomik sırada ilişkili olma olasılığının arttığı kabul etmektedir. Yarza vd., iki bakteri türünün aynı cinse mensup olduğunu söyleyebilmek için dizi benzerliğinin %94,5; aynı aileden olduklarını söyleyebilmek için %86,5; aynı takımdan olduklarını söylemek için %82; aynı sınıf için %78,5 ve şube için %75 gibi eşik değerlerini sağlıyor olması gerektiğini bildirmişlerdir (Yarza, vd., 2014).

Metagenom dizileme, “shotgun” dizileme olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde bir örnekten izole edilen genomik materyalin tümünün rastgele fragmanlara ayrılmasıyla metagenomik kütüphane oluşturulur. Fragmanlar dizilendikten sonra eşleşen kısımlar hizalanarak dizileme tamamlanır. Shotgun metagenomik dizileme, 16S rRNA geninin amplicon analizine kıyasla tür seviyesinde daha doğru sonuçlar sunmakla beraber hem daha pahalı hem de yoğun veri analizi gerektiren bir yöntemdir (Ranjan, vd., 2016). Bu yöntem, aynı zamanda, genlerin fonksiyonlarının ve genomun yapısının anlaşılması, yeni genlerin, metabolik yolların tanımlanmasına imkan sunmaktadır (Koedooder, vd., 2019).

Dizileme teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte mikrobiyotaya çalışmaları hız kazanmış, mikrobiyotanın sağlık ve hastalıklar üzerindeki etkileri önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Mikrobiyotayla yakından ilişkili olan obezite ise, günümüzde pandemi olarak değerlendirilen kayda değer bir sorundur. Obezitenin, aynı zamanda erkek infertilitesine yol açabileceği de bilinmektedir. Birlikte değerlendirildiğinde bu veriler, obezitenin mikrobiyotadaki değişimlerle ilişkili olarak erkek infertilitesine yol açabileceğini düşündürmektedir. Giderek artan bir insidans sergileyen erkek infertilitesi, halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Değerlendirmede kullanılan konvensiyonel semen analizi, infertilite olgularını açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle sperm fonksiyonlarını ölçmeye yönelik ileri testler giderek önem

kazanmaktadır. Dolayısıyla, potansiyel faktörlerin sperm DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu, total antioksidan kapasite gibi sperm fonksiyonları hakkında bilgi veren parametrelerle ilişkisinin incelenmesi önem taşımaktadır. Bu çalışma, obezitenin erkek infertilitesi ile ilişkisinde mikrobiyotanın rolünü incelemeyi ve açıklanamayan erkek infertilitesinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması konusunda literatüre katkı sağlamayı amaçlamaktadır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul İzni

Bu çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 31.03.2022 tarih ve 2022/139 Karar No'su ile etik kurul onayı alınmıştır.

3.2. Materyal

G Power programı ile yapılan hesaplamalarda, benzer çalışmadan (Alahmar, vd., 2018) elde edilen sonuçlar (varyans: %13 alındığında hesaplanan oran: 7.69) kullanılarak Tip I hata %5 ve çalışmanın gücü %80 olarak kabul edildiğinde çalışmaya alınması gereken kişi sayısı en az beş olarak hesaplandı. Bu verilere dayanarak çalışmaya beş obez infertil erkek ve kontrol grubu olarak normal yollardan çocuk sahibi olmuş en az beş obez erkek dahil edildi.

Hasta grubu, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Üroloji polikliniğine tüp bebek tedavisi için başvuran 30 kg/m^2 ve üzeri BMI değerine sahip, 18-55 yaş arasındaki gönüllü erkeklerden; kontrol grubu ise yine 30 kg/m^2 ve üzeri BMI değerine sahip, iki yaşından küçük çocuğu olan ve yaşları hasta grubu ile ± 5 eşleniği olan, fertil, gönüllü erkeklerden seçildi.

Hasta grubunda infertilitenin sadece erkek faktöründen kaynaklanmasına (eşin sağlıklı, obstetrik muayenesinin normal ve 18-55 yaş arasında olmasına) dikkat edildi. Kromozom anomalisi, Y-kromozomu mikrodelesyonu ve kistik fibrozis vb. genetik faktörlerin bulunmadığı infertil erkekler çalışmaya dahil edildi (Tablo 3.1).

BMI değeri 30 kg/m^2 'nin altında olan ve yaşları 18-55 yaş arasında olmayan, erkekler çalışmaya dahil edilmedi. İnfertilitede kadın faktörünün de (örneğin eşin 18 yaşından küçük ve 35 yaşından büyük olması, eşinde düzenli menstrüel döngünün olmaması ve ovulasyon kanıtına sahip olunması, en az bir fallop tüpünün açık olması, kanser, kalp hastalığı veya siroz gibi hastalıkların varlığı, polikistik over sendromu öyküsü, tubal ligasyon gibi sterilizasyon işlemlerinin uygulanması, orta veya şiddetli endometriozis öyküsü) rol oynadığı vakalar çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca hem hasta hem de kontrol grubu için üreme fonksiyonunu veya metabolizmayı etkileyecek bir tedavi gören veya ilaç (enflamatuvar barsak hastalığı- Sulfasalazine, Azulfidine, Azulfidine EN, Azathioprine, Infliximab; Antihipertansifler- kalsiyum kanal blokerleri-nifedipin, diüretik-spirolakton; 5 alfa

redüktaz inhibitörleri-finasterid, dutasterid; Testosteron ve anabolik steroidler; Kemoterapi-son bir yıl içinde; SERM ve aromataz inhibitörleri; Gonodatropinler; Madde kullanma-marijuana, esrar ve eroin) kullanan; tedavi edilmeyen hipotiroidizm, kontrolsüz diyabetes mellitus görülen, vazektomi gibi sterilizasyon işlemleri uygulanmış olan erkekler çalışmaya katılmadı. Kontrol grubu için hasta grubundaki erkeklerle ± 5 yaş eşleniği olmayan, BMI değeri 30 kg/m^2 'nin altında olan ve en küçük çocuğu iki yaşından büyük olan erkekler dışlandı. Kanseri, kalp hastalığı veya siroz gibi mevcut ağır hastalıkların varlığı da çalışmaya dahil edilmeme kriterlerindendir.

Tablo 3.1. Hasta ve kontrollerin seçiminde kullanılan kriterler

Hasta ve Kontrollerin Seçiminde Dahil Edilme Kriterleri
- BMI değerinin 30 kg/m^2'nin üzerinde olması - Yaşın 18-55 arasında olması - Hasta grubu için infertilite tanısı almış olma ve infertilitenin sadece erkek faktörlü olması (eşinin sağlıklı, obstetrik muayenesinin normal ve 18-35 yaşları arasında olması) - Genetik faktörlerin (kromozom anomalisi, Y-kromozomu mikrodelesyonu ve CF vb.) bulunmaması - Kontrol grubu için normal yoldan ve iki yaşından küçük çocuk sahibi olması ve yaşlarının hasta grubu ile ± 5 eşleniği olması
Hasta ve Kontrollerin Seçiminde Dahil Edilmeme Kriterleri
- BMI 30 kg/m^2'nin altında olması - İnfertilitede kadın faktörünün de rol oynaması - Üreme fonksiyonunu veya metabolizmayı etkileyecek bir tedavi veya ilacın mevcut kullanımı - İnfertil erkekler için tedavi edilmeyen hipotiroidizm, kontrolsüz diyabetes mellitus olması - Vazektomi gibi sterilizasyon işlemlerinin uygulanmış olması - Hastaların 18 yaşından küçük ve 55 yaşından büyük olması - Kontrol grubundaki erkeklerin hasta grubundaki erkeklerle ± 5 yaş eşleniği olmaması - Kontrol grubundaki erkeklerin en küçük çocuğunun iki yaşından büyük olması - Hastalarda karyotip anomalisi, Y-kromozomu delesyonu veya CFTR mutasyonu tanımlanması - Kanser, kalp hastalığı veya siroz gibi mevcut ağır hastalıkların bulunması

3.2.1. Örneklerin Eldesi

Çalışma kapsamında kullanılacak tüm semen örnekleri 3-5 günlük cinsel perhizin ardından mastürbasyonla elde edilmiştir. Örneklerin 37°C 'de 20-30 dakika inkübe edilerek sıvılaştırılmasından sonra OMÜ Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Androloji laboratuvarlarında WHO 2021 kılavuzuna göre semen analizi yapıldı (WHO, 2021). Semen örnekleri, biri TUNEL analizi, antioksidan

kapasite ölçümü, anilin mavisi analizi; diğeri ise seminal plazmadan bakteriyel DNA izolasyonu için kullanılmak üzere iki alikota ayrıldı.

3.3. Metot

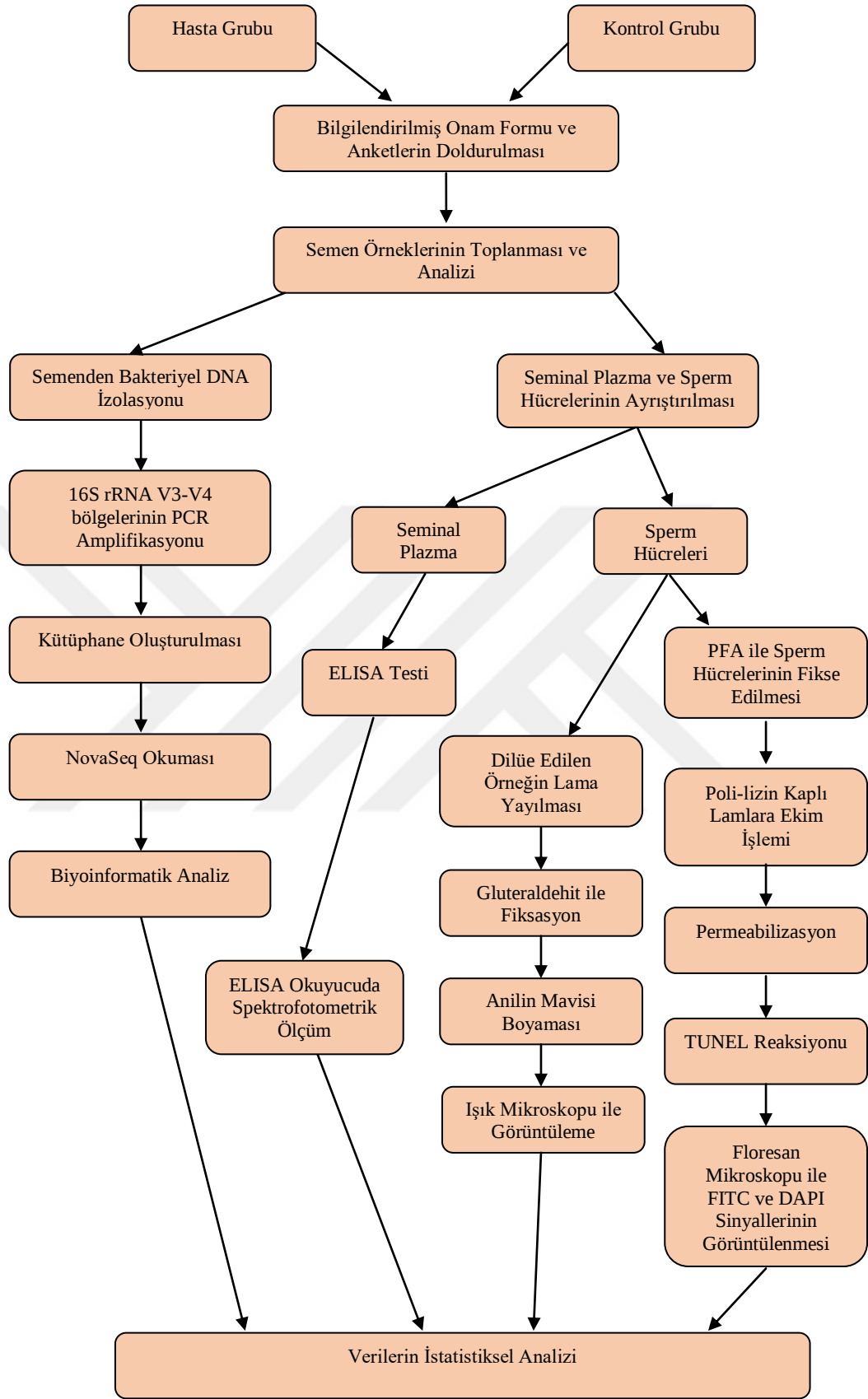
Tez çalışmasının akış şeması Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

3.3.1. Örneklerin Ön Hazırlığı

Semen örnekleri 1’er mililitrelik alikotlara ayrıldı. Tüplerden biri TUNEL analizinde kullanılmak üzere, diğeri anilin boyamasında kullanılmak üzere kodlandı. Tüm alikotlar 2000 rpm’de 7,5 dakika santrifüj edilerek sperm hücreleri çöktürüldü. Seminal plazmadan oluşan süpernatantlar 500 µl’lik alikotlara ayrıldı ve çalışmaların gerçekleştirileceği zamana kadar -80°C’de muhafaza edildi.

TUNEL analizi için kullanılacak olan semen pelleti, 1xfosfat tamponlu tuz çözeltisi (phosphate-buffered saline, PBS) ile bir defa yıkandı. Yıkama işlemi, 1 ml 1xPBS’in pellete eklenmesi, pipetajlama yapılması ve ardından 2000 rpm’de 7,5 dakika santrifüj edilmesi ile gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi takiben süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra pellet, önce 100 µl 1xPBS içerisinde resüspanse edildi, ardından 900 µl %3,6 paraformaldehit (PFA) çözeltisi eklendi ve +4°C’de saklandı. En az 2 gün PFA içerisinde bekletilen örneklerden 10 gün geçmeden PFA uzaklaştırıldı. PFA’nın uzaklaştırılması için +4°C’den çıkarılan tüpler 3500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatantın atılmasının ardından 1xPBS ile yıkama yapıldı. Yıkama için pellet 1 ml 1xPBS içerisinde resüspanse edildi, ardından 3500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak pellet 1 ml 1xPBS içerisinde homojenize edilerek -20°C’ye kaldırıldı.

Anilin mavisi ile boyama işleminde kullanılacak olan semen pelleti ise aynı işlem uygulanarak 1xPBS ile iki kez yıkandı. Son süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet, miktarına bağlı olarak 10-15 µl 1xPBS içerisinde homojenize edildi. Her bir örnek için iki ayrı lam hazırlandı ve numaralandırıldı. Örnekler bu lamlara damlatıldı ve lamel yardımıyla yayıldı. Lamlar, tamamen kuruduktan sonra %3’lük glutaraldehit çözeltisi damlatılarak lamların tamamen bu çözelti ile ıslanması sağlandı. Bu şekilde sperm hücreleri fikse edildi.



