



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

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

**SEMENDEKİ CATSPER EKSPRESYON DEĞERLERİNİN
NORMOSPERMİK OLGULARDA SPERM PARAMETRELERİ İLE
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

SEMRA YAZICI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

2019



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**SEMENDEKİ CATSPER EKSPRESYON DEĞERLERİNİN
NORMOSPERMİK OLGULARDA SPERM PARAMETRELERİ İLE
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

SEMRA YAZICI

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

2019

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Program Adı: Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Öğrencinin Adı Soyadı: SEMRA YAZICI

Danışman: Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Semra YAZICI tarafından hazırlanan "Semendeki CATSPER Ekspresyon Değerlerinin Normospermik Olgularda Sperm Parametreleri İle İlişkinin İncelenmesi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:11/09/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Zeliha YAZICI

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Melike ERKAN

İstanbul Üniversitesi

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

Prof. Dr. Leman ŞENTURAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

I. BEYAN

Bu tezin bana ait olduğunu, tüm aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, içinde yer alan bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, kullanmış olduğum bütün bilgilere kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin yürütülmesi ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Semra YAZICI



II. TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya başından beri yaptığı katkılardan dolayı, saygıdeğer hocam ve tez danışmanım sevgili Prof. Dr. Tülay İREZ ve Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU'ya teşekkür ederim. Her zaman sonsuz destekleri ve sevgilerini benden esirgememelerine büyük şükran duymaktayım. Araştırmanın laboratuvar sürecinde bilgi ve deneyimlerini üzerimden eksik etmeyen Ebru İBİŞ'e ve Selda HAYME'ye teşekkürü borç bilirim. Bu süreçte maddi ve manevi açıdan desteğini eksik etmeyen sevgili eşim Görkem'e, canım oğlum Kıvanç'a ve aileme teşekkür ederim.

Semra YAZICI

III. İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İç Kapak	-
Onay Sayfası	-
I. BEYAN.....	iii
II. TEŞEKKÜR	iv
III. İÇİNDEKİLER	v
IV. SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
V. TABLO LİSTESİ	viii
VI. ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1.İnfertilite Nedir?	4
4.2.Erkek Üreme Sistemi Anatomisi ve Histolojisi.....	5
4.2.1.Spermatogenez	6
4.2.2.Spermin Yapısı	9
4.2.2.1. Baş bölümü.....	10
4.2.2.2. Kuyruk Bölümü	10
4.2.3. Sperm kapasitasyon.....	11
4.2.4.Fertilizasyon(Döllenme) Nedir?	13
4.3. Sperm İnceleme ve Hazırlama Yöntemleri.....	15
4.3.1. Spermin Toplanması.....	16
4.3.2. Spermin fiziksel incelenmesi.....	16
4.3.3. Spermin mikroskopik muayene ile incelenmesi.....	17
4.3.4. Motilite tayini	17
4.3.4.1. Total motilite hesaplama	17
4.4. Sperm canlılık testleri:.....	17
4.4.1. Eozin Y testi.	17
4.4.2. HOS testi.	17
4.4.3. Spektrofotometrik yöntem.....	18
4.4.4. CASA Yöntemi	18
4.5. Sperm Yıkama Teknikleri.....	18

4.5.1. SWIM- UP.....	18
4.6. CatSper Proteini Yapısı ve Özellikleri.....	19
4.6.1. CatSper ekspresyon ve lokalizasyon	21
4.7. CatSper Düzenlenmesi.....	22
4.8.CatSper ve Fertilizasyonun Önemi	24
5.MATERYAL VE METOT	25
5.1. Hasta Seçimi	25
5.2.Çalışma Şeması.....	26
5.3. Semen Analizi.....	26
5.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	27
5.4.1. Catsper proteini için CASA yöntemi.....	27
5.4.2. CatSper proteini için immün floresan boyama prosedürü.....	29
5.5. İstatistiksel Yöntemler.....	30
6.BULGULAR.....	30
7.TARTIŞMA	36
8.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
9.KAYNAKÇA.....	40
10.EKLER.....	47
EK 1_BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	47
EK 2_KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU.....	49
11.ÖZGEÇMİŞ	52
İntihal Raporu	53

IV. SİMGELER VE KISALTMALAR

2AG	2-arachidonoylglycerol
DSÖ-WHO	Dünya Sağlık Örgütü, World Health Organization
PBS	Phosphate Buffer Saline
PFA	Paraformaldehyde Acid
TXT-100	Triton X-100
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Ca ⁺²	Kalsiyum

V. TABLO LİSTESİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1.	İnfertilitenin Etiyolojik Kriterleri ve Görülme Oranları	5
Tablo 2.	Semen Analizinin Referans Değerleri.....	16
Tablo 3.	Normospermik olgularda konsantrasyon,motilite,normal morfoloji istatistik sonuçları.....	33

VI. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Şeklin İsmi	Sayfa No
Şekil 1.	Çiftlerde İnfertilite Sebepleri	4
Şekil 2.	Erkek Üreme Sistemi Şeması	6
Şekil 3.	Spermatogenezin Şematik Gösterimi	9
Şekil 4.	İnsan Spermatozoasının Işık ve Elektron Mikroskopik Şemaları.....	10
Şekil 5.	İnsan Sperm Yapısı Şekli	11
Şekil 6.	Sperm Kapasitasyon Şeması.....	12
Şekil 7.	Spermin Oosit Membranı İle Kaynaşması.....	14
Şekil 8.	Fertilizasyon Aşamaları	15
Şekil 9.	Hipermotilite: Normal Sperm ve CatSper Sperm.....	20
Şekil 10.	CatSper Kanalinin Fonksiyon ve Regülasyonu	21
Şekil 11.	Sperm CatSper Lokalizasyonu	22
Şekil 12.	İnsan sperm flagellumunun iyon kanalları	23
Şekil 13.	CatSperin Fonksiyonel Önemi.....	24
Şekil 14.	CASA İle Ölçülen Semen Motilite Parametreleri İçin Standart Terminoloji	28
Şekil 15.	Sperm morfoloji değerlendirmesi Normozoospermi örneğinin gösterilmesi ...	30
Şekil 16.	Sperm morfoloji değerlendirmesi Normozoospermi örneğinin gösterilmesi ...	31
Şekil 17.	Normozoospermik olgularda konsantrasyon ile Catsperin Ekspresyon % korelasyon sonuçları.....	32
Şekil 18.	Normozoospermik olgularda motilitenin Catsperin Ekspresyon % korelasyon sonuçları	32
Şekil 19.	Normozoospermi hastalarda Konsantrasyon-motilite ve morfolojinin istatistiksel analizi	34
Şekil 20.	Normozoospermik olgularda CatSper ve progresif motilite tayini.....	34
Şekil 21.	Spermde bulunan pozitif ve negatif CatSper ekspresyonu	35
Şekil 22.	Spermde bulunan Pozitif CatSper ekspresyonu.....	35