Şekil 3.1. Tezin akış şeması

3.3.2. Anilin Mavisi Boyaması

Sperm kromatin kondensasyonu anilin mavisi boyama yöntemi ile incelendi (Terquem ve Dadoune, 1982). +4°C’de kapalı kutular içerisinde bekletilen lamalar birkaç gün içerisinde boyama işlemi gerçekleştirildi. Bunun için lamalar, %5’lik anilin solüsyonunun bulunduğu şale içerisinde 15 dakika bekletildi. Ardından musluk suyuna tutulan lamlardan boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Kuruyan lamlarda bulunan sperm hücreleri, ışık mikroskopunda 100x büyütme ile incelendi (CX31, Olympus Life and Material Sciences, Almanya). Koyu mavi/lacivert boyanmış olan örnekler, anilin pozitif, soluk mavi görünen ya da boyanmamış örnekler, anilin negatif olarak değerlendirildi ve sayıları kaydedildi. Her bir lamda en az 200 sperm hücresi sayıldı (Hologlu, vd., 2022).

3.3.3. TUNEL Analizi

Sperm DNA fragmentasyonu, TUNEL analizi yöntemi ile *In Situ Cell Death Detection* kit kullanılarak ölçüldü (Roche Diagnostics, Almanya) (Kabartan, vd., 2019).

Örnek Materyalin Ekimi

Daha önce anlatılan ön hazırlık işlemlerinden sonra sperm ekimi için poli-lizin kaplı lamlara sperm ekimi gerçekleştirdi. Poli-lizin ile kaplama için, temiz lamalar distile su:poli L-lizin (1:9) karışımı içerisinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 60°C’lik etüvde bir saat inkübe edildi. Poli-lizin kaplı lamalar, hidrofobik uçlu bir kalemle iki bölgeye ayrıldı ve her bir bölgeye örneğin lama tutunmasını sağlayan birkaç damla fosfat tamponu süktroz (PB-süktroz) damlatıldı. 300 µl örnek alınarak lama ekildi (Şekil 3.2). Slaytlar +4°C’de nemli ortamda bir gece inkübe edildi (Hekim, vd., 2021).

Örnek Materyalin Permeabilizasyonu

Slaytlar 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra ışık mikroskopunda kontrol edildi. Permeabilizasyon işlemi için %0,1 sodyum sitrat ve %0,1 Triton X-100 içeren permeabilizasyon solüsyonu taze olarak hazırlandı. Solüsyon örnek üzerine damlatıldıktan sonra +4°C’de 10 dakika inkübe edildi. Permeabilizasyon sonrası bir kez yıkama yapılarak slayt kurumaya bırakıldı. Bu sırada TUNEL reaksiyon karışımı hazırlandı (Hekim, vd., 2021).



Şekil 3.2. TUNEL analizi ekim işlemi adımları

Etiketleme ve TUNEL Reaksiyonu

Etiketleme aşamasında kullanılacak TUNEL reaksiyon karışımı kullanımdan hemen önce hazırlandı. Reaksiyon karanlık ortamda gerçekleştirildi. Negatif kontroller için 100 µl etiket solüsyonu ayrıldı. Geri kalan 450 µl'lik etiket solüsyonu ile enzim solüsyonunun tamamı karıştırılarak TUNEL reaksiyon karışımı hazırlandı. Her çalışmada TdT enzimi konulmayan bir negatif kontrol ve rekombinant DNaz I kullanılan bir pozitif kontrole yer verildi. Etiketleme aşaması için önce slaytlar PBS ile 2 defa yıkandı. Seçilen alan üzerine 50 µl TUNEL reaksiyon karışımı eklendi. Slaytlar karanlık ve nemli ortamda, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda slaytlar, 3 kez 1xPBS ile yıkandı. Slayt üzerinde yer alan örneklerin üzerine 4',6-

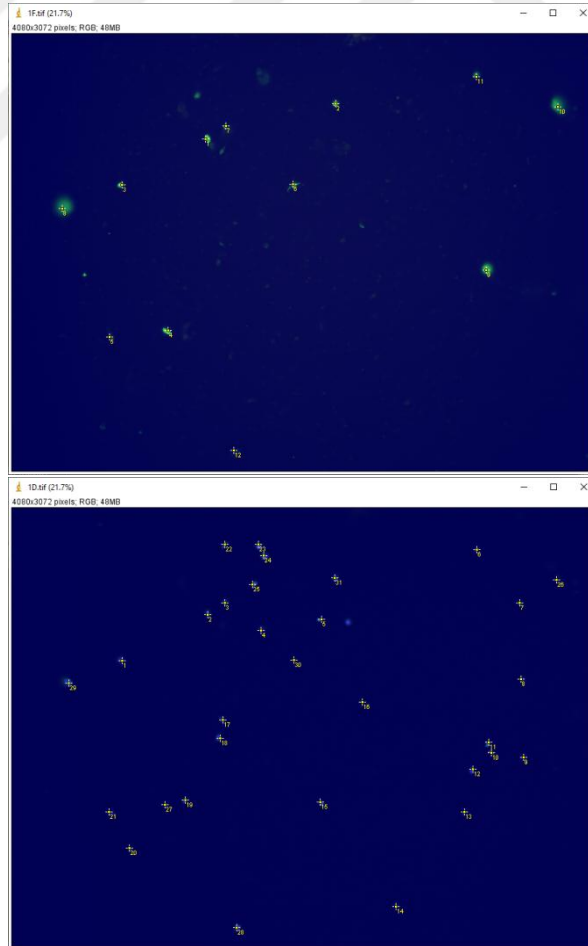
Diamidino-2 Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) çekirdek boyası içeren antifade solüsyonu damlatılarak lamelle kapatıldı.

Görüntüleme

Hazırlanan örnekler, floresan mikroskopta 40X büyütmede görüntülendi (BX51, Olympus Life and Material Sciences, Almanya). Slaytlarda aynı alanların uygun filtreler kullanılarak 461 nm ve 519 nm dalga boylarında, hem DAPI hem floresan izotiyosiyanat (FITC) sinyallerinin fotoğrafları çekildi. FITC sinyali veren spermilerin DNA fragmentasyonu pozitif olarak kabul edildi. Her örnek için en az beş ayrı alanın fotoğrafı çekilerek ortalama 500 hücre sayıldı.

Görüntülerin Analizi

Bilgisayar ortamında, Image J programı kullanılarak, her alanda yer alan DAPI ve FITC sinyalleri ayrı ayrı sayıldı (Şekil 3.3). DFI, $(FITC / DAPI) \times 100$ formülü ile hesaplandı (Hekim, vd., 2021).



Şekil 3.3. Image J programı ile gerçekleştirilen sayım işlemi

3.3.4. ELISA Testi

Total antioksidan kapasite ölçümü, enzime bağlı immünosorbent testi (enzyme-linked immuosorbent assay, ELISA) yöntemi ile, Antioxidant Assay kiti (Cayman Chemical, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi (Gupta, vd., 2019). Kit içeriğinde yer alan ürünler, yönergelerde belirtildiği gibi hazırlandı. Öncelikle konsantre deney tamponu sulandırılarak deney tampon çözeltisi hazırlandı, bu çözelti, örneklerin sulandırılmasında kullanıldı. Tüm seminal plazma örnekleri, 1:15 ve 1:20 oranlarında sulandırıldı. Trolox, kromojen ve metmyoglobin solüsyonları, ultra pure su kullanılarak hazırlandı. Tüm solüsyonlar ve örnekler, protokolde belirtildiği gibi mikropłaka kuyucuklarına eklendi. Reaksiyon, H_2O_2 kullanılarak başlatıldı. Kuyucuklarda meydana gelen enzimatik reaksiyon sonucu mavi/yeşil renkte ürün oluşumu gözlemlendi. $ABTS^+$ radikalinin neden olduğu bu rengin yoğunluğu, hem 405 nm hem de 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (ThermoFisher Scientific, Finlandiya). Her örnek için ortalama absorbans değerinin, standart eğrinin lineer regresyonundan elde edilen denklemde yerine konması ile örneğe ait antioksidan konsantrasyonu hesaplandı. Kontrol örnekleri ve H6 ve H8 numaralı hasta örnekleri triple, diğer tüm örnekler ise duplike olarak çalışıldı.

Test Öncesi Hazırlık ve Testin Gerçekleştirilmesi

-80°C’de saklanan örnekler, oda ısısına getirildikten sonra 9000 rpm’de 8 dk santrifüj edildi. Sonrasında, 1:15 sulandırma için 4 µl örnek ve 56 µl deney tampon çözeltisi; 1:20 sulandırma için ise 5 µl örnek ve 95 µl deney tampon çözeltisi kullanıldı.

1- Troleks standartları, A’dan G’ye harflendirilen 7 ayrı tüp içerisinde, kitin protokolü doğrultusunda aşağıda gösterilen konsantrasyonlarda hazırlandı (Tablo 3.2).

2- Plaka düzeneğinde belirtilen Trolex standart kuyularına 10’ar µl troleks standartı (A-G), 10’ar µl metmyoglobin, 10’ar µl kromojen kondu (Şekil 3.4).

3- Örnekler için ayrılan S1-S41 kuyularına sulandırılmış örneklerden 10’ar µl kondu ve 10 µl metmyoglobin ile 150 µl kromojen eklendi.

4- Reaksiyon 40 µl H_2O_2 çalışma solüsyonu ile başlatıldı. H_2O_2 , çok kanallı pipet yardımıyla tüm kuyulara mümkün olduğunca hızlı bir şekilde eklendi.

5- Çalkalamanın ardından örneklerin ve standartların absorbansı, mikropılaka okuyucuda 405 nm ve 750 nm dalga boyunlarında ölçüldü (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific, Finlandiya).

6- Her örnekten elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması, aşağıdaki formülde yerine konarak antioksidan konsantrasyonları belirlendi:

$$\text{Antioksidan (mM)} = \left[\frac{(\text{Örnek ortalama absorbansı}) - (y - \text{kesme noktası})}{\text{Eğim}} \right] \times \text{Dilüsyon}$$

Tablo 3.2. Trolox standartlarının içerik ve konsantrasyonları

Tüp	Dilüe Trolox (µl)	Deney Tamponu (µl)	Son Konsantrasyon (mM Trolox)
A	0	1000	0
B	30	970	0,068
C	60	940	0,135
D	90	910	0,203
E	120	880	0,270
F	150	850	0,338
G	220	780	0,495

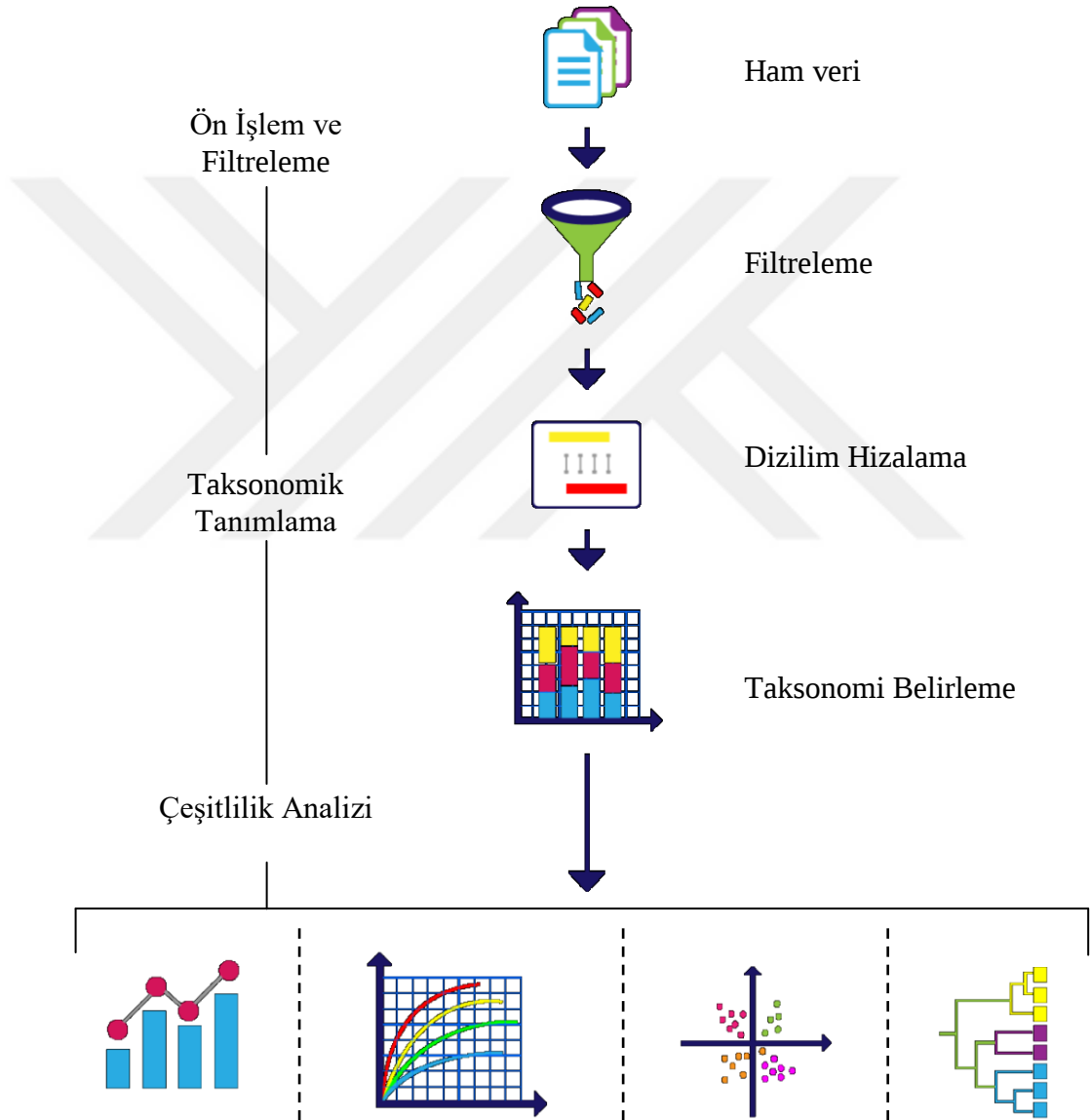
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34
B	B	B	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
C	C	C	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
D	D	D	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
E	E	E	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
F	F	F	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
G	G	G	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
H	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41

Şekil 3.4. ELISA testi için plaka düzeneği (A-G kuyularında standartlar, S1-S41 kuyularında örnekler yer almaktadır.)

3.3.5. Mikrobiyom Analizi

Mikrobiyom analizi, BM Labosis isimli firma tarafından hizmet alımı ile gerçekleştirildi. Semen örneklerinin mikrobiyom analizi için ayrılan kısmı -80°C’de muhafaza edildi. Tüm örnekler toplandığında soğuk zincir koşulları altında firmaya transfer edildi. Bakteriyel DNA izolasyonunun ardından 16S rRNA geninde

bulununan V3-V4 bölgelerinin spresifik primerler ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilerek kütüphane oluşturuldu (Klindworth, vd., 2013). Dizileme, Novaseq 6000 sistemi ve sentezle dizileme yöntemi ile gerçekleştirildi (Illumina, ABD). QIIME2 platformu üzerinden yürütülen biyoinformatik analizler sonucunda taksonomik sınıflandırmalar yapıldı. Alfa ve beta seyreltme analizleri ve filogenetik ağaç analizi sonuçları elde edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mikrobiyom analizi adımları (BM Labosis, Ankara, Türkiye)

3.3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi, MedCalc Statistical Software version 19.2.6 (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium) programı ile yapıldı. Normal dağılıma uyum gösteren veriler, gruplar arasında, bağımsız gruplar için T testi ile; normal dağılımla uyumlu olmayanlar ise Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi için Spearman korelasyon analizi gerçekleştirildi ve iki değişken arasındaki ilişkinin yönü ve gücü Spearman'ın sıralama korelasyon kat sayısı ile değerlendirildi. Tüm istatistikler için p değeri 0,05'in altı istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Tez çalışması için, 2022-2023 yılları arasında yaşları 18-55 arasında değişen, toplam 18 kişiden semen örneği alındı. BMI değeri 30 kg/m² üzerinde olan ve infertilite tanısı almış 13 erkek, hasta grubunu; BMI değeri 30 kg/m² üzerinde olup iki yaşından küçük çocuğu olan 5 erkek ise kontrol grubunu oluşturdu. Hasta ve kontrol gruplarının yaşları ($p=0,124$), kiloları ($p=0,054$), boyları ($p=0,842$) ve BMI değerleri ($p=0,094$) arasında farklılık görülmedi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının demografik bilgilerine ilişkin istatistiksel veriler *Mann Whitney U testi ($\alpha=0,05$)

Parametre	Hasta (n=13)	Kontrol (n=5)	p değeri
Yaş (yıl)			
Ortalama $\pm$ SD	34,46 $\pm$ 7,52	38,8 $\pm$ 4,27	0,1240
Ortanca	32	39	
Kilo (kg)			
Ortalama $\pm$ SD	103,46 $\pm$ 11,28	94,2 $\pm$ 1,64	0,0538
Ortanca	100	95	
Boy (m)			
Ortalama $\pm$ SD	1,76 $\pm$ 0,07	1,74 $\pm$ 0,06	0,8416
Ortanca	1,78	1,72	
BMI (kg/m²)			
Ortalama $\pm$ SD	33,28 $\pm$ 2,04	31,26 $\pm$ 1,97	0,0945
Ortanca	32,87	32,11	

4.1. Semen Parametreleri

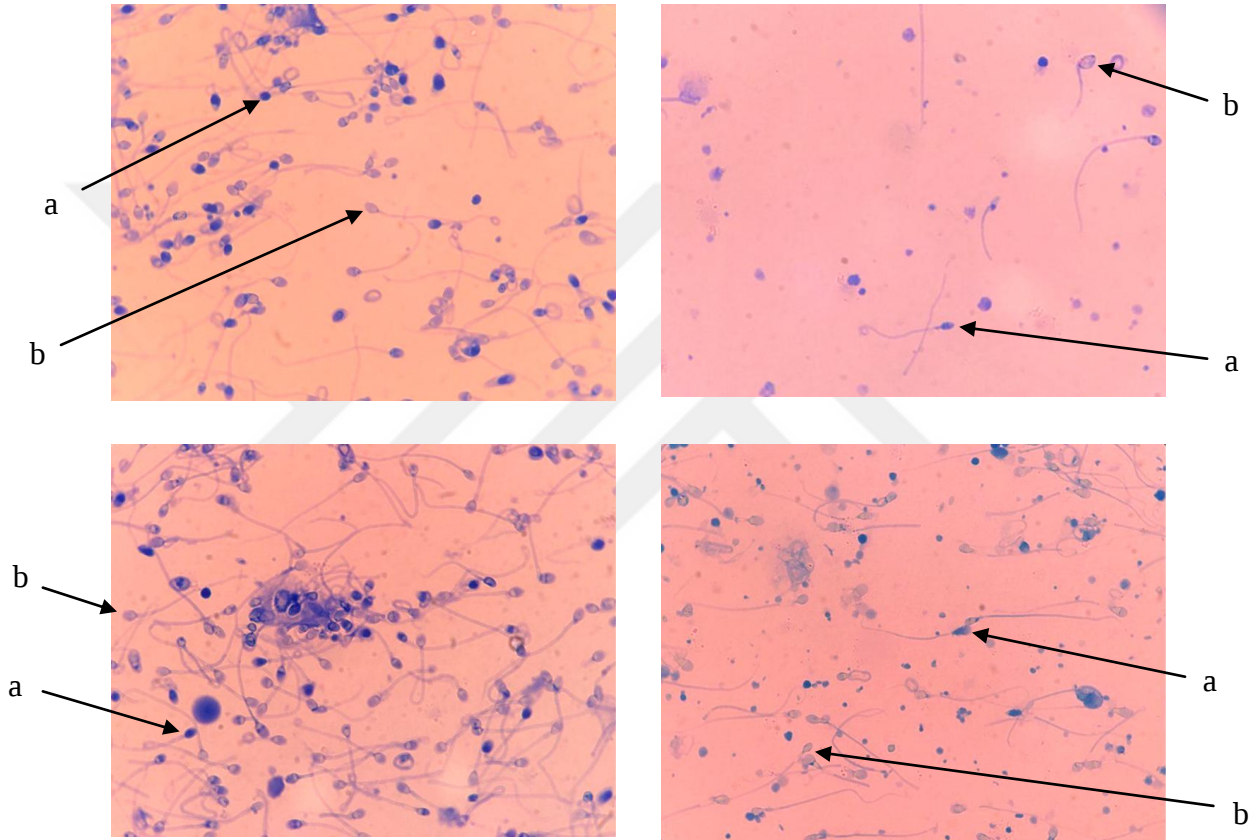
Volüm ($p=0,276$), ileri hareketli sperm yüzdesi ($p=0,057$), yerinde hareketli sperm yüzdesi ($p=1,000$) ve motilite ($p=0,057$) parametreleri hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. Buna karşın grupların sperm konsantrasyonu ($p=0,043$), total sperm sayısı ($p=0,032$), total progresif motil sperm sayısı ($p=0,028$), hareketsiz sperm yüzdesi ($p=0,012$) ve normal morfoloji ($p=0,019$) parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık saptandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol gruplarının semen parametrelerine ilişkin istatistiksel veriler *Mann-Whitney U testi ($\alpha=0,05$) (İstatistiksel olarak anlamlı ifadeler * ile gösterilmiştir.)

Parametre	Hasta (n=13)	Kontrol (n=5)	p değeri
Volüm (ml)			
Ortalama $\pm$ SD	2,72 $\pm$ 0,84	3,00 $\pm$ 0,71	0,2758
Ortanca	2,80	3,00	
Aralık	1,6-5	2-4	
Sperm Konsantrasyonu (milyon/ml)			
Ortalama $\pm$ SD	12,9 $\pm$ 16,74	30,60 $\pm$ 9,34	0,0427*
Ortanca	3,00	26,00	
Aralık	0-56	23-45	
Total Sperm Sayısı (milyon/ejakülat)			
Ortalama $\pm$ SD	36,54 $\pm$ 48,96	87,60 $\pm$ 14,29	0,0318*
Ortanca	15,00	90,00	
Aralık	0-168	69-105	
Total Progresif Motil Sperm Sayısı (milyon)			
Ortalama $\pm$ SD	17,35 $\pm$ 27,73	43,20 $\pm$ 8,25	0,0273*
Ortanca	1,50	43,00	
Aralık	0-97	31-53	
İleri Hareketli (Progresif) Sperm (A) %			
Ortalama $\pm$ SD	25,00 $\pm$ 21,85	49,60 $\pm$ 4,34	0,0568
Ortanca	20,00	51,00	
Aralık	0-58	45-54	
Yerinde Hareketli Sperm (B) %			
Ortalama $\pm$ SD	16,08 $\pm$ 2,3	5,00 $\pm$ 0	1,0000
Ortanca	5,00	5,00	
Aralık	0-5	5-5	
Hareketsiz Sperm (C) %			
Ortalama $\pm$ SD	53,00 $\pm$ 34,94	45,40 $\pm$ 4,34	0,0117*
Ortanca	57,00	44,00	
Aralık	0-99	41-50	
Motilite (A+B) %			
Ortalama $\pm$ SD	28,54 $\pm$ 23,7	54,60 $\pm$ 4,34	0,0568
Ortanca	25,00	56,00	
Aralık	0-63	50-59	
Normal Morfoloji %			
Ortalama $\pm$ SD	3,77 $\pm$ 3,85	9,60 $\pm$ 2,61	0,0192*
Ortanca	4,00	3,77	
Aralık	0-14	6-12	

4.2. Anilin Mavisi Boyaması

Çalışmaya katılan 18 olgunun 14'üne ait örneklerde anilin mavisi boyaması gerçekleştirildi ve anilin pozitif sperm yüzdesi hesaplandı (Şekil 4.1). Hasta grubunun anilin pozitif sperm yüzdesi $48,15 \pm 19,14$ ortalamaya sahipken, kontrol grubunun ortalaması $33,68 \pm 15,65$ olarak belirlendi. Gruplar arasında anilin pozitif sperm yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,1721$) (Tablo 4.3).



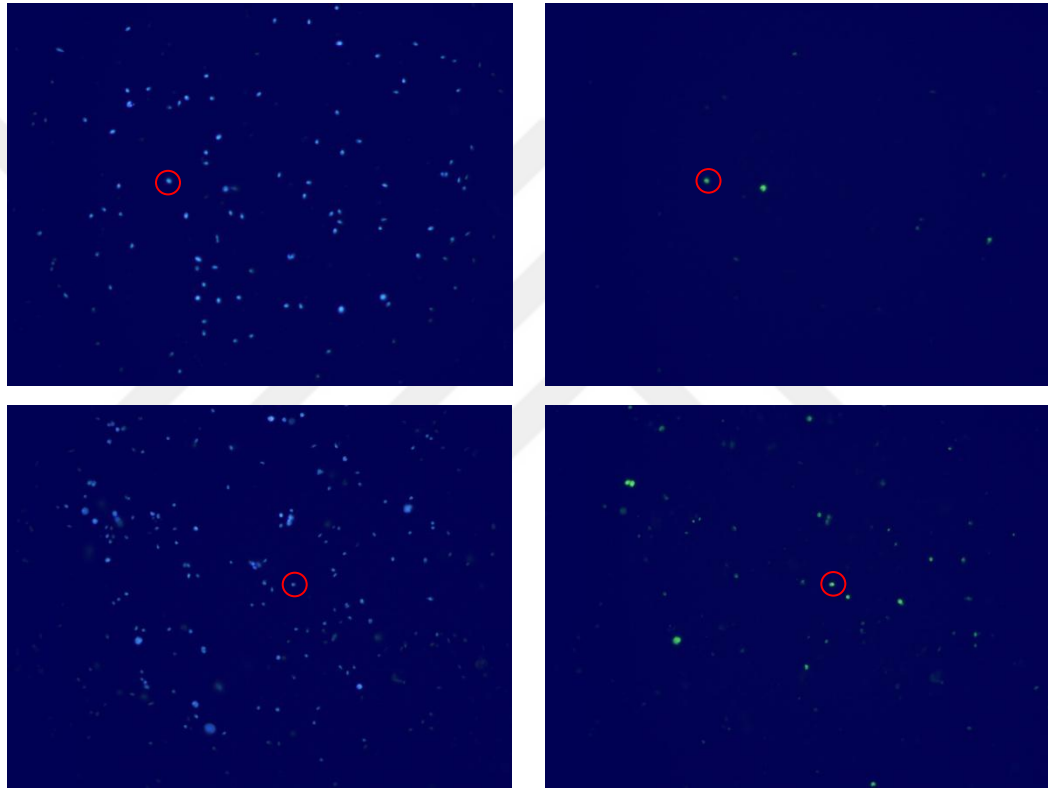
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol gruplarına ait bazı örneklerin anilin mavisi boyamasından sonra ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (a: anilin pozitif sperm, b: anilin negatif sperm)

Tablo 4.3. Gruplar arası anilin pozitif sperm yüzdelерinin karşılaştırması *T testi ($\alpha=0,05$)

Anilin Pozitif Sperm %	Hasta (n=9)	Kontrol (n=5)	p değeri
Ortalama	$48,15 \pm 19,14$	$33,68 \pm 15,65$	0,172
Ortanca	38,20	25,33	
En küçük değeri	24,35	20,68	
En büyük değeri	76,29	54,81	

4.3. Sperm DNA Fragmentasyonu

Çalışmaya katılan 18 kişiden 14'üne ait örnekler ile TUNEL testi gerçekleştirildi ve sperm DNA fragmentasyon indeksleri hesaplandı (Şekil 4.2). Hasta grubunun DFI değerlerinin %8,43 ile %18,56 arasında değiştiği ve $13,39 \pm 3,27$ ortalamaya sahip olduğu görüldü. Kontrol grubuna ait DFI değerleri ise %4,13 ile %16,24 arasında değişkenlik gösterdi ve ortalaması, $12,10 \pm 4,93$ bulundu. Gruplar arasında SDF bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,564$) (Tablo 4.4).



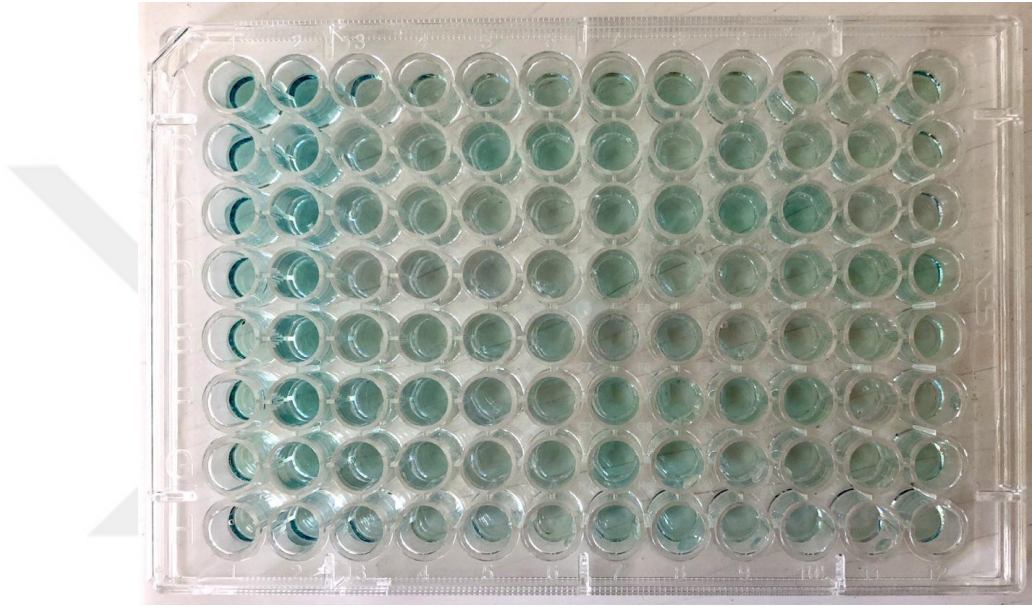
Şekil 4.2. DNA fragmentasyonu az ve fazla olan iki farklı örneğe ait DAPI (solda) ve FITC (sağda) sinyallerinin floresan mikroskoptaki görüntüsü

Tablo 4.4. Gruplar arası DFI karşılaştırması *T testi ($\alpha=0,05$)

DFI	Hasta (n=9)	Kontrol (n=5)	p değeri
Ortalama	$13,39 \pm 3,27$	$12,10 \pm 4,93$	0,564
Ortanca	12,62	6,80	
En küçük değer	8,43	4,13	
En büyük değer	18,56	16,24	

4.4. Total Antioksidan Kapasite

Çalışmaya katılan 18 kişiden 17'sine ait seminal plazmalar ile ELISA testi gerçekleştirildi ve total antioksidan kapasiteleri hesaplandı (Şekil 4.3). 750 nm dalga boyunda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde hasta grubunun TAC değerleri, $2,87 \pm 0,21$ ortalamaya sahipken kontrol grubunun ortalaması $2,69 \pm 0,20$ olarak belirlendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0,127$) (Tablo 4.5).