1. ÖZET VE ANAHTAR KELİMELELER

İnfertilite (kısırlık), çiftlerin çocuk sahibi olmak isteyip, korunmaksızın 1 yıl ve üzeri bir süre içerisinde cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen gebeliğin oluşmadığı durumları tanımlar. Günümüzde çiftlerin %10-15'inde infertiliteye rastlandığı rapor edilmektedir. Çiftlerin %35'inde erkeğe, %35'inde ise kadına bağlı infertilite ortaya çıkmaktadır. Her iki eşe ait kısırlık sebepleri %18 olarak belirtilmekte, çiftlerde infertiliteye yol açacak belirgin bir patolojiye rastlanmadığı durumlar ise açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmaktadır (%12). Erkek infertilitesinin nedenleri arasında sperm sayısı, hareketliliği ve sperm kalitesindeki bozukluklar ön plandadır. İdiyopatik (açıklanamayan) infertilite stres, çevresel faktörler, genetik anomaliler, kanal tıkanıklıklarını içermektedir. Kadına bağlı infertilite nedenleri arasında anatomik bozukluklar, tuba uterinadaki obstrüksiyonlar, hormonal bozukluklar görülmektedir. Spermatozoon membran ve flagellum (kuyruk) üzerinde bulunan proteinler spermin oosit membranına tutunmasına ve ekstrasellüler matriks alanına girmesine yardımcı olmaktadır. CatSper proteininin yapısı 4 alt birimden oluşmuş heterotetramerik bir yapıya sahiptir. CatSper kanalı sperm flagellasının kamçı kısmında bulunur. CatSper katyon kanalları sperm parametrelerinden hareketliliği doğrudan etkilemekte, ayrıca akrozom reaksiyonu, hücre içi pH'sı ve kuyruk kamçı hareketini de kontrol etmektedir. CatSper sadece sperme özgü bir kanaldır ve erkek fertilitasını önemli derecede etkilemektedir. Sperm kalitesi ve sağlıklı fertilizasyon için gereklidir

Bu çalışma da 50 normozoospermik olgudan alınan sperm örnekleri ile standart semen analizi sonrası CatSper ekspresyon değerlerinin incelenmesi ve sperm parametreleri ile ilişkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda CatSper ekspresi eden hücrelerin gebelik şansını artırması yönündeki çalışmalarda yararlı olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle parametreleri değerlendirecek ilk çalışma olması bakımından literatüre önemli katkılar sağlayacağını amaçlamaktayız.

Anahtar Kelimeler: CatSper, Konsantrasyon, Sperm

2.ABSTRACT

Investigation of the Relationship Between CatSper Expression Values in Semen and Sperm Parameters in Normospermic Cases

Infertility; describes the situations in which pregnancy does not occur although couples they want to have children and have sex in a period of 1 year or more without being protected. Nowadays, 10-15% of couples are reported to have infertility. In 35% of the couples, infertility caused by women and in 35% of the couples caused by men. In 18% of the couples infertility caused by both spouses and the cases where there is no significant pathology leading to infertility in spouses, defined as unexplained infertility (12%). Among the causes of male infertility; sperm counts, mobility and sperm quality are in the forefront. Idiopathic (unexplained) infertility includes stress, environmental factors, genetic anomalies, and duct obstruction. The causes of infertility caused by women are anatomical disorders, tubal uterine obstruction and hormonal disorders. Proteins located on the spermatozoon membrane and flagellum (tail) provides the help for sperm to adhere to the oocyte membrane and into the extracellular matrix area.

The structure of the CatSper protein has a heterotetrameric structure consisting of 4 subunits. The CatSper channel is located in the bullwhip of the sperm flagellate. CatSper is a semen-specific duct and has a significant impact on male fertility. It is necessary for sperm quality and healthy fertilization.

In this study, it was aimed to examine the CatSper expression values after standard semen analysis with sperm samples from 50 normozoospermic cases and to examine the relationship between sperm parameters. In our study, it is thought that CatSper expressed cells will be useful in studies to increase the chances of pregnancy. Therefore, we aim to make significant contributions to the literature in terms of being the first study to evaluate the parameters.

Keywords: CatSper, Concentration, Sperm

3.GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite (kısırlık), doğum kontrol yöntemi kullanmayarak 12 ay boyunca çiftlerin cinsel ilişki sonucu gebelik elde edememesidir (Centers for Disease Control and Prevention, 2017).Günümüzde çiftlerin %10-15'inde infertiliteye rastlandığı rapor edilmektedir. Bu oran çiftlerde kadın ve erkeğe bağlı infertilite açısından incelenmelidir. Açıklanamayan infertil hastalarda çiftler bu süreçte sıkıntılar yaşamaktadır. Açıklanamayan infertilite stres, çevresel faktörler, genetik anomaliler, kanal tıkanıklıklarını içermektedir (Kişnişçi ve ark.,1996, WHO, 2010).

Açıklanamayan infertilite kadın ve erkeğe ait değerlendirmelerde herhangi bir bulguya rastlanılmadığı durumları ifade eder.

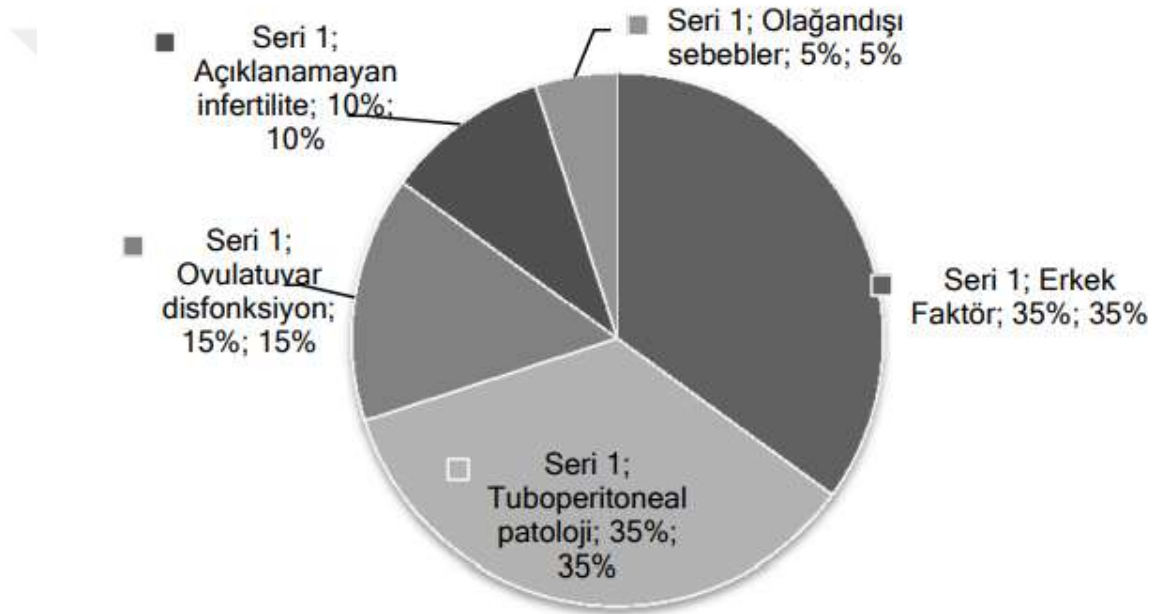
CatSper, sperme özgü, voltaj bağımlı, Ca^{+2} 'a seçici, pH'ya duyarlı ve pozitif yüklü bir kanaldır aynı zamanda kalsiyum iyonlarının geçişini sağlar.Sperm hiperaktivasyonu ve erkek fertilitesi için önemli bir katyon kanalıdır.Aynı zamanda kalsiyum, sperm hücrelerinin içine bu kanallardan pompalanmasıyla spermi aktif hale geçirerek hiperaktivasyonu tetikler (Singh and Rajender, 2015).CatSper katyon kanalları spermin hareketliliğine direkt katkı sağlamakta, akrozom reaksiyonunu düzenlemektedir, buna ek olarak hücre içi pH'sını dengelemektedir (Shukla, et al .,2012). CatSper proteininin yapısı 4 alt birimden oluşacak şekilde heterotetramerik yapıya sahiptir.Bu yapının herhangi bir alt ünitesindeki mutasyon ve bozukluklar infertiliteye neden olduğu düşünülmektedir.Bu fikri destekler nitelikte olan farelerde yapılan bir deneyde α alt ünitelerin kaybı infertiliteye neden olmuştur (Bhilawadikar et al., 2013).

Bu çalışmamız da; Semendeki CatSper proteininin ekspresyon yüzdesinin sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile ilişkisinin araştırılıp üremeye yardımcı tedavilerde literatüre katkı yapılması hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.İnfertilite Nedir?