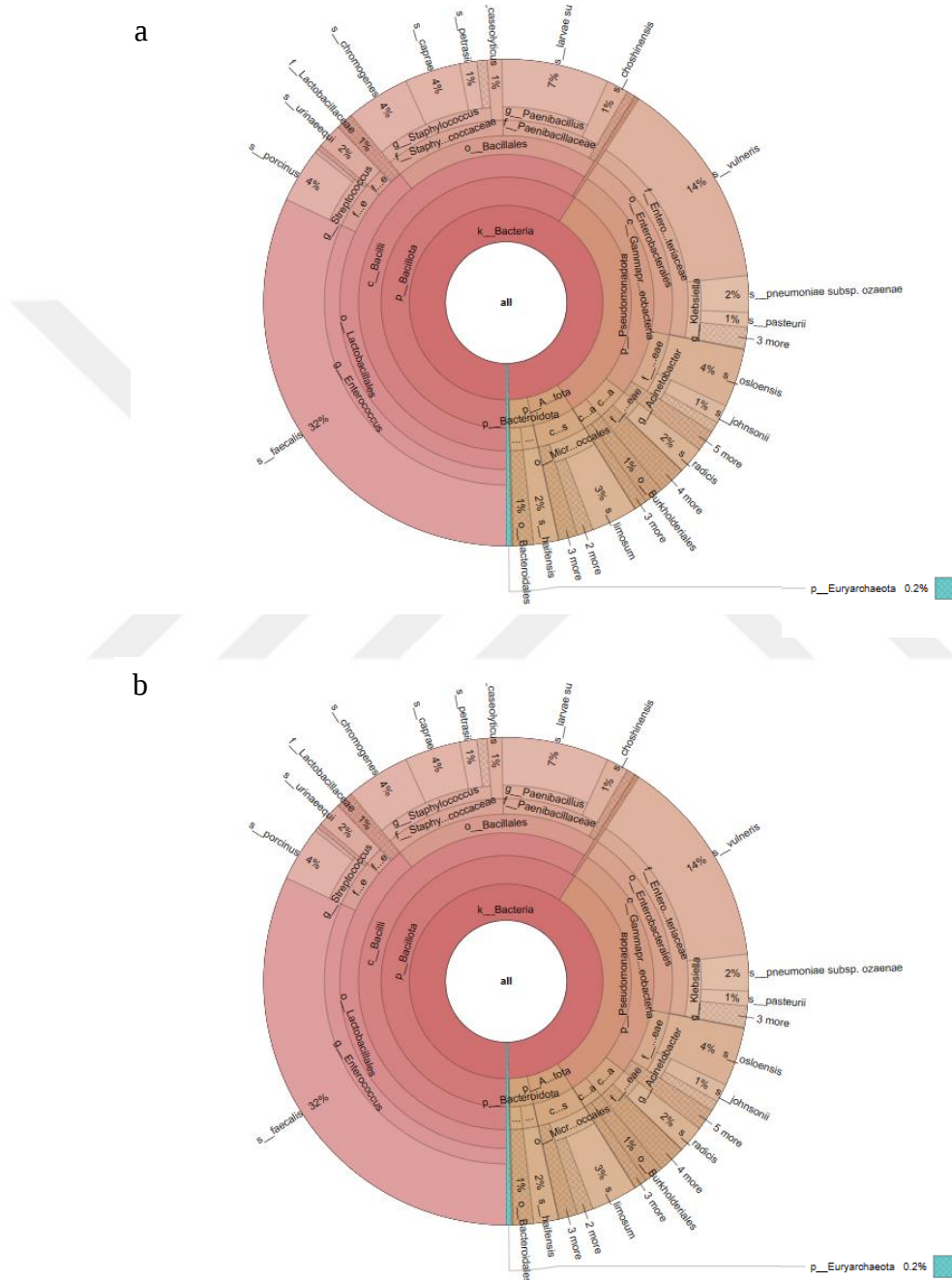
Şekil 4.3. ELISA reaksiyonu sonrası kuyucuklardaki renk değişimin görüldüğü mikroparka

Tablo 4.5. Gruplar arası total antioksidan kapasitesi karşılaştırması *T testi ($\alpha=0,05$)

TAC	Hasta (n=12)	Kontrol (n=5)	p değeri
Ortalama	$2,87 \pm 0,21$	$2,69 \pm 0,20$	0,127
Ortanca	2,87	2,72	
En küçük değer	2,54	2,47	
En büyük değer	3,13	2,95	

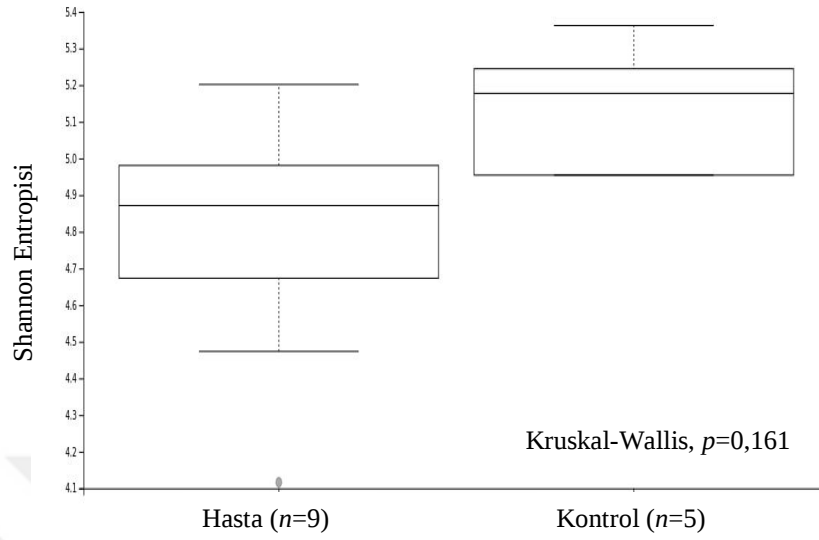
4.5. Mikrobiyom Analizi

Çalışmaya katılan 18 kişiden 16'sına ait örnekler, mikrobiyom analizi için kullanıldı. Semen örneklerinin bakteriyel içerikleri şube, sınıf, takım, aile ve cins düzeyinde incelendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Hasta (a) ve kontrol (b) gruplarından birer örneğin mikrobiyom analizi sonuçları doğrultusunda bakteriyel dağılımlarını gösteren grafikler

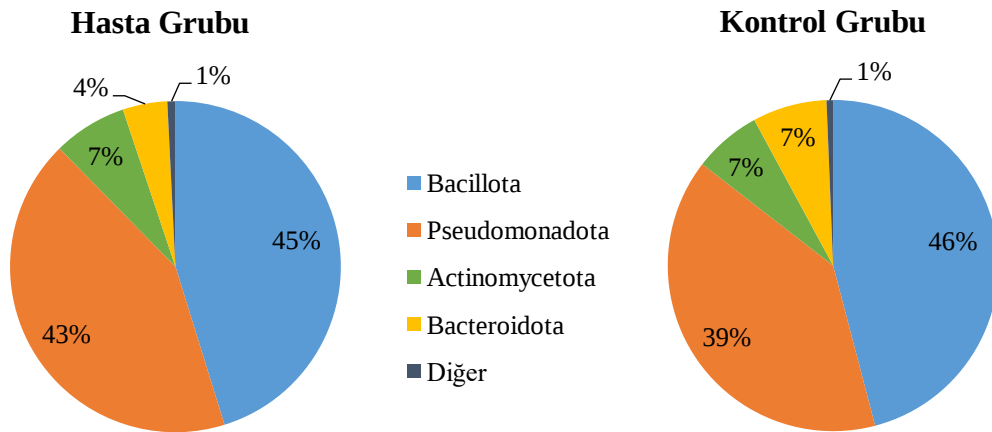
Gruplar arasında alfa çeşitlilik açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,161$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Shannon indeksi ile gruplar arası mikrobiyota çeşitliliğinin karşılaştırılması

4.5.1. Şube Seviyesi

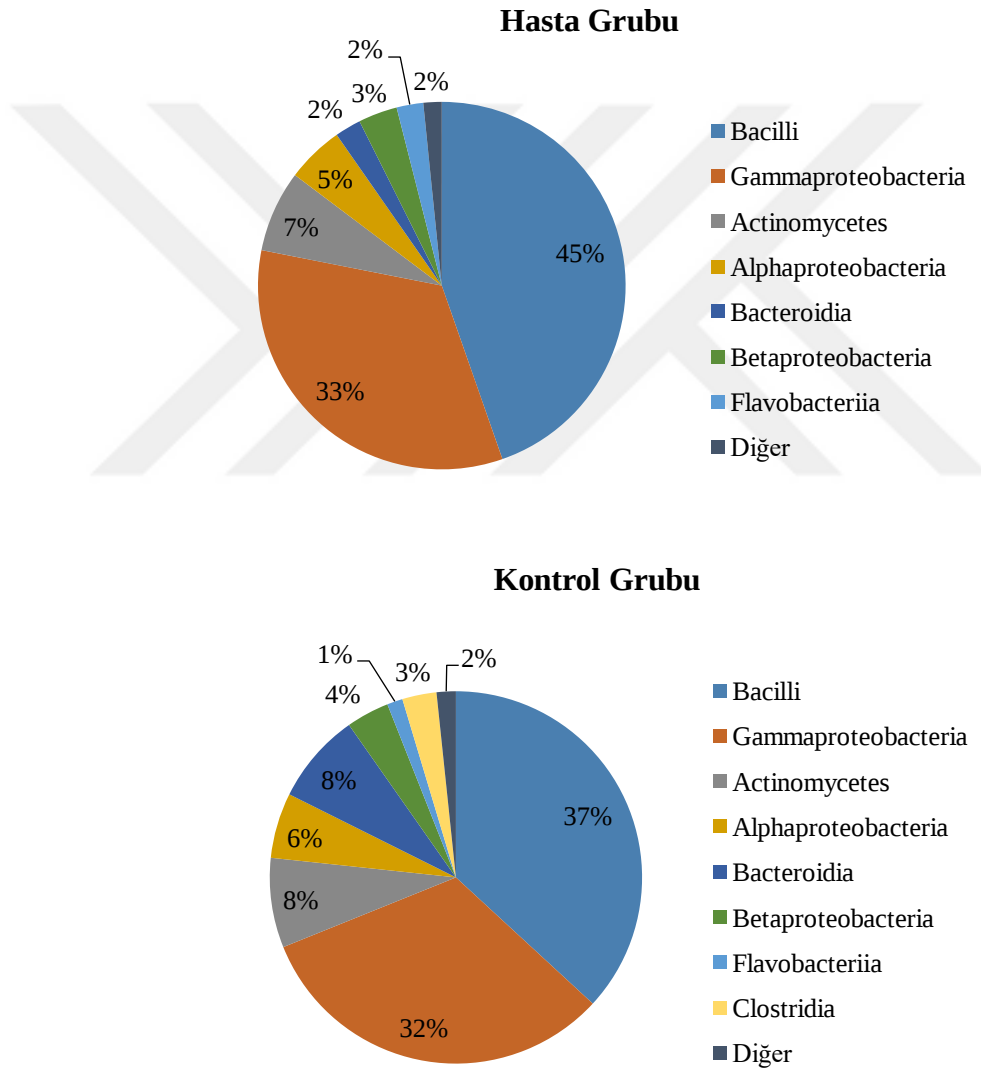
Her iki grupta da en bol bulunan dört şubenin ortak olduğu görüldü (Şekil 4.6). İlk iki sırada yer alan *Bacillota* ve *Pseudomonadota* dağılımları, gruplar arasında benzerlik gösterdi. Takip eden şubelerden, hasta grubunda *Actinomycetota*'nın, kontrol grubunda ise *Bacteroidota*'nın daha yüksek bir orana sahip olduğu gözlenmekle birlikte, gruplar arasında şube düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.



Şekil 4.6. Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin şube seviyesinde nisbi bolluk dağılımları

4.5.2. Sınıf Seviyesi

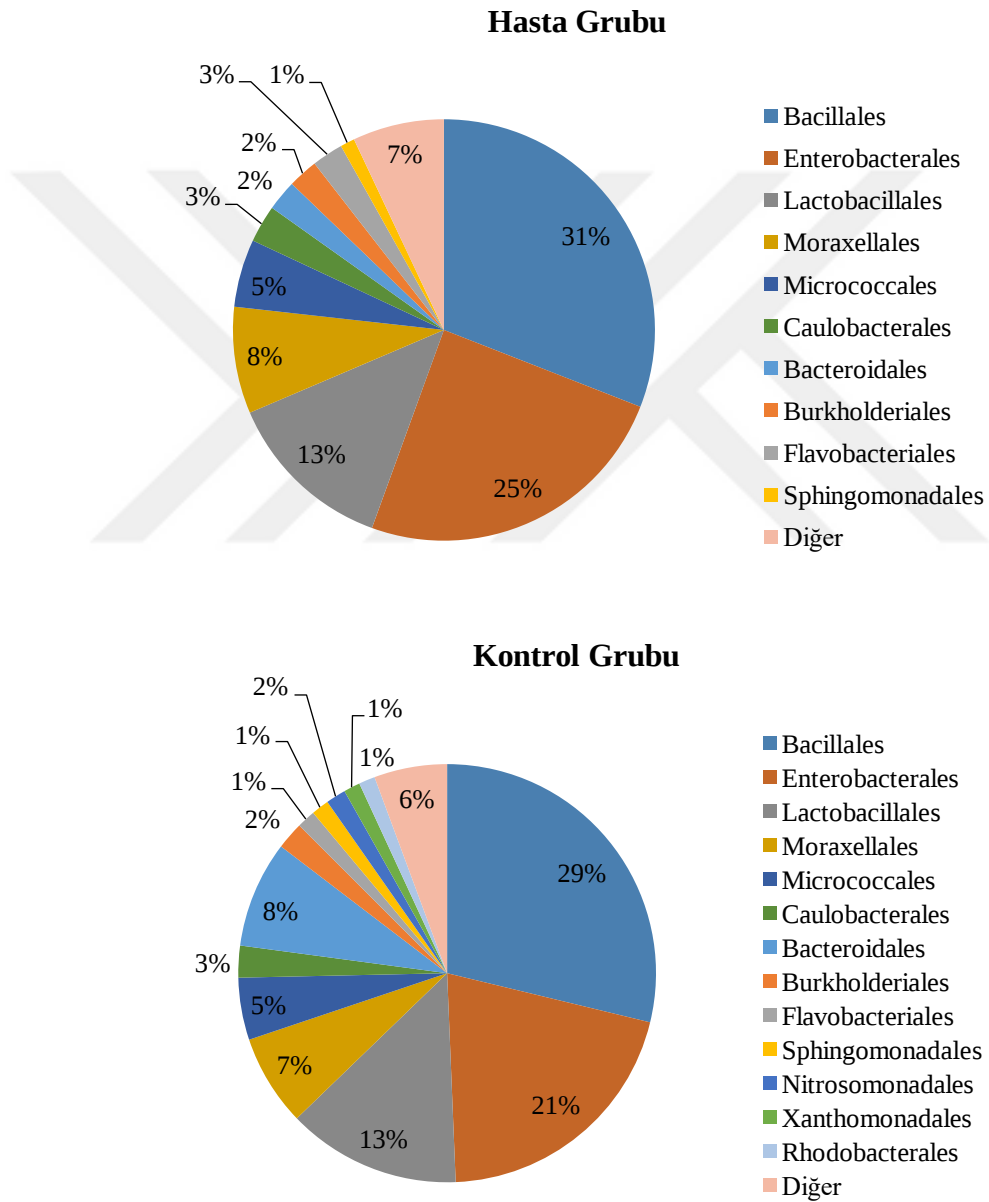
Semen örneklerinde bulunan 32 farklı bakteri sınıfı tespit edildi. Bu sınıflardan 8 tanesine yalnızca birkaç hastada rastlanırken, kontrol grubunda hiç rastlanmadı. Her iki grupta da en bol bulunan iki sınıf, *Bacilli* ve *Gammaproteobacteria* olarak belirlendi. Hasta grubunda bunları sırasıyla *Actinomycetes*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteriia* ve *Bacteroidia* takip ederken; kontrol grubunda sıralama, *Bacteroidia*, *Actinomycetes*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Clostridia* ve *Flavobacteriia* şeklinde devam etti (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin sınıf seviyesinde nisbi bolluk dağılımları

4.5.3. Takım Seviyesi

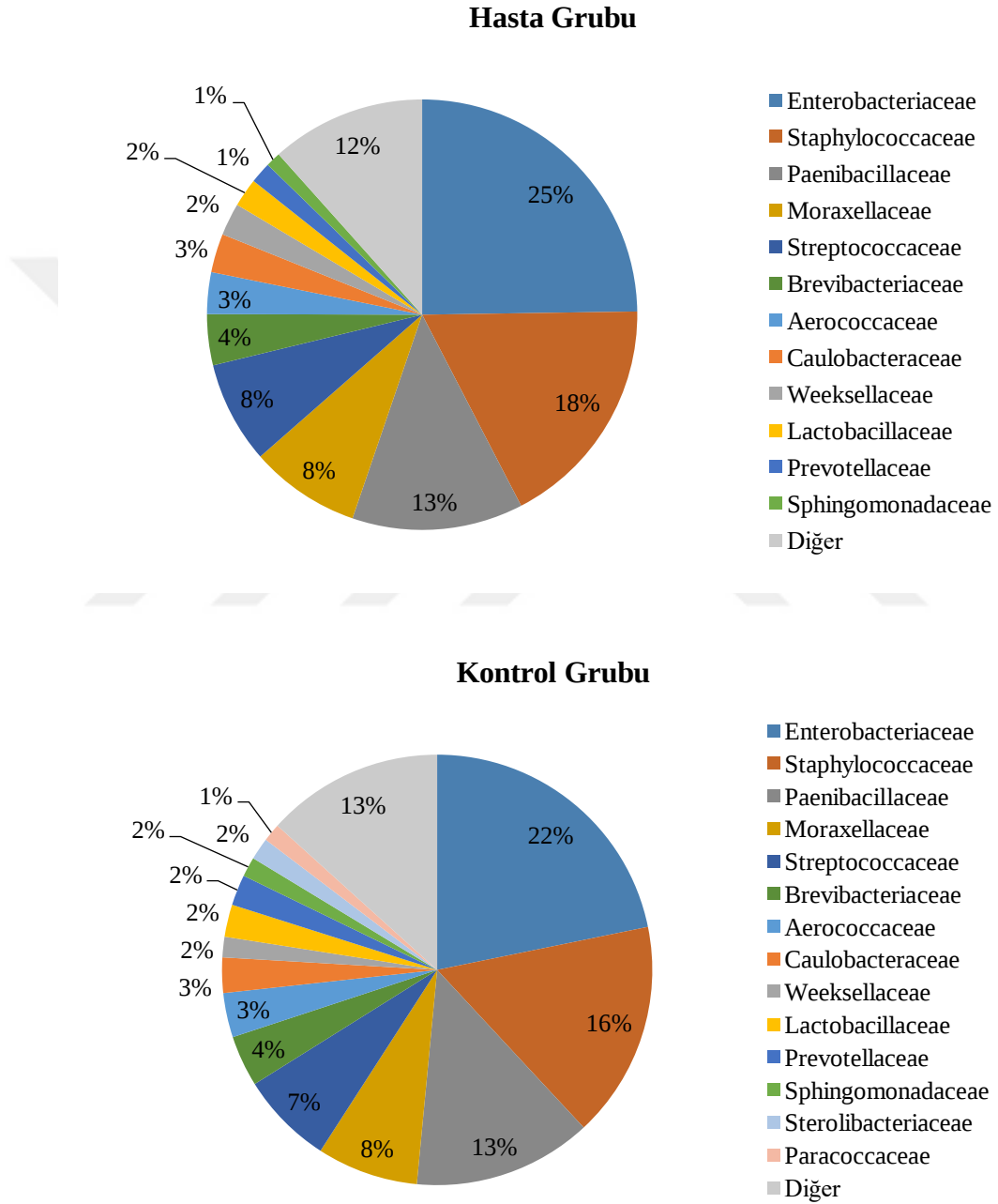
Takım seviyesinde en yaygın ilk üç bakterinin her iki grupta da *Bacillales*, *Enterobacterales* ve *Lactobacillales* olduğu görüldü (Şekil 4.8). Hasta grubunda bunları sırasıyla *Moraxellales*, *Micrococcales*, *Caulobacterales*, *Flavobacteriales*, *Bacteroidales*, ve *Burkholderiales*; kontrol grubunda ise *Bacteroidales*, *Moraxellales*, *Micrococcales*, *Eubacteriales* ve *Caulobacterales* takip etti.



Şekil 4.8. Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin takım seviyesinde nisbi bolluk dağılımları

4.5.4. Aile Seviyesi

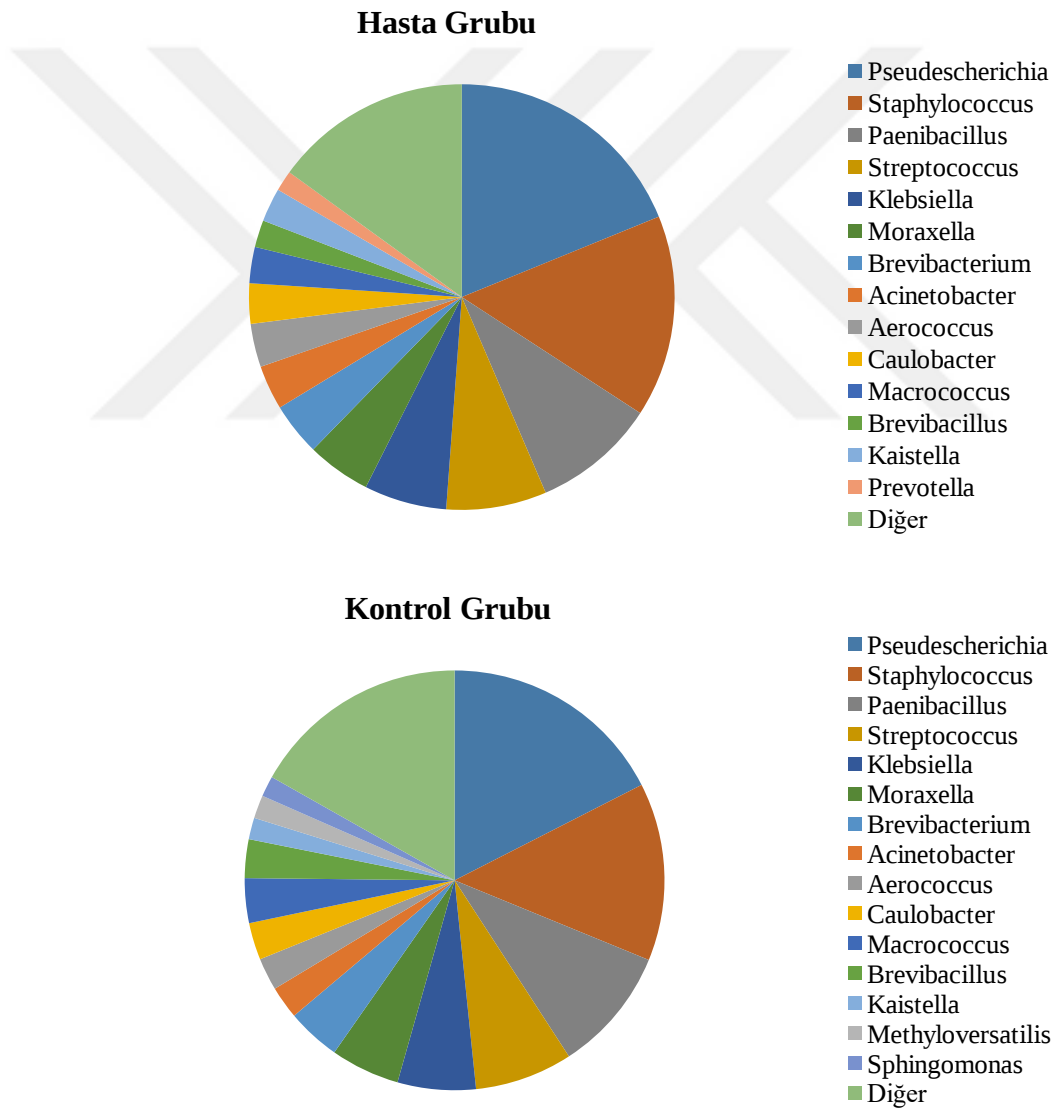
Semen örneklerinde 110 farklı aileye ait bakteri tespit edildi. Her iki grupta da en bol bulunan ilk 8 bakteri ailesi ortaktı. Bunlar sırasıyla, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Paenibacillaceae*, *Moraxellaceae*, *Streptococcaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Aerococcaceae*, *Caulobacteraceae* olarak belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin aile seviyesinde nisbi bolluk dağılımları

4.5.5. Cins Seviyesi

Semen örneklerinde 206 farklı bakteri cinsi tespit edildi. Her iki grupta da en bol bulunan bakteri cinsleri, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Streptococcus*, *Klebsiella* ve *Moraxella* olarak belirlendi. Hasta grubunda bu cinslerin dağılımı, *Pseudomonas* (%16,8), *Staphylococcus* (%13,7), *Paenibacillus* (%8,4), *Streptococcus* (%6,8), *Klebsiella* (%5,6) ve *Moraxella* (%4,3) şeklinde iken; kontrol grubunda, *Pseudomonas* (%12,3), *Staphylococcus* (%9,6), *Paenibacillus* (%6,8), *Streptococcus* (%5,3), *Klebsiella* (%4,2) ve *Moraxella* (%3,7) şeklindeydi (Şekil 4.10).



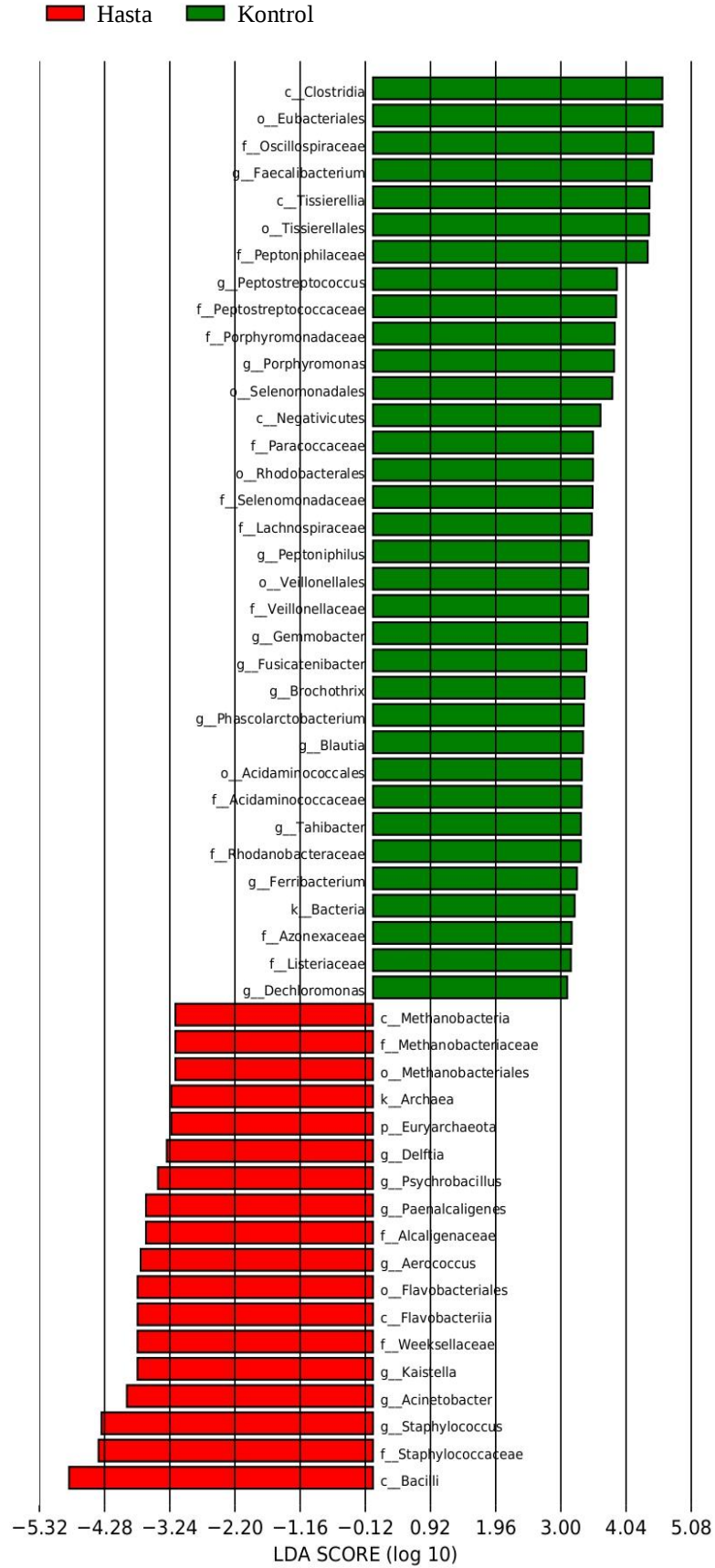
Şekil 4.10. Hasta ve kontrol gruplarının semenlerinde bulunan bakterilerin cins seviyesinde nisbi bolluk dağılımları

İncelenen cinsler arasında, *Acinetobacter* ($p=0,0009$), *Aerococcus* ($p=0,0380$), *Delftia* ($p=0,0091$), *Kaistella* ($p=0,0032$), *Psychrobacillus* ($p=0,0140$), *Staphylococcus* ($p=0,0275$) ve *Stenotrophomonas*'ın ($p=0,0109$) hasta grubunda; *Clostridium* ($p=0,0242$), *Gemmobacter* ($p=0,012$) ve *Tahibacter*'in ($p=0,0381$) ise kontrol grubunda anlamlı düzeyde daha bol bulunduğu görüldü. Bu cinslerden, *Delftia*'nın pozitif yönde ve *Gemmobacter*'in ise negatif yönde hareketsiz sperm yüzdesi ile güçlü korelasyon gösterdiği belirlendi (sırasıyla $p=0,0376$; $p=0,0081$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Gruplar arasında farklılık gösteren bakteri cinsleri *Mann Whitney U testi ($\alpha=0,05$) (İstatistiksel olarak anlamlı ifadeler $<0,05$ için *, $<0,01$ için **, $<0,001$ için *** ile gösterilmiştir.)