İnfertilite çiftlerin 1 yıl boyunca düzenli cinsel birliktelik sonucu çocuk sahibi olamama durumuna denir. Erkeğe bağlı infertilite toplumun %35'ini ilgilendiren bir orana sahiptir. Erkek infertilitesi sperm sayısının düşüklüğünün yanı sıra anormal morfoloji, hormonal ve genetik bozuklukları kapsar (Ferlin, et al., 2006).



Şekil 1. Çiftlerde İnfertilite Sebepleri

Kaynak: Speroff, 2005

4.2. Erkek Üreme Sistemi Anatomisi ve Histolojisi

Erkek infertilitesinin nedenleri arasında sperm sayısı, hareketliliği ve sperm kalitesindeki bozukluklar başlıca nedenler arasındadır. İdiyopatik (açıklanamayan) infertilite stres, çevresel faktörler, genetik anomaliler, kanal tıkanıklıklarını içermektedir (Kışnişçi ve ark., 1996, WHO, 2010).

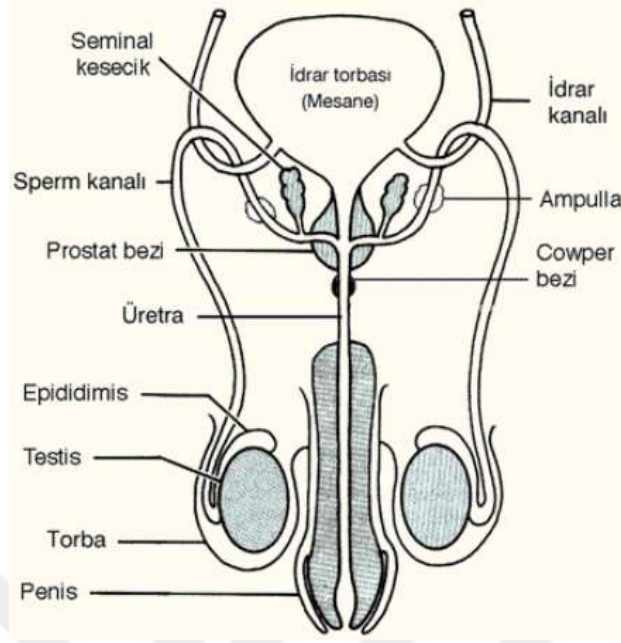
Tablo 1. İnfertilitenin Etiyolojik Kriterleri ve Görülme Oranları

Erkek Faktörü	%36
Tubal Faktör	%17
Endometriyozis	%5
Anovulasyon	%5
Açıklanamayan İnfertilite	%16
Nedensiz	%2
Birden fazla sebep	%19

Erkek infertilitesinde yapılan araştırmalara göre (Azoospermi, Oligozoospermi, genetik hastalıklar) anormal sperm parametreleri ortaya çıkmıştır. Bu sebeplere bağlı olarak sperm parametresi ve morfolojilerinde anomali bulunan erkeklerin erkek infertilitesi altında toplandığı görülüyor.

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmuştur. Testis hormon ve spermatozoon üretir diğer yandan yardımcı bezler ise spermatozoonun dışarıya atılmasını ve onu besleyen salgıları üretirler.

Spermatozoon ve genital kanallar yardımcı bezlerle birlikte penis yoluyla dışı üreme sistemine bırakılan semeni oluşturur (Eşrefoğlu, 2009).



Şekil 2. Erkek Üreme Sistemi Şeması

Semenin örneğinin sadece az bir kısmında sperm bulunurken kalan büyük bir bölümü prostat ve salgı bezlerinden oluşur (Eşrefoğlu, 2009).

4.2.1.Spermatogenez

Germ hücreleri fetal evrenin erken kısmında görülmeye başlar.Bu hücreler yolk kesesinden allontoise yakın bir kısımda endodermal hücrelerden kaynaklanır.İntrauterin evrenin 5. haftasından sonra genital kabartıya göç başlar. Büyük germ hücreleri kord oluşumundan sonra gonosit ismini alırlar.Doğumu takip eden sürecin sonrasında artan Sertoli hücresi sayısı bu nedenle azalır.Seminifer tübüllerin perifel kısımlarına yerleşen gonositler spermatogonyum ismini alırlar.Puberte oluşumuna yakın seminifer kordlar bir araya gelerek spermatogonyumların mitotik aktivasyonu artar.Spermatogenez puberte ile başlar.Tip A spermatogonyumların bir kısmı bölünerek olgun sperme dönüşen hücre popülasyonunu yardımcı olurken bir kısmı da bazal kompartmanda ki kök hücre popülasyonunun korumasını destekler.

Olgun sperm oluşumu 64 günde değerlendirilir.

1.Hücre bölünmeleri kendi içinde ikiye ayrılır.

a.Spermatositogenez adı verilen mitoz bölünme aşamasında bölünerek spermatogonyumlara dönüşürler.Bir kısmı A4 spermatogonya, azalan kök hücre rezervini dengelemek için geri dönüşürken, kalan bir kısmı da ara spermatogonyalara ve B1 ve B2 spermatogonyumlara dönüşür (NSchlegel, et al., 2007).A spermatogonyum tekrar bölünmesi için 16 gün gereklidir.B spermatogonyumların da mitotik bölünmesi ile primer spermatositler oluşarak mitoz bölünme aşaması sona erer(NSchlegel, et al., 2007; De Jonge and Barratt, 2006).

b.Primer spermatositler 22 gün süren mayoz bölünmenin profaz evresine girerek, mayoz bölünmeyi sağlarlar ve sekonder spermatositlere dönüşürler (Brhem R. ve ark. 2005)(şekil3).Sekonder spermatositler de mayoz bölünmenin ikinci aşaması sonrası spermatidlere dönüşürler (NSchlegel, et al., 2007;Gartner and Hiatt, 2006; Brehm and Steger, 2005).

2.Spermatogenezin ikinci kısmı spermin olgunlaşma evresini kapsar.Bu evreye spermiyogenez de denir.Tahminen 22 gün süren bu evre 4 aşamada incelenir.Son aşama olan olgunlaşma evresinde olgun sperm meydana gelir (NSchlegel, et al., 2007; Gupta, 2010).

1. Flagellum (kamçı) gelişimi:Kuyruğun sperm hareketini sağlayan bölümüne denir.İç kısımda yer alan aksonem tüm kuyruk boyunca uzanır (Jong and Barratt, 2006; Koshimor, 2008).Ana merkez kısmına yerleşmiş bir çift tübül ve etrafını saran 9 çift mikrotübül yapının esas kısmını oluşturur.Tübül çiftlerin hemen yanında bulunan kuyruğa elastikiyet ve spesifik özellik kazandıran yoğun dış fibriller bulunur.

2.Akrozom gelişimi:

a.Akrozom evresi:Kromozomların daha yoğun bir şekilde katlanmasından dolayı çekirdek hacmi azalır uzun boyut kazanır.Birbirine paralel çok sayıda mikrotübülden oluşan manşet adı verilen sperm nükleusundan distale uzanım gösteren geçici bir yapı