Bakteri Cinsi	Hasta			Kontrol			p değeri
	n	Ortanca	Ortalama Sıra	n	Ortanca	Ortalama Sıra	
<i>Acinetobacter</i>	11	3,014	10,909	5	1,767	3,200	0,0009***
<i>Aerococcus</i>	11	2,941	10,182	5	1,755	4,800	0,038*
<i>Clostridium</i>	7	0,140	4,286	4	0,320	9,000	0,024*
<i>Delftia</i>	9	0,537	8,000	3	0,341	2,000	0,009**
<i>Gemmobacter</i>	9	0,239	5,444	5	0,683	11,200	0,012*
<i>Kaistella</i>	11	2,288	10,727	5	1,167	3,600	0,003**
<i>Psychrobacillus</i>	10	0,648	8,400	3	0,327	2,333	0,014*
<i>Staphylococcus</i>	11	13,705	10,273	5	9,627	4,600	0,027*
<i>Stenotrophomonas</i>	8	0,981	9,125	5	0,541	3,600	0,011*
<i>Tahibacter</i>	6	0,069	3,833	4	0,292	8,000	0,038*

Farklı düzeylerdeki taksonlara ait bakterilerin hasta ve kontrol gruplarındaki bollukları LEfSe analizi ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılmalı olarak bol bulunan bakteriyel taksonların linear diskriminant analiz (LDA) skorlarını gösteren LEfSe analizi sonucu

4.6. Parametreler Arasındaki İlişkiler

Semen parametreleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde beklendiği gibi, motilite ile morfoloji, sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısı arasında pozitif yönlü kuvvetli bir korelasyon belirlendi (Her biri için $p<0,0001$). Benzer şekilde morfoloji ile sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısı da güçlü düzeyde ilişkiliydi ($p<0,0001$). Ayrıca, BMI değeri ile morfoloji arasında da negatif yönde anlamlı bir korelasyon gözlemlendi ($p=0,048$) (Tablo 4.7).



Tablo 4.7. Yaş, BMI ve semen parametreleri arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu *Spearman Korelasyon Analizi ($\alpha=0,05$) (İstatistiksel olarak anlamlı ifadeler <0,05 için *, <0,01 için ** ve <0,001 için *** ile gösterilmiştir.)

		Yaş	BMI (kg/m ²)	Motilite	Morfoloji	Sperm Konsantrasyonu	Total Sperm Sayısı	Volüm
Yaş	ρ katsayısı	1	0,187	0,032	0,079	0,089	0,091	0,155
	p değeri		0,457	0,911	0,780	0,751	0,747	0,538
BMI (kg/m ²)	ρ katsayısı	0,187	1	-0,362	-0,518	-0,437	-0,403	-0,025
	p değeri	0,457		0,185	0,048*	0,103	0,137	0,922
Motilite	ρ katsayısı	0,032	-0,362	1	0,897	0,942	0,889	0,162
	p değeri	0,911	0,185		<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***	0,563
Morfoloji	ρ katsayısı	0,079	-0,518	0,897	1	0,936	0,895	0,279
	p değeri	0,780	0,048*	<0,0001***		<0,0001***	<0,0001***	0,314
Sperm Konsantrasyonu	ρ katsayısı	0,089	-0,437	0,942	0,936	1	0,970	0,257
	p değeri	0,751	0,103	<0,0001***	<0,0001***		<0,0001***	0,356
Total Sperm Sayısı	ρ katsayısı	0,091	-0,403	0,889	0,279	0,970	1	0,400
	p değeri	0,747	0,137	<0,0001***	0,314	<0,0001***		0,139
Volüm	ρ katsayısı	0,155	-0,025	0,162	0,155	0,257	0,400	1
	p değeri	0,538	0,922	0,563	0,538	0,356	0,139	

Bakteri cinslerinin nisbi bollukları ile ölçülen parametreler karşılaştırıldığında ise, *Brevibacterium*, *Paenibacillus*, *Alistipes*, *Lactiplantibacillus*, *Rhizobacter*, *Sphingomonas* ve *Veillonella* cinslerinin sperm DNA fragmentasyonu; *Pantoea*, *Devosia*, *Bacteroides*, *Acidovorax* cinslerinin total antioksidan kapasite; *Fusobacterium* cinsinin anilin pozitif sperm yüzdesi ile korelasyon gösterdiği belirlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Bakteri cinsleri ile DFI, TAC ve anilin pozitif sperm yüzdesi arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu *Spearman Korelasyon Analizi ($\alpha=0,05$) (İstatistiksel olarak anlamlı ifadeler <0,05 için *, <0,01 için ** ve <0,001 için *** ile gösterilmiştir.)

Bakteri Cinsi		DFI	TAC	Anilin Pozitif Sperm %
<i>Brevibacterium</i>	ρ katsayısı	0,670	0,161	0,115
	p değeri	0,012*	0,567	0,707
	n	13	15	13
<i>Paenibacillus</i>	ρ katsayısı	0,593	0,257	-0,099
	p değeri	0,032*	0,355	0,748
	n	13	15	13
<i>Alistipes</i>	ρ katsayısı	-0,762	0,000	-0,071
	p değeri	0,028*	1,0000	0,866
	n	8	9	8
<i>Lactiplantibacillus</i>	ρ katsayısı	-0,629	-0,147	-0,238
	p değeri	0,028*	0,615	0,457
	n	12	14	12
<i>Rhizobacter</i>	ρ katsayısı	-1,000	-0,200	-0,200
	p değeri	<0,0001***	0,800	0,800
	n	4	4	4
<i>Sphingomonas</i>	ρ katsayısı	-0,587	-0,112	0,154
	p değeri	0,045*	0,703	0,633
	n	12	14	12
<i>Veillonella</i>	ρ katsayısı	-0,886	-0,200	0,143
	p değeri	0,019*	0,704	0,787
	n	6	6	6
<i>Pantoea</i>	ρ katsayısı	-0,500	-0,881	-0,214
	p değeri	0,253	<0,0001***	0,644
	n	7	8	7
<i>Devosia</i>	ρ katsayısı	1,000	1,000	1,000
	p değeri		<0,0001***	
	n	3	4	3

Tablo 4.8. (devamı)

Bakteri Cinsi		DFI	TAC	Anilin Pozitif Sperm %
<i>Bacteroides</i>	ρ katsayısı	0,167	0,661	0,617
	p değeri	0,668	0,038*	0,077
	n	9	10	9
<i>Acidovorax</i>	ρ katsayısı	-0,400	1,000	0,200
	p değeri	0,600	<0,0001***	0,800
	n	4	4	4
<i>Fusobacterium</i>	ρ katsayısı	-0,600	-0,536	-0,943
	p değeri	0,208	0,215	0,005**
	n	6	7	6

Ek olarak, *Corynebacterium*, *Hydrogenophaga*, *Paenalcaligenes* cinslerinin BMI ile; *Fructilactobacillus*'un ise yaşla birlikte değişim gösterdiği belirlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Bakteri cinsleri ile yaş ve BMI arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu
 *Spearman Korelasyon Analizi ($\alpha=0,05$) (İstatistiksel olarak anlamlı ifadeler $<0,05$ için *, $<0,01$ için ** ve $<0,001$ için *** ile gösterilmiştir.)

Bakteri Cinsi		BMI (kg/m ²)	Yaş
<i>Corynebacterium</i> (n=13)	ρ katsayısı	-0,604	-0,245
	p değeri	0,029*	0,420
<i>Hydrogenophaga</i> (n=4)	ρ katsayısı	-1,000	0,211
	p değeri	<0,0001*	0,789
<i>Paenalcaligenes</i> (n=8)	ρ katsayısı	-0,738	-0,371
	p değeri	0,037*	0,365
<i>Fructilactobacillus</i> (n=6)	ρ katsayısı	0,543	0,899
	p değeri	0,266	0,015*

Ayrıca, *Bacillus*, *Delftia*, *Gemmobacter*, *Komagataeibacter* ve *Massilia* cinsleri hareketsiz sperm yüzdesi ile, *Pseudomonas* ileri hareketli sperm yüzdesi ve total motilite ile ve *Brevundimonas* hem ileri hareketli, hem hareketsiz sperm yüzdesi hem de total motilite ile ilişkiliydi (Tablo 4.10). *Brevundimonas*, aynı zamanda total sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu ile de korelasyon gösterdi. *Lysinibacillus* ve *Pantoea* cinsleri, sperm sayısı ile, *Lactobacillus* cinsi, semen hacmi ile ilişkili bulundu.

Tablo 4.10. Bakteri cinsleri ile semen parametreleri arasındaki ilişkileri gösteren korelasyon tablosu *Spearman Korelasyon Analizi ($\alpha=0,05$) (İstatistiksel olarak anlamlı ifadeler <0,05 için *, <0,01 için **, <0,001 için *** ile gösterilmiştir.)

Bakteri Cinsi		Motilite	İleri Hareketli Sperm Yüzdesi (%A)	Hareketsiz Sperm Yüzdesi (%C)	Total Sperm Sayısı	Sperm Konsantrasyonu	Volüm
<i>Bacillus</i>	ρ katsayısı	-0,029	-0,029	-0,829	-0,486	-0,486	-0,236
	p değeri	0,957	0,957	0,042*	0,329	0,329	0,610
	n	6	6	6	6	6	7
<i>Delftia</i>	ρ katsayısı	-0,394	-0,394	0,661	-0,345	-0,321	-0,182
	p değeri	0,260	0,260	0,038*	0,328	0,365	0,571
	n	10	10	10	10	10	12
<i>Gemmobacter</i>	ρ katsayısı	0,434	0,434	-0,722	0,203	0,287	-0,341
	p değeri	0,158	0,158	0,008**	0,527	0,366	0,233
	n	12	12	12	12	12	14
<i>Komagataeibacter</i>	ρ katsayısı	0,541	0,541	-0,793	0,036	0,143	-0,300
	p değeri	0,210	0,210	0,033*	0,939	0,760	0,470
	n	7	7	7	7	7	8
<i>Massilia</i>	ρ katsayısı	0,314	0,314	-0,624	0,196	0,196	0,056
	p değeri	0,346	0,346	0,040*	0,564	0,564	0,862
	n	11	11	11	11	11	12

Tablo 4.10. (devamı)

Bakteri Cinsi		Motilite	İleri Hareketli Sperm Yüzdesi (%A)	Hareketsiz Sperm Yüzdesi (%C)	Total Sperm Sayısı	Sperm Konsantrasyonu	Volüm
<i>Pseudomonas</i>	ρ katsayısı	0,714	0,714	-0,429	0,476	0,476	-0,139
	p değeri	0,046*	0,046*	0,289	0,233	0,233	0,722
	n	8	8	8	8	8	9
<i>Brevundimonas</i>	ρ katsayısı	1,000	1,000	-1,000	1,000	1,000	0,400
	p değeri	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***	0,600
	n	4	4	4	4	4	4
<i>Lysinibacillus</i>	ρ katsayısı	0,657	0,657	-0,143	0,886	0,600	-0,020
	p değeri	0,156	0,156	0,787	0,019*	0,208	0,967
	n	6	6	6	6	6	7
<i>Pantoea</i>	ρ katsayısı	0,667	0,667	-0,333	0,762	0,571	0,315
	p değeri	0,071	0,071	0,420	0,028*	0,139	0,409
	n	8	8	8	8	8	9
<i>Lactobacillus</i>	ρ katsayısı	0,086	0,086	-0,257	-0,086	-0,086	-0,808
	p değeri	0,872	0,872	0,623	0,872	0,872	0,028*
	n	6	6	6	6	6	7

5. TARTIŞMA

Obez fertil ve obez infertil bireylerin dahil edildiği bu çalışmada, fertil ve infertil gruplar arasında seminal mikrobiyom içerikleri karşılaştırılmış, semende bulunan bakteri toplulukları ile çeşitli semen parametreleri arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Literatür incelendiğinde, seminal mikrobiyomun erkek infertilitesindeki rolüne ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunduğu ve elde edilen sonuçların daha fazla kanıtı ihtiyaç duyduğu görülmektedir. Hem infertilite, hem de mikrobiyota, çok çeşitli faktörlerden etkilenmeleri sebebiyle, çok yönlü bir yaklaşımla araştırılması gereken konulardır. Bu çalışmada, obezite faktörü üzerinde durulmuş, obezitenin seminal mikrobiyotayı etkileyerek erkek infertilitesine yol açabileceği hipotezi değerlendirilmiştir.

Çalışmamız sonucunda semende en bol bulunan bakteri şubelerinin *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* ve *Bacteroidota* olduğu belirlenmiştir. Seminal mikrobiyotanın incelendiği çalışmalarda oldukça değişken sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bunun başlıca nedenleri arasında mikrobiyotanın coğrafi konum, yaşam tarzı alışkanlıkları, beslenme stili, hijyen uygulamaları gibi pek çok faktörden etkilenmesi yer alabilir. Seminal mikrobiyomu etkileyen bir diğer değişken ise sünnet durumudur (Altmäe, vd., 2019). Bu çalışmada yer alan örneklem Karadeniz Bölgesinde yaşayan erkeklerden oluşmaktadır. Elde edilen sonuçlar, bu coğrafyanın koşulları göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir.