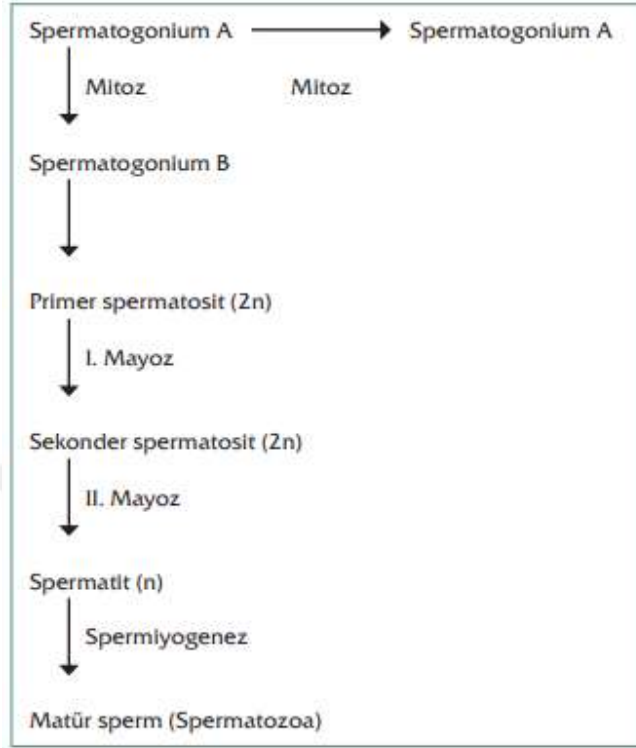
ortaya çıkar.Silindir şeklindeki bu yapı uzadıkça beraberinde sitoplazma içindeki mitokondrilerde uzayan spermatid içinde kuyruk yönünde taşınır.Manşetle birlikte uzayan sitoplazma gelişen flagelluma ulaştığında,mikrotübüler yapı kaybolur ve bu noktada sperm kuyruğunu orta parçadan ayıran kısımda anulus meydana gelir.

b.Golgi evresi:Spermatidler golginin içerisinde çekirdeğe yakın bir kısımda bulunur.Endoplazmik retikulum tarafından salgılanan enzimler değişim için Golgi aygıtına taşınır, değişime uğradıktan sonra Golgi içinde oluşan granüller küçük vesiküller oluşturarak Golgi bağı ile salınırlar.Küçük vezikülle spermin ön yüzünü oluşturacak şekilde çekirdek zarına tutarak ve akrozomal vezikül oluşumunu destekler.Distal sentriol aksonem oluşumuna katılırken, proksimal sentriol bağlantı parçasının oluşumuna katkıda bulunur.

c.Olgunlaştırma evresi:Sitoplazma artık maddeleri hücrelerden uzaklaştırılır.Kromozom birleşmesi ve istikrarı devam eder.Olgun sperm görünümünde ki yapı lümene sevk edilir.

d.Kep-Şapka evresi: Akrozomal vezikül yassılaşır,nükleusun ön kısmını kaplayacak şekilde genişleyerek bir kep görüntüsü oluşturur.Nükleus membramının bu kısma bakan bölümündeki porlar kaybolur ve membran kalınlaşarak nükleus yoğunlaşır.Sentriyol çifti akrozomal vezikülün arka kutbuna ulaşmıştır.Spermatid ise bazal kompartman akrozomal bölgeye bakacak şekilde döner.

Spermiyogenezin son aşaması olan çekirdek yoğunlaşması ve somatik histonların arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirmesidir.Sperm genomik DNA'sını stabilize etmek ve korumak için bu yer değişimi önem taşımaktadır.Spermiler seminifer lümeninden depolanıp hareket kazanacağı epididimise taşınırlar.Burada 20 gün kadar tutulurlar.Vas deferans yoluyla da üretraya ulaşırlar.Spermiler üretradan dışarı atılırlar.Spermatogonyumdan olgun sperme dönüşebilmesi için gerekli olan süre 64 gündür.Spermatogonez sırasında oluşan bütün spermiler eşit büyüklükte dirler.Eşit miktarda genetik materyal ve sitoplazma içerirler (Çelik, 2011).

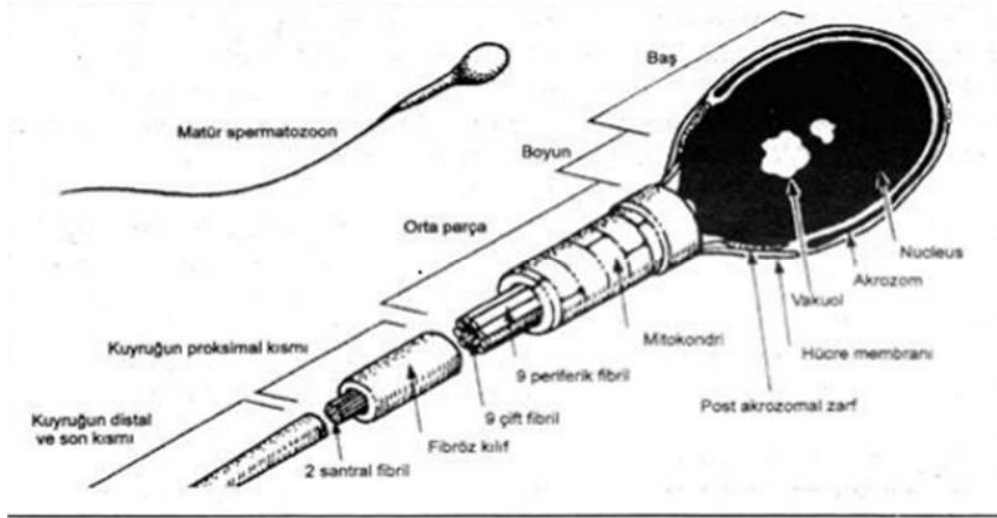


Şekil 3. Spermatogenezin Şematik Gösterimi (Derleme Androloji 2016)

4.2.2.Spermin Yapısı

Seminifer tübüller içindeki germinal epitelden insanda günde yaklaşık 200 milyonu geçen sperm hücreleri üretilir (NSchlegel, et al., 2007;Jonge and Barratt, 2006). Bu sayı türler arasında oldukça farklılıklar gösterebilmektedir.Sperm yaklaşık olarak 60-65 mikrometre uzunluğunda, sitoplazmalı ve hareket kabiliyeti olan çok özel bir yapıya sahiptir (Şekil 4).

Olgunlaşma evresi geçirmiş sperm, baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan meydana gelmiştir.



Şekil 4 . İnsan Spermatozoasının Işık ve Elektron Mikroskopik Şemaları

Kaynak: (Sönmez S, 2013)

4.2.2.1. Baş bölümü

Spermin baş kısmı iki akrozomal bölümden oluşmuştur. Akrozomal kısımda kendi içinde anterior akrozom ve posterior akrozom/ekvatoryel segment olmak üzere iki kısma ayrılmıştır (Gartner and Hiatt, 2006; Toshimori, 2009).

Spermin baş bölgesinde yer alan nükleus zarı sitoplazmanın ise büyük bir kısmı yer alır. Genetik materyal olan DNA katlanıp yoğun bir yapı oluşturmuştur. Spermatogenez süreci içerisinde genetik materyal histonlar, protaminlerle yer değiştirmiştir. Çekirdeğin ön tarafının yarısı akrozom ve enzimler bulunmaktadır. Sperm başı üç kısımdan oluşmaktadır.

- I) Kondanse çekirdek: DNA bu bölgede konumlanmıştır.
- II) Akrozomal kese: Akrozom enzimlerini içerir.
- III) Plazma membranı: Sperm reseptörleri bu kısımda yer alır.

4.2.2.2. Kuyruk Bölümü

Sperm kuyruğu hareketini sağlayan ve ATP açısından zengin kısımdır. En iç kısımda yer alan aksonem tüm kuyruk boyunca uzanım gösterir (Jonge and Barratt,

2006; Toshimori, 2009; Elder, 2010). Ana kısım da yerleşmiş bir çift tübül ve onun etrafını saran 9 çift mikrotübül vardır. Tübüllerin lateralinde kuyruğa sağlamlık ve elastikiyet kazandıran 9 adet yoğun dış fibriller bulunmaktadır.

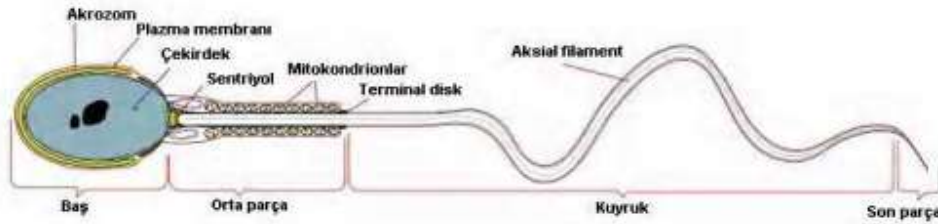
Sperm kısmı 4 ana parçadan oluşur.

1. Boyun Kısım: Spermin baş ve kuyruğu birbirine bağlayan bölgeye denir. Mitokondri ve bağlantı kısımları burada bulunur.

2. Orta bölüm: Orta kısımdan sonra gelir. Mitokondri kılıf içine yerleşmiş 90-100 adet mitokondri helikal yapıda aksonem dış kısmında konumlanmıştır.

3. Esas parça: Orta bölüm esas parçadan anulus ismi verilen yapı ile bölünür. En uzun bölüm ve fibröz bir kılıfla çevrilidir.

4. Son Parça: Kuyruğun en distal kısmında yer alan plasmalemma ile çevrili aksonem veya tübüller yapılardan ibarettir.



Şekil 5. İnsan Sperm Yapısı Şekli

Kaynak: Oğuz, 2013

4.2.3. Sperm kapasitasyon

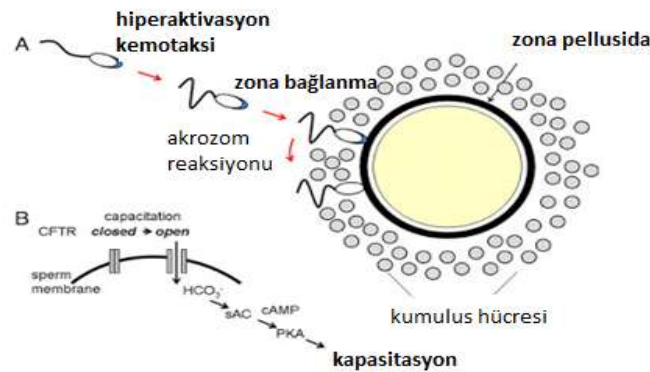
Spermilerin kadın genital sisteminde geçirdikleri biyokimyasal ve fonksiyonel değişimlere kapasitasyon adı verilir. Fertilizasyon ve kapasitasyon birbirleri için gereklidir. Sperm membranında hücreleri moleküler anlamda düzenleme iyon kanallarının aktivasyonuna ihtiyaç duyar. Ek olarak bu süreçte seminal vezikül ve epididime bağlı dekapasitan plazma proteinlerinin ayrılması da önemlidir (Elder and

Dale,2010;Çiçek,2008).Kapasitasyon aşamasında olan sperm fosfolipidlerinin, membranın iç ve dış bölgesindeki kısımları değişime uğrar. Kapasitasyon aşamasındaki sperm hücre zarı lipidleri tekrardan düzenlenir ve akrozomal gelişim için kolaylık sağlar (Nolon and Hammerstedt, 1997).Hücre zarında oluşan diğer değişiklik ise kolesterol-fosfolipid oranındaki düşüştür.Bu oran infertil ve fertil erkeklerde farklılık gösterir (Benoff, 1993).cAMP, protein tirozin fosforilasyonunu ve buna bağlı olarak kapasitasyona katkı sağlar.cAMP seviyesinide ki artış kapasitasyonu etkiler (Visconti, et al., 1995).

Sperm yüzeyindeki kolesterolün ayrılması kapasitasyon için gerekli olan aşağıda belirtilen olaylar dizinin ortaya koyar;

- 1-Hücre zarının bağlanma yeteneğinin ve akışkanlığını düzenler.
- 2-Sperm yüzeyindeki reseptörlerin işlevlerini açığa çıkarır.
- 3-pH ve seviyesinin artmasına ve HCO₂ girişinde rol oynar.
- 4- Ca⁺² artmasına bağlı olarak cAMP reaksiyonunu aktive eder.

Kapasitasyon süresi insanda 6 saate yakındır ve türler arası farklılık gösterir (Hardy, 2002).Kapasitasyon 37-39°C arasında işlev gösterir bu nedenle sıcaklık önemlidir (Elder and Dale, 2010).



Şekil 6. Sperm Kapasitasyon Şeması

Kaynak: <https://veterinerakademisi.blogspot.com/2018/01/spermatozoon-kapasitasyonu.html>

4.2.4.Fertilizasyon(Döllenme) Nedir?

Fertilizasyon birbirini izleyen süreçler zinciridir.Spermin korona radiata hücrelerine nüfuz etmesiyle başlar,oosit membranından geçtikten sonra kromozomların birbirine kaynaşmasıyla sona erer (Elder and Dale, 2010; Carlson, 2008).Fertilizasyonun gerçekleşmesi için dişi genital sistemde gelişen oosit ile erkek genital sisteminden gelen spermin ortak bir alana taşınması gerekir.Gametlerin taşınması; ampulla tuba uterinada yumurta ve sperm in birbirleriyle karşılaşmasına kadar geçen olayları kapsar.

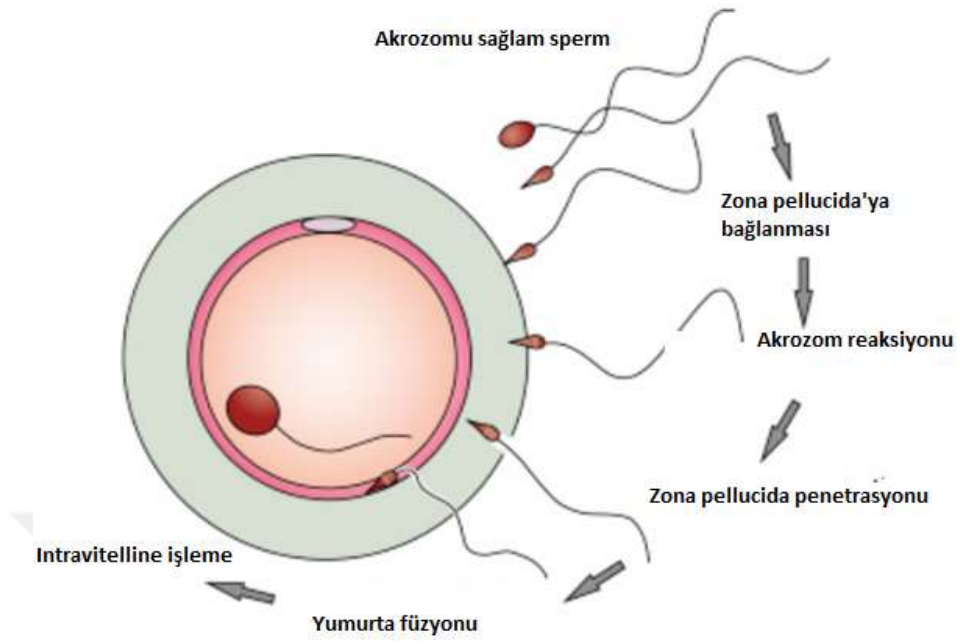
Testislerde ki seminifer tübüle aktarılan sperm epididimis kanalına girer ve burada dairesel harekete sahiptir.15 günlük bir olgunlaşma sürecine ulaştıktan sonra fertilizasyon için ileri hareket yeteneği kazanırlar.Ejaküle olan sperm dişi üreme kanalında kapasitasyon geçirdikten sonra tuba uterina da oosit döllenmesini geçirir (Çelik Ö, 2011).

Maturasyonunu tamamlamış olan sperm, oosit döllenmesi için hazır hale gelir.

Sperm akrozom içeriğini açığa çıkarır ve reaksiyonunu tamamlar.