Mikrobiyota çalışmalarında en önemli sorunlardan biri kontaminasyon riskidir. Semen örneklerinin toplanması, hasta mahremiyetinin korunması için hastanın kendisi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu yüzden, elde edilen örneklerin bireylerin hassasiyetleri ve hijyen uygulamalarından etkilendiği gerçeği göz ardı edilmemelidir. Ayrıca, laboratuvar ortamı ve araştırmacının kendisi de kontaminasyon kaynağı olabilmektedir. Dolayısıyla, semen örneklerinde tespit edilen bakteri topluluklarının seminal mikrobiyoma ait olduğundan yüzde yüz emin olmak mümkün değildir.

Bir diğer problem ise mikrobiyota analizlerin oldukça yüksek maliyetli olmasıdır. Bu durum, çalışmanın en temel sınırlılıklarından olan örneklemin küçüklüğü ile sonuçlanmıştır. Obez fertil ve obez infertil bireylerin seminal

mikrobiyomlarını obez olmayan fertil ve infertil bireylerle karşılaştırmak, çalışmanın kapsamını genişleterek daha anlamlı sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

Çalışmada, sperm DNA fragmentasyonu, histonca zengin sperm yüzdesi ve total antioksidan kapasite açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bunun olası bir nedeni, her iki grubun da yalnızca obez bireyleri içermesi olabilir. Daha önceki çalışmalarda yüksek BMI değerlerinin, sperm DNA fragmentasyonu ile ilişki olduğu bildirilmiştir (Panner Selvam, Sengupta ve ark., 2020). Obezite, testiste oksidatif stresi artırarak sperm DNA bütünlüğünün bozulmasına yol açabilmektedir. Obezite, aynı zamanda sperm kromatin kondensasyonunu da olumsuz etkilemektedir (Leisegang, vd., 2021).

Erkek infertilitesinin heterojen bir bozukluk olması nedeniyle küçük ve homojen bir grup seçilmiştir. Nitekim, mikrobiyom analizi sonucunda, obez fertil ve obez infertil erkekler arasında bazı bakteri cinslerinin anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bunlardan *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Delftia*, *Kaistella*, *Psychrobacillus*, *Staphylococcus* ve *Stenotrophomonas* cinslerinin hasta grubunda; *Clostridium*, *Gemmobacter* ve *Tahibacter*'in ise kontrol grubunda daha bol bulunduğu görülmüştür. Farklılık gösteren bakteri cinslerinin semen parametreleri ile ilişkileri incelendiğinde, hareketsiz sperm yüzdesi ile infertil bireylerde daha fazla bulunan *Delftia*'nın pozitif yönde ve fertil bireylerde daha fazla bulunan *Gemmobacter*'in ise negatif yönde güçlü korelasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Sperm DNA fragmentasyonunun, *Brevibacterium*, *Paenibacillus* cinslerinin bolluğu ile pozitif yönde, *Alistipes*, *Lactiplantibacillus*, *Rhizobacter*, *Sphingomonas* ve *Veillonella* cinslerinin bolluğu ile ise negatif yönde ilişkili olduğu görülmüştür. Yakın zamanda yapılan benzer bir çalışmada, *Paenibacillus* cinsinin protaminasyonda azalma ve çift zincir kırığı türündeki DNA fragmentasyonunda artışla ilişkili olduğu bulunmuştur (Garcia-Segura, vd., 2022). Bahsedilen çalışmada, sonuçlarımızdan farklı olarak *Moraxella*, *Brevundimonas* ve *Flavobacterium* cinslerinin sperm DNA fragmentasyonu ile negatif korelasyon gösterdiği ifade edilmiştir.

Total antioksidan kapasite ile ilişkili olabilecek cinsler, *Pantoea*, *Devosia*, *Bacteroides* ve *Acidovorax* olarak belirlenmiş; bunlardan *Pantoea* negatif, diğerleri ise pozitif yönde bir ilişki göstermiştir. *Fusobacterium* cinsinin bolluğundaki artış ise anilin pozitif sperm yüzdesi ile negatif yönde ilişkili bulunmuştur. *Fusobacterium*,

ağız boşluğunda yaygın bulunan ve bu bölgenin yerel üyesi kabul edilen bir bakteri cinsidir. Fusobakteriler arasında sinüs ve karaciğer apseleri, deri ülserleri, gastrointestinal sistem karsinomu ve enflamatuvar barsak hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünülen türler bulunmakla birlikte, iyi huylu kommensal türler de yer almaktadır (Wilde ve Allen-Vercoe, 2023). Semende bulunan Fusobakterilerin kaynağının oral mikrobiyota olduğu öne sürülebilir. İnsan papilloma virüsünün (HPV) seminal mikrobiyota kompozisyonu ve çeşitliliğindeki etkisini araştıran bir çalışmada HPV-negatif semen örneklerinde, HPV-pozitif örneklerle kıyasla daha yüksek düzeyde *Fusobacterium* bulunduğu tespit edilmiştir (Tuominen, vd., 2021). Bu çalışmada, HPV enfeksiyonunun, semen kalitesini ve fertilite potansiyelini azaltabileceği belirtilmiştir. Çalışmamız sonucunda anilin pozitif sperm yüzdesindeki azalma ile ilişkili bulduğumuz bu cinsin semen kalitesindeki olumlu etkilerinin hangi mekanizmalarla gerçekleştiği araştırılmalıdır.

Bakteri cinslerinin semen parametreleri üzerindeki olası etkileri incelendiğinde *Bacillus*, *Delftia*, *Gemmobacter*, *Komagataeibacter* ve *Massilia* cinslerinin hareketsiz sperm yüzdesi; *Pseudomonas*'ın ileri hareketli sperm yüzdesi ve total motilite ile ve *Brevundimonas*'ın hem ileri hareketli, hem hareketsiz sperm yüzdesi, hem de total motilite ile ilişkili olduğu görülmüştür. *Brevundimonas* bolluğu, aynı zamanda total sperm sayısı ve sperm konsantrasyonudaki artış ile de bağlantılı görünmektedir. *Lysinibacillus* ve *Pantoea* cinsleri, sperm sayısı ile pozitif yönde ilişki göstermiştir. İlginç bir sonuç olarak, daha önceki çalışmalarda semen kalitesindeki artış ile ilişkilendirilen *Lactobacillus*, semen hacmindeki azalma ile ilişkili bulunmuştur. Bunlara ek olarak, *Corynebacterium*, *Hydrogenophaga*, *Paenalcaligenes* cinslerinin bolluğu, BMI ile negatif yönde ilişki gösterirken; *Fructilactobacillus* bolluğunun ise yaşla birlikte artış gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, mikrobiyom analizi için yeni nesil dizileme tekniklerinden 16S amplikon dizileme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, pek çok avantaja sahip olmakla birlikte tür seviyesinde yeterince güvenilir sonuçlar vermemektedir. Shotgun metagenom dizileme yöntemi ile daha ileri düzeyde incelemeler yapmak mümkün olabilir (Ranjan, vd., 2016).

Çalışmanın diğer sınırlılıkları olarak, mikroskop kullanımının getirdiği yanlışlıklardan bahsedilebilir. Anilin pozitif sperm yüzdesinin hesaplanması için ışık mikroskobu altında eş zamanlı sayım yapılmıştır. Bu noktada sonuçların

doğruluğunu arttırmak için her semen örneğinden iki ayrı lam hazırlanarak sayım gerçekleştirilmiştir. Otomatik hücre sayım araçlarının kullanılması ile daha güvenilir sonuçlara ulaşılması muhtemeldir. TUNEL analizinde ise görüntüleme, floresan mikroskop ile gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrisi, çok daha kısa sürede doğruluğu daha yüksek sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

6. SONUÇ

Çalışma sonucunda, obez fertil ve obez infertil erkeklerin seminal mikrobiyotaları arasında şube düzeyinde önemli bir farklılık gözlenememiş olmakla birlikte bazı bakteri cinslerinin anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu cinslerden *Delftia* ve *Gemmobacter*'in hareketsiz sperm yüzdesindeki değişim ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda çeşitli bakteri cinslerinin DFI, TAC ve anilin pozitif sperm yüzdesi ile ilişkili olduğu da görülmüştür.

Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, semende bulunan bakteri cinslerinin başta motilite olmak üzere, semen kalitesini belirleyen parametreler, sperm DNA fragmentasyonu veya total antioksidan kapasite üzerinde etkili olarak erkek infertilitesinde rol oynadığı öne sürülebilir. Çalışma örnekleminin oldukça küçük oluşu göz önünde bulundurulduğunda, daha büyük bir örneklem ile çalışılması ve özellikle obez olmayan fertil ve infertil grupların çalışmaya dahil edilmesi ile daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi beklenebilir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, A., A. Farkouh, A., Parekh, N., Zini, A., Arafa, M., Kandil, H., Tadros, N., Busetto, G.M., Ambar, R., Parekattil, S., Boitrelle, F., Sallam, H., Jindal, S., Ko, E., Simopoulou, M., Park, H. J., Sadighi, M. A., Saleh, R., Ramsay, J., Martinez, M., Elbardisi, H., Alvarez, J., Colpi, G., Gosalvez, J., Evenson, D., and Shah, R. (2022). "Sperm DNA fragmentation: a critical assessment of clinical practice guidelines." *World J Mens Health*. 40(1). 30-37.
- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Panner Selvam, M.K., Cho, C.L., Henkel, R., Finelli, R., Leisegang, K., Sengupta, P., and Barbarosie, C., Parekh, N., Alves, M.G., Ko, E., Arafa, M., Tadros, N., Ramasamy, R., Kavoussi, P., Ambar, R., Kuchakulla, M., Robert, K. A., Iovine, C., Durairajanayagam, D., Jindal, S., and Shah, R. (2020). "Sperm DNA fragmentation: a new guideline for clinicians." *The World Journal of Men's Health*. 38(4). 412.
- Agarwal, A., Qiu, E. And Sharma, R. (2018). "Laboratory assessment of oxidative stress in semen." *Arab Journal of Urology*.16(1). 77-86.
- Agarwal, A., vd. (eds) (2016). "Antioxidant measurement in seminal plasma by TAC assay." *Andrological evaluation of male infertility: a laboratory guide*, Cham: Springer.
- Alahmar, A. T., Ali, Z. Muhsin, Z., and Qasim, H. (2018). "The impact of obesity on seminal fluid in men with infertility." *Middle East Fertility Society Journal*. 23(4). 346-349.
- Altmäe, S., Fransiak, J. M., & Mändar, R. (2019). The seminal microbiome in health and disease. *Nature Reviews Urology*. 16(12). 703-721.
- Alwaal, A., Breyer, B. N., and Lue, T. F. (2015). "Normal male sexual function: emphasis on orgasm and ejaculation." *Fertility and sterility*. 104(5). 1051-1060.
- Anukam, K. C., Osazuwa, E., Osemene, G. I., Ehigiagbe, F., Bruce, A. W., and Reid, G. (2006). "Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis." *Microbes and Infection*. 8(12-13). 2772-2776.
- Barati, E., Nikzad, H., and Karimian, M. (2020). "Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management." *Cellular and Molecular Life Sciences*. 77.93-113.
- Barbonetti, A., Cinque, B., Vassallo, M. R. C., Mineo, S., Francavilla, S., Cifone, M. G., and Francavilla, F. (2011). "Effect of vaginal probiotic lactobacilli on in vitro-induced sperm lipid peroxidation and its impact on sperm motility and viability." *Fertility and sterility*. 95(8). 2485-2488.
- Baskaran, S., Agarwal, A., Panner Selvam, M. K., Finelli, R., Robert, K. A., Iovine, C., Pushparaj, P.N., Samanta, L., Harlev, A., and Henkel, R. (2019). "Tracking research trends and hotspots in sperm DNA fragmentation testing for the evaluation of male infertility: a scientometric analysis." *Reproductive Biology and Endocrinology*. 17(1). 1-13.
- Baud, D., Pattaroni, C., Vulliemoz, N., Castella, V., Marsland, B. J., and Stojanov, M. (2019). "Sperm microbiota and its impact on semen parameters." *Frontiers in microbiology*. 10. 234.
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., and Dada, R. (2017). "Oxidative stress and male infertility." *Nature Reviews Urology*. 14(8). 470-485.
- Bukharin, O. V., Perunova, N. B., Ivanova, E. V., Chaynikova, I. N., Bekpergenova, A. V., Bondarenko, T. A., and Kuzmin, M. D. (2022). "Semen microbiota and cytokines of healthy and infertile men." *Asian Journal of Andrology*. 24(4). 353-358.

- Campbell, C. (2017). "Advances in testing and monitoring of biocides in oil and gas." In El-Sherik, A.M. (ed.), *Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies*. 489-511. Boston: Woodhead Publishing.
- Cao, T., Wang, S., Pan, Y., Guo, F., Wu, B., Zhang, Y., Wang, Y., Tian, J., Xing, Q., and Liu, X. (2023). "Characterization of the semen, gut, and urine microbiota in patients with different semen abnormalities." *Frontiers in Microbiology*. 14. 1182320.
- Costa, M., & Weese, J. S. (2019). "Methods and basic concepts for microbiota assessment." *The Veterinary Journal*. 24. 10-15.
- Đuračka, M., Husarčíková, K., Jančov, M., Galovičová, L., Kačániová, M., Lukáč, N., and Tvrdá, E. (2021). "Staphylococcus-induced bacteriospermia in vitro: consequences on the bovine spermatozoa quality, extracellular calcium and magnesium content." *Animals*. 11(11). 3309.
- Eroglu, M., Sahin, S., Durukan, B., Ozakpinar, O. B., Erdinc, N., Turkgeldi, L., Sofuoglu, K. and Karateke, A. (2014). "Blood serum and seminal plasma selenium, total antioxidant capacity and coenzyme q10 levels in relation to semen parameters in men with idiopathic infertility." *Biological Trace Element Research*. 159. 46-51.
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E., Sharma, R., Humaidan, P. (2021). "Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations." *Andrologia*. 53(2). e13874.
- Ford, W. C. L. (2004). "Regulation of sperm function by reactive oxygen species." *Human reproduction update*. 10(5). 387-399.
- Fraher, M. H., O'Toole, P. W., and Quigley, E. M. (2012). "Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 9(6), 312-322.
- Fraietta, R., Zylberstejn, D. S., and Esteves, S. C. (2013). "Hypogonadotropic hypogonadism revisited." *Clinics*. 68. 81-88.
- Garcia-Segura, S., Del Rey, J., Closa, L., Garcia-Martínez, I., Hobeich, C., Castel, A. B., Vidal, F., Benet, J., Ribas-Maynou, J., and Oliver-Bonet, M. (2022). "Seminal microbiota of idiopathic infertile patients and its relationship with sperm DNA integrity." *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 10. 937157.
- Giuliano, F. and Clement, P. (2005). "Neuroanatomy and physiology of ejaculation." *Annual Review of Sex Research*. 16(1).190-216.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., and Darzynkiewicz, Z. (1993). "Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells." *Experimental Cell Research*, 207(1). 202-205.
- Gupta, S., Caraballo, M., and Agarwal, A. (2019). "Total antioxidant capacity measurement by colorimetric assay." In Henkel, R., vd., (eds). *Oxidants, antioxidants and impact of the oxidative status in male reproduction*. 207-215. Cambridge: Academic Press.
- Gupta, S., Finelli, R., Agarwal, A., and Henkel, R. (2021). "Total antioxidant capacity-Relevance, methods and clinical implications." *Andrologia*. 53(2). e13624.
- Güneş, S., and Kulaç, T. (2013). "The role of epigenetics in spermatogenesis." *Turkish Journal of Urology*. 39(3). 181.
- Gürsoy, N. C. ve Barış, O. (2017). "Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri." *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*. 1. 56-67.
- Hamada, A., Esteves, S. C., Nizza, M., and Agarwal, A. (2012). "Unexplained male infertility: diagnosis and management." *International Braz J Urol*. 38. 576-594.