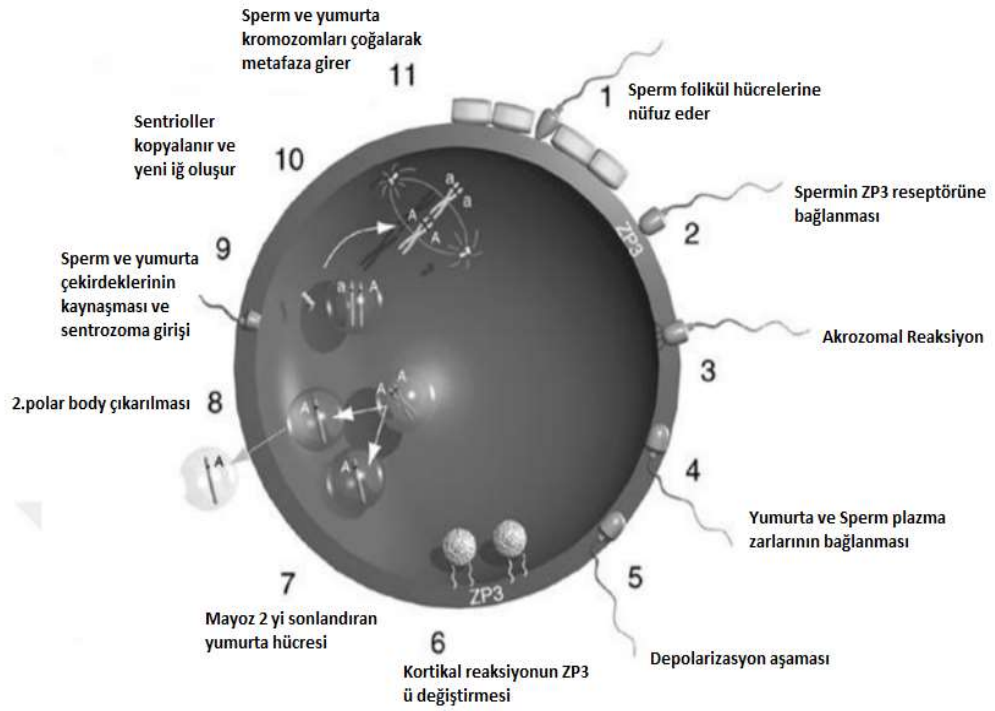
Spermin zona pellusidaya ulaşması ve ZP3 proteinine bağlanmasıyla reaksiyon gösterir ve bu şekilde artık zona pellusidaya bağlanma uygun hale gelir.

Sperm oositin plazma membranına yapışmasıyla kaynaşma gerçekleşir.



Şekil 7. Spermin Oosit Membranı İle Kaynaşması

Kaynak: Albert B and Johnson A: Hücre Biyolojisi (2008)



Şekil 8. Fertilizasyon Aşamaları

Kaynak:<http://docplayer.biz.tr/8227360-Fertilizasyon-yariklanmaveimplantasyon-bilaminar-disk-olusumu-prof-dr-murat-akkus.html>

4.3. Sperm İnceleme ve Hazırlama Yöntemleri

İnfertil çiftin değerlendirmesinde semen analizi en önemli aşamadır. Azoospermi dışında semen analizi, hastaların steril ve fertil gruplar şeklinde kesin ayrımının yapılması sağlamaz. Semen parametrelerinin kalitesi azaldıkça istatistiksel olarak gebelik şansıda azalma gösteriri ama sıfıra inmez. Doğru şekilde yapılmış semen analizi infertil erkeğin değerlendirmesinde önemli bir araçtır (Henkel., 2003).

Normal sperm parametreleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tanımlanmıştır (World Health Organisation, 1999). Sperm parametreleri normal sınırlar içerisinde olan erkekler de infertil olabilir.

Tablo 2. Semen Analizinin Referans Değerleri

Volüm	1.5-5.0 ml
likefaksiyon	5-15 dk
Viskozite	Akıcı
pH	7.2-8.0
Konsantrasyon	$>20 \times 10^6/\text{ml}$
İleri motilite	$>\%25$
İleri hızlı motilite (a+b)	$>\%50$
Normal morfoloji	$>\%14$ (WHO $>\%30$)

Kaynak: (WHO, 2010.)

4.3.1. Spermin Toplanması

Semen analizi sonuçlarının belli bir standartta olabilmesi için hastalara 72 saatlik cinsel perhiz önerilir. 15 günlük aralıklarla en az iki sperm örneği incelenmelidir. Hastanın başka bir hastalığı varsa öncelik o hastalığın tedavi edilip daha sonra 74 günlük bir spermatogenez geçirdikten sonra tekrarlanmalıdır.

4.3.2. Spermin fiziksel incelenmesi

Spermin muayenesi hemen likefaksiyondan sonra ya da 1 saat içerisinde yapılmalıdır.

Likefaksiyon: Ejekulat ilk çıktığında koagulum halinde olup, akıcı değildir. Akıcı özelliğin kazanmasına denir. Normal bir sperm örneği oda ısısında en çok 15 dakikada likefiye olmalıdır.

Viskozite: Semen akıcılığı anlamına gelir. Viskozite likefaksiyondan sonra olur.

Renk: Normalde homojen, opak görünümündedir.

Volüm: Normalde 2-5 ml olmalıdır.

pH: İndikatör kâğıtlar kullanılır. pH tayini 1 saat içerisinde yapılmalıdır. 7,2-8,0 arasında olmalıdır (Çelik Ö, 2011).

4.3.3. Spermin mikroskopik muayene ile incelenmesi

Likefiye semen analiz için bir miktar (1 damla) işleme alınır ve mikroskop altında incelenir. Analiz kısmında sperm konsantrasyonu, motilitesi, aglütinasyonu ve spermatozoa dışı (immatür germ hücreleri, lökositler, eritrositler, bakteri) hücreleri açısından değerlendirilir.

4.3.4. Motilite tayini

Sperm motilitesi tayin edilirken spermatozonun başı 5 µm dir. Spermatozoonlar bir saniyede 6 baş mesafesi kadar yol almışsa $6 \times 5 = 30 \mu\text{m}$ dir.

4.3.4.1. Total motilite hesaplama

Bu işlemin yapılması için TMS (Total motilite sayısı) göz önüne alınmalıdır.

4.4. Sperm canlılık testleri

4.4.1. Eozin Y testi: İmmotil spermatozoa sayısının %50 den fazla olması durumunda canlı spermatozoa sayısını ölçmek için yapılır.

4.4.2. HOS testi: Basit bir test olup, sağlam hücre membranının semi-permeabilitesi nedeniyle hipoozmolar bir ortama konulduğu zaman spermatozoanın içine su alarak şişmesi esasına dayanmaktadır. Normalde %50 'nin üzerinde spermatozoanın pozitif sonuç vermesi gerekir.

4.4.3. Spektrofotometrik yöntem

Sperm hücrelerinin absorbe ettiği ışık miktarının ölçülmesi ilkesine dayanır.

4.4.4. CASA Yöntemi

Bilgisayar-yardımlı görüntü analizi ile statik ve dinamik sperm görüntülerini tek tek ayırt ederek dijital ortama aktaran yarı otomatik bir tekniktir. Genellikle çok sayıda resim karelerinin alındığı video kullanılır ve alınan resimler peş peşe gösterildiğinde hareketli görüntüler yaratılmış olur.

4.5. Sperm Yıkama Teknikleri

4.5.1. SWIM- UP

Spermilerin hareketlilik faydalanıp, hücrelerin belli bir sıvıda seçim yapılmasıdır. Yıkama yapılan örnekler düşük derişimde dilue edilip steril tüplere alınır. Sperm süspansiyonu üzerine 1 ml sıvı konulur. Sıvıların karışmaması temel prensiptir. Örnek, yüzey alanına 45°C eğimle, 37°C’de 1 saat süreyle inkübasyon edilmelidir. Normozoospermik hastalarda ileri hareketli spermilerin temiz kültür sıvısının üst ¼’lük kısmında kalması beklenen bir bulgudur. Sperm hücreleri intrauterin inseminasyonda (IUI) ve (ICSI) yöntemlerinde de kullanılır. Bu yöntem aynı zamanda santrifüj sonrası pelleti kaldırılmadan, dikkatli şekilde üzerindeki sıvı sütununun eklenmesiyle de yapılır. Daha sonra santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılır, yerine dikkat ederek taze sperm medyumundan 0,5-1 mL kadar eklenir. Son olarak tüpün inkübasyonundan sonra aktif spermier içeren süpernatant steril tüpe aktarılır, işlem için beklemeye alınır (Özkavukçu ve Aras, 2017).

GRADİENT

Gradient yönteminde konik tüp içerisinde yoğunluk farkı bulunan sıvılar oluşturulmuş bir yüzey üzerine yayılır. Birden fazla katman oluşturulan yöntem devamsız

gradient santrifügasyon denir.Katmanların yoğunluk farkı ticari şekilde bulunan kültür sıvılarının derişimlerinin farkıyla sağlanır.Hücrelerin yoğunluk farkına karşı gösterdikleri dirençlerle ortaya çıkar.

Normozoospermiler ve ileri harekete sahip sperm örnekleri, sitoplazma farkından dolayı yoğunluğu aşarak dip kısımda toplanır.Kaliteli sperm en dip kısımda ve en yoğun katmanda birikir.

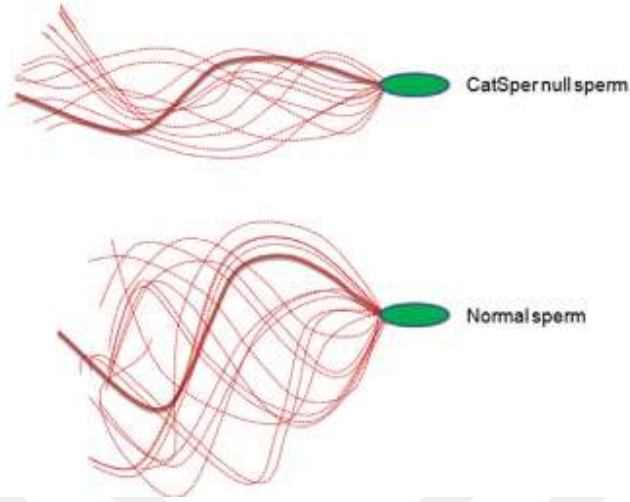
Yoğunluk farkı yöntemi olan gradient ile yapılan yıkama sonrası elde edilen sperm sağlıklı bireyler açısından fertilizasyon ve gebelik şansını artırma da önemli role sahiptir (Özkavukçu ve Aras, 2017).

4.6. CatSper Proteini Yapısı ve Özellikleri

CatSper(kasyon kanalı),kalsiyum iyonlarının hücre içine girişini kontrol eden ve sperm hiperaktivasyonunu düzenleyen aynı zamanda sperme özgü, zayıf voltajlı, pH'a duyarlı bir kanaldır (Singh and Rajender, 2015).

Ca^{+2} salınımla sperm aktif hale geçer ve oositin dış membranını eritebilecek şekilde hiperaktif olur.CatSper spermin Ca^{+2} akışını sağlayarak aynı zamanda aktivasyon ve güç sağlar.Aynı zamanda hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır (Tamburrino,et al., 2014).

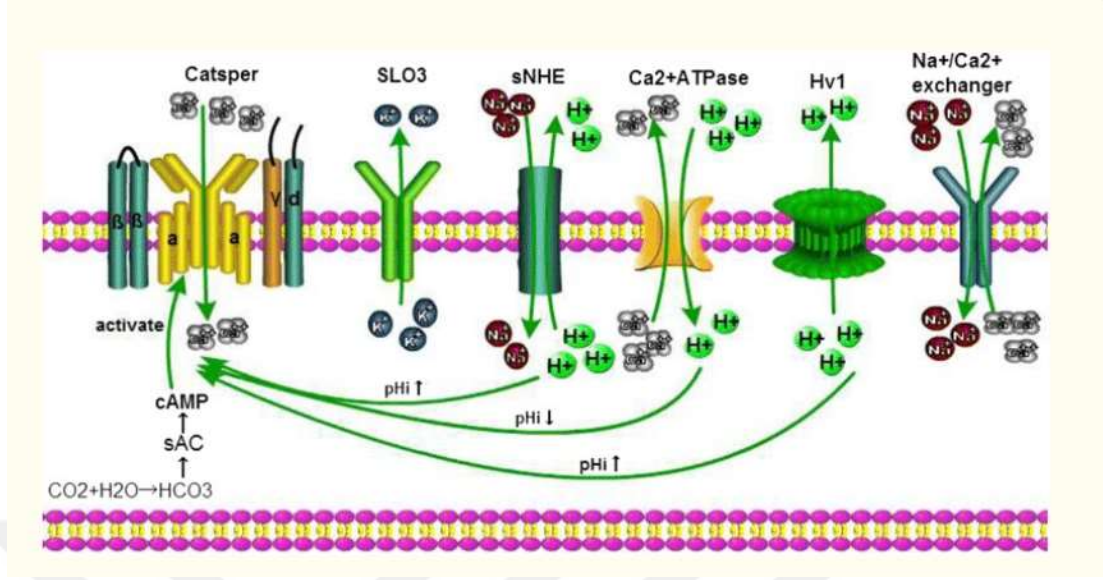
CatSper kanalı iyon ve pH düzenleme özelliği ile birlikte sperm hareketini arttıracak kalsiyum geçişini sağlar.Spermatozoanın döllenmek için dışı üreme kanalındaki engelleri aşmasını sağlar (Singh, 2010).



Şekil 9. Hipermotilite: Normal Sperm ve CatSper Sperm

Kaynak: Singh, 2010.

CatSper proteininin yapısı 4 alt birimden oluşacak şekilde heterotetramerik yapıya sahiptir. Bu alt birimler; CatSper1–4'ten oluşan α (alfa) ile CatSper β (beta), CatSper γ (gamma) ve CatSper δ (delta) yardımcı alt ünitelerinden meydana gelmektedir. Farelerde yapılan bir deneyde α alt ünitelerin kaybı infertiliteye neden olmaktadır (Bhilawadikar, et al., 2013). CatSper kanalı sperm flagellasının kamçı kısmında bulunur. CatSper1 alt ünitesi ilk bulunan alt ünite ve erkek infertilitesi için çok önemlidir. Aynı zamanda bu kanal sperm kamçısının üst kısmında bulunur ve sadece testislerde ekspre edilir. CatSper1,3,4 spermatid hücrelerinde bulunurken CatSper2 ise pakiten spermatositte itibaren ifade edilir (Jin, et al., 2007). CatSper1'e sahip olmayan sperm plazma membranlarında CatSper3, CatSper4, CatSper β , CatSper γ ve CatSper δ bulunmamaktadır. Bu durum α alt üniteleri ile yardımcı alt ünitelerinin koordineli bir şekilde çalıştıklarını göstermektedir. Bu alt birimlerin her biri CatSper fonksiyonlarını denetler ve pH duyarlılığı, fonksiyonel koordinasyon, kuyruk lokalizasyonu, progesteron ve hücre içi sinyal moleküllerine ihtiyaç duymaktadır (Darszon, et al., 2011 ;Nikpoor, et al., 2004).

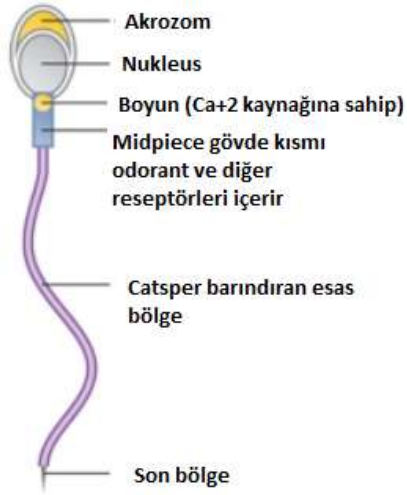


Şekil 10. CatSperKanalının Fonksiyon ve Regülasyonu

Kaynak: Xiang- hong Sun, 2017.