- Hekim, N., Gunes, S., Asci, R., Henkel, R., and Abur, U. (2021). "Semiquantitative promoter methylation of MLH1 and MSH2 genes and their impact on sperm DNA fragmentation and chromatin condensation in infertile men." *Andrologia*. 53(1). e13827.
- Hologlu, D., Gunes, S., Asci, R., Henkel, R., ve Guvenc, T. (2022). "Association among sperm chromatin condensation, sperm DNA fragmentation and 8-OHdG in seminal plasma and semen parameters in infertile men with oligoasthenoteratozoospermia." *Andrologia*. 54(1). e14268.
- Hopkins, B. R., Sepil, I., and Wigby, S. (2017). "Seminal fluid." *Current Biology*. 27(11). R404-R405.
- Hou, D., Zhou, X., Zhong, X., Settles, M. L., Herring, J., Wang, L., Abdo, Z., Forney, L.J., and Xu, C. (2013). "Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men." *Fertility and sterility*. 100(5). 1261-1269.
- Jung, J. H., and Seo, J. T. (2014). "Empirical medical therapy in idiopathic male infertility: promise or panacea?." *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 41(3). 108.
- Kabartan, E., Gunes, S., Arslan, M. A., and Asci, R. (2019). "Investigating the relationship between BRCA1 and BRCA2 genes methylation profile and sperm DNA fragmentation in infertile men." *Andrologia*. 51(7). e13308.
- Kim, M. S., and Jung, S. I. (2021). "The urinary tract microbiome in male genitourinary diseases: focusing on benign prostate hyperplasia and lower urinary tract symptoms." *International Neurourology Journal*. 25(1). 3.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F. O. (2013). "Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies." *Nucleic Acids Research*. 41(1). e1-e1.
- Koedooder, R., Mackens, S., Budding, A., Fares, D., Blockeel, C., Laven, J., and Schoenmakers, S. (2018). "Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts." *Human Reproduction Update*, 25(3). 298-325.
- Leaver, R. B. (2016). "Male infertility: an overview of causes and treatment options." *British Journal of Nursing*. 25(18). 35-40.
- Leisegang, K., Sengupta, P., Agarwal, A., and Henkel, R. (2021). "Obesity and male infertility: mechanisms and management." *Andrologia*, 53(1). e13617.
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., and Swan, S. H. (2017). "Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis." *Human Reproduction Update*. 23(6). 646-659.
- Lewis, S. E., and Simon, L. (2010). "Clinical implications of sperm DNA damage." *Human Fertility*. 13(4). 201-207.
- Linn, E., Ghanem, L., Bhakta, H., Greer, C., and Avella, M. (2021). "Genes regulating spermatogenesis and sperm function associated with rare disorders." *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9. 634536.
- Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., Brady, A., Creasy, H. H., McCracken, C., Giglio, M.G., McDonald, D., Franzosa, E. A., Knight, R., White, O., and Huttenhower, C. (2017). "Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project." *Nature*. 550(7674). 61-66.
- Lotti, F., and Maggi, M. (2018). "Sexual dysfunction and male infertility." *Nature Reviews Urology*. 15(5). 287-307.

- Mastromarino, P., Macchia, S., Meggiorini, L., Trinchieri, V., Mosca, L., Perluigi, M., and Midulla, C. (2009). "Effectiveness of *Lactobacillus*-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis." *Clinical Microbiology and Infection*. 15(1). 67-74.
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., and Zhao, M. (2003). "Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis." *Chromosoma*. 111(8). 483-488.
- Minelli, A., and Bellezza, I. (2011). "Methylxanthines and reproduction." *Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology*. (vol 200). Heidelberg: Springer Berlin.
- Minhas, S., Bettocchi, C., Boeri, L., Capogrosso, P., Carvalho, J., Cilesiz, N. C., Cocci, A., Corona, G., Dimitropoulos, K., Gül, M., Hatzichristodoulou, G., Jones, T. H., Kadioglu, A., Salamanca, J. I. M. Milenkovic, U., Modgil, V., Russo, G. I., Serefoglu, E. C., Tharakan, T., ..., and Salonia, A. (2021). "European association of urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 update on male infertility." *European Urology*. 80(5). 603-620.
- Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B. P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., de Rooij, D. G., and Vicini, E. (2013). "Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development." *Biology of Reproduction*. 89(3). 60-1.
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., and Goldstein, M. (2016). "Spermatogenesis in humans and its affecting factors." *Seminars in Cell & Developmental Biology* (vol 59) 10-26. Cambridge: Academic Press.
- O'Donnell, L. (2014). "Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed." *Spermatogenesis*. 4(2). e979623.
- Oleszczuk, K., Augustinsson, L., Bayat, N., Giwercman, A., and Bungum, M. (2013). "Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples." *Andrology*. 1(3). 357-360.
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Ullmann, U., Hampe, J., and Schreiber, S. (2004). "Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora." *Journal of Clinical Microbiology*. 42(6). 2566-2572.
- Panner Selvam, M. K., Ambar, R. F., Agarwal, A., and Henkel, R. (2021). "Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility." *Andrologia*. 53(1). e13706.
- Panner Selvam, M. K., Sengupta, P., and Agarwal, A. (2020). "Sperm DNA fragmentation and male infertility." *Genetics of Male Infertility: A Case-Based Guide for Clinicians*. 155-172.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., and Perkins, D. L. (2016). "Analysis of the microbiome: advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 469(4). 967-977.
- Ricchi, M., Bertasio, C., Boniotti, M. B., Vicari, N., Russo, S., Tilola, M., Bellotti, M. A., and Bertasi, B. (2017). "Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods." *Frontiers in Microbiology*. (8). 1174.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nelson, D. R., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Alvarez, J. G., Thomas Jr, A. J., and Sharma, R. K. (2002). "Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study." *Fertility and Sterility*. 78(2). 313-318.
- Saleh, R. A., and Agarwal, A. (2002). "Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice." *Journal of Andrology*. 23(6). 737-752.

- Santi, D., Spaggiari, G., and Simoni, M. (2018). "Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management—meta-analyses." *Reproductive Biomedicine Online*. 37(3). 315-326.
- Sarang, A. N., Goel, A., and Aggarwal, R. (2019). "Methods for studying gut microbiota: a primer for physicians." *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 9(1). 62-73.
- Schultz, N., Hamra, F. K., and Garbers, D. L. (2003). "A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(21). 12201-12206.
- Sedó, C. A., Bilinski, M., Lorenzi, D., Uriondo, H., Noblía, F., Longobucco, V., Lagar, E.V., and Nodar, F. (2017). "Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects." *JBRA Assisted Reproduction*, 21(4), 343.
- Sharma, R. K., Sabanegh, E., Mahfouz, R., Gupta, S., Thiagarajan, A., and Agarwal, A. (2010). "TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility." *Urology*. 76(6). 1380-1386.
- Sharma, R., and Agarwal, A. (2011). "Spermatogenesis: an overview." *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. 19-44.
- Sharma, R., Iovine, C., Agarwal, A., and Henkel, R. (2021). "TUNEL assay - Standardized method for testing sperm DNA fragmentation." *Andrologia*. 53(2). e13738.
- Sheu, G., Revenig, L. M., and Hsiao, W. (2014). "Physiology of ejaculation." *Men's Sexual Health and Fertility: A Clinician's Guide*. 13-29. Mulhall, J. P., and Wayland, H. (eds). New York: Springer New York.
- Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M. B., Liu, L., Emery, B., Aston, K. I., Hotaling, J., and Carrell, D. T. (2014). "Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development." *Human Reproduction*. 29(11). 2402-2412.
- Sun, H., Gong, T. T., Jiang, Y. T., Zhang, S., Zhao, Y. H., and Wu, Q. J. (2019). "Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017." *Aging (Albany NY)*. 11(23). 10952.
- Terquem, A., and Dadoune, J. P. (1983). "Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin. Evaluation of nuclear maturation." *The Sperm Cell: Fertilizing Power, Surface Properties, Motility, Nucleus and Acrosome, Evolutionary Aspects Proceedings of the Fourth International Symposium on Spermatology, Seillac, France, 27 June–1 July 1982* (249-252). André, J. (ed). Dordrecht: Springer Netherlands.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012a). "A framework for human microbiome research." *Nature* (486). 215–221.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012b) "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." *Nature* (486). 207–214.
- The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. (2019). "The Integrative Human Microbiome Project." *Nature* (569), 641–648 (2019).
- Tournaye, H., Krausz, C., and Oates, R. D. (2017). "Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment." *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 5(7). 544-553.
- Tremellen, K. (2008). "Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective." *Human Reproduction Update*. 14(3). 243-258.
- Weng, S. L., Chiu, C. M., Lin, F. M., Huang, W. C., Liang, C., Yang, T., Liu, C.Y., Wu, W. Y., Chang, Y. A., and Huang, H. D. (2014). "Bacterial communities in semen from

- men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality.” *PloS One*. 9(10). e110152.
- World Health Association. (2018). *International classification of diseases 11th revision (ICD-11)*. Geneva: World Health Organization (WHO).
- World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed.* Geneva: World Health Organization (WHO).
- Yao, Y., Qiu, X. J., Wang, D. S., Luo, J. K., Tang, T., Li, Y. H., Zhang, C.H., Liu, H., Zhou, L., and Zhao, L. L. (2022). “Semen microbiota in normal and leukocytospermic males.” *Asian Journal of Andrology*. 24(4). 398.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Priesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., J. Euzéby, J., Amann, R., and Rosselló-Móra, R. (2014). “Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences.” *Nature Reviews Microbiology*. 12(9). 635-645.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., and van der Poel, S. (2017). “The international glossary on infertility and fertility care, 2017.” *Human Reproduction*. 32(9). 1786-1801.
- Zeqiraj, A., Beadini, S., Beadini, N., Aliu, A., Gashi, Z., Elezaj, S., Bexheti, S., and Shabani, A. (2018). “Male infertility and sperm DNA fragmentation.” *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 6(8). 1342.



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/198-207

04.04.2022

Sayın Prof. Dr. Sezgin Güneş

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Obez Erkeklerde Semen Mikrobiyomunun Yeni Nesil Dizilemeyle Fertilite Açısından Değerlendirilmesi başlıklı OMÜ KAEK 2022/139 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 23.03.2022 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

EKLER-2

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI)
Obez Erkeklerde Semen Mikrobiyomunun Yeni Nesil Dizilemeyle Fertilite Açısından Değerlendirilmesi
Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.
BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDA MIYIM?
Hayır
ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?
Obez erkeklerin semen örneklerinde bulunan mikrobiyal içerik ve çeşitlilik incelenecek ve fertilite açısından değerlendirilecektir. Obez infertil ve fertil erkeklerde seminal mikrobiyotanın belirlenmesi ve fertilite açısından karşılaştırılması öncelikle amaçlanmaktadır. Ayrıca, seminal mikrobiyotanın semen parametreleri, sperm DNA fragmantasyonu ve total antioksidan kapasite üzerindeki etkisinin araştırılması da hedeflenmektedir. Ek olarak katılımcıların beslenme öyküleri değerlendirilerek beslenme alışkanlıklarının belirtilen parametreler ile ilgili olası ilişkisi incelenecektir.
ÇALIŞMA İŞLEMLERİ
Anket seminal mikrobiyota analizi
BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?
- Semen, beslenme alışkanlıklarının değerlendirilebilmesi için verilen anketleri doldurmak

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?
Yayında istatistiksel analiz yapıp yayınlanacaktır.
ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER
Prof. Dr. Ramazan Aşçı
ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR
Kendi isteğiniz
YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR
Değiştirmez
Çalışmaya Katılma Onayı Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Bulunmamaktadır.

GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ

-

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Bilimsel verilerin elde edilmesi

GÖNÜLLÜ KATILIM

Evet

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Bulunmamaktadır.

Gönüllünün Adı Soyadı / Tarih / İmzası			
Açıklamaları Yapan Adı Soyadı / Tarih / İmzası			
Olur İşlemine Tanık Olan Adı Soyadı / Tarih / İmzası			
Yasal Temsilcinin Adı Soyadı / Tarih / İmzası	/		

ÖZ GEÇMİŞ

Elzem Nisa BARHAN, Samsun Bafra Fen Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik bölümünden 10.06.2019 tarihinde mezun oldu. 2021 yılında OMÜ LEE Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Mezuniyetinden bu yana Ondokuz Mayıs Üniversitesi İnsan ve Toplum Bilimleri Fakültesi, Psikoloji bölümünde ikinci lisans eğitimine devam eden Elzem Nisa BARHAN, orta derecede İngilizce bilmektedir (YDS:76, YÖKDİL:85). Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası ve Uygulamalı Temel Hücre Kültürü Eğitimi Sertifikasına sahip olan Elzem Nisa BARHAN'ın temel ilgi alanları, mikrobiyota, erkek infertilitesi, epigenetik ve psikolojidir (03.07.2023).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-6988-0988

Yayınlar:

1. Comparison of Sperm DNA Fragmentation in Infertile Patient Groups with and without Varicocele – Sivas Uluslararası Bilimsel Araştırmalar ve İnovasyon Kongresi

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. TÜBİTAK 2210-A Genel Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu
2. TÜBİTAK 2247-C Stajyer Araştırmacı Bursu

Yer Aldığı Projeler

1. Prostat Kanseri Kesilmiş Kit (Tr-Kit) Protein Varyantının Bilinmeyen Yüzünün Aydınlatılması (119Z574) – Stajyer öğrenci
2. Yardımcı Üreme Teknikleri Başarısında Seminal Plazmadaki tRNA'dan Türemiş Fragmanların (5'tRF-Glu-CTC, 5'tRF-Lys-CTT ve 5'tRF-Gly-GCC) Rolünün Oligospermik, Oligoastenoteratozpermik ve Normospermik Erkeklerde Araştırılması (PYO,TIP,1901,22,003) – Yardımcı araştırmacı
3. Varikoselle ilişkili infertilitede hsa-miR-574-5p'nin Rolünün Araştırılması (PYO,TIP,1901,22,004) – Yardımcı araştırmacı