4.6.1. CatSper ekspresyon ve lokalizasyon

CatSper erişkin testisinde maksimum seviyeye ulaşır ve eksprese edilir. İnsan sperminin yanı sıra farede de bulunmaktadır. CatSper kanalı yalnızca testiste ifade edilir ve sperm kuyruğunun ana parçasına tam olarak yerleştirilir. CatSper1, CatSper3 ve CatSper4 transkriptleri geç dönem germ hattı hücreleri (spermatitler) ile sınırlıdır, oysa CatSper2, spermatogenezin erken aşamasında (pakiten spermatosit) kopyalanmaktadır. CatSper β , CatSper γ ve CatSper δ , testislerin sperm ve spermatitlerin de ifade edilir ve kesinlikle ana parçasına yerleştirilir (Singh and Rajender, 2015).

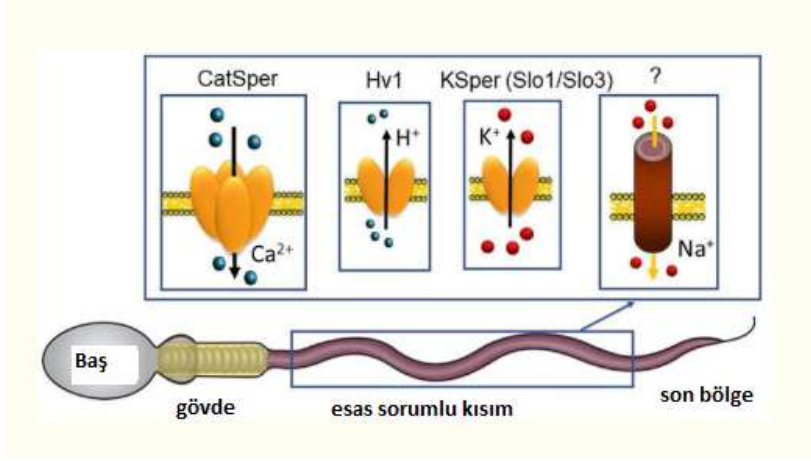


Şekil 11. Sperm CatSper Lokalizasyonu

Kaynak: Barratt., 2012.

4.7. CatSper Düzenlenmesi

Sperm kuyruğunda Ca^{+2} için transport sistem vardır. Bunlardan birisi spermatozoon içine ekstrasellüler Ca^{+2} girişi sağlayan CatSper kanalıdır. Hücre içi pH CatSper kanalı ile düzenlenir (Brenker, et al., 2012). Döllenme için gerekli sperm hiperaktivasyonu sırasında Ca^{+2} konsantrasyonu da artış gösterir. Bu da oosite entegre olması için gereklidir (Rehfeld, et al., 2019). Ca^{+2} bu sayede kanal protein görevi yapar. CatSper sperme Ca^{+2} pompalayarak kamçı bölgesine ulaşmasını sağlar.



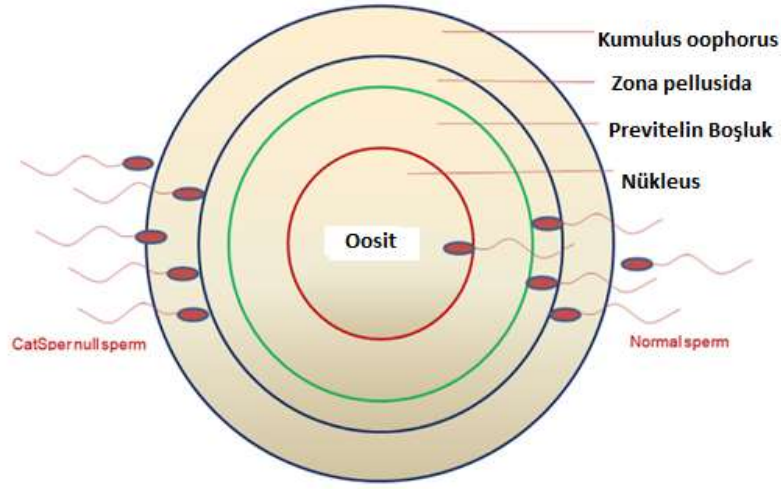
Şekil 12. İnsan sperm flagellumunun iyon kanalları

Kaynak : Lishko. PV, 2018

Progesteron spermilere özgü Ca^{+2} kanalını genomik olmayan bir mekanizma ile uyarır. Sperm diğer sıvılarla birlikte penisten dışarı çıkar. Prostat spesifik antijeni ise oosite ulaştığında bu enzimler serbest kalır ve o esnada ovaryum tarafından progesteron serbest bırakılır. Yumurta çevresindeki (kumulus hücreleri) hücreler spermin Ca^{+2} akışını artırır. Sperm hiperaktivasyonu başlar ve akrozom reaksiyonunu aktif hale getirir (Correia, et al., 2015). Progesteron ve prostaglandinler CatSper'in doğrudan aktive edilmesiyle Ca^{+2} akışını uyarır (Brenker, et al., 2012). Progesteron, uterin tüplerdeki kümülüs oosit kompleksi tarafından salınır ve ortaya çıkan etki ile ABDH2 aktive olur ve 2AG'yi parçalamasıyla CatSper kanalı hücre içerisinde serbest kalarak Ca^{+2} salınımını başlatır (Strunker, et al., 2011). Ca^{+2} salınımıyla sperm aktif hale geçer ve oositin dış membranını eritebilecek şekilde hiperaktif olur. Sperm kalitesi ve sağlıklı fertilizasyon için gereklidir (Tamburrino, et al., 2015).

Hv1; Membrandaki hidrojen geçişinin denetlemede görevlidir. Spermin ana bölgesinde bulunur ve pH düzenleme görevine sahiptir (Keshtgar, et al., 2018).

KSper/SLO3; pH a duyarlı kapasitasyon döngüsünde görev alan ve CatSperin Ca^{+2} taşımaya yardımcı olan bir kanaldır (Schreiber M., 1998).



Şekil 13. CatSperin Fonksiyonel Önemi

Kaynak: Singh, 2015.

4.8.CatSper ve Fertilizasyonun Önemi

CatSper sperme özgü Ca^{+2} yüklü bir voltaj kanalıdır.Sperm kapasitasyonu ve sağlıklı bireyler meydana gelmesi açısından önemlidir.Spermin dalgalanma hareketi ve aktif hareketleri hiperaktif olmuş sperm örneğinde görülmektedir.CatSper ileri hareket ile ilişkilidir (Tamburrino, et al., 2015).

CatSper spermi hiperaktif ederek yumurta penetrasyonunu doğrudan etkiler.CatSper genleri,erkek kısırlığından tarama için potansiyel hedeftir.Bazı idiyopatik (açıklanamayan) kısırlık nedenlerini açıklar.Ayrıca CatSper alt birimlerinden herhangi birinin bozulması infertiliteye neden olur (Zheng, et al., 2013). Araştırmalar, CatSper(1-4) alt ünitesinin de sperm hiperaktivize motilite ve erkek fertilesinin ayrılmaz bir parçası olduğunu göstermiştir, ancak CatSper3 veya CatSper4'ün eksikliği spermatogenezi veya spermin başlangıç hareketliliğini etkilememiştir (Qi, et al., 2007).

CatSper'in eşsiz yapısı, sınırlı ifade kalıpları ve fizyolojik fonksiyonları göz önüne alındığında; CatSper ve yardımcı alt üniteleri, hareketlilik ile ilgili infertiliteyi tedavi etme de görev yapma potansiyeline sahiptir.

5.GEREÇ VE YÖNTEM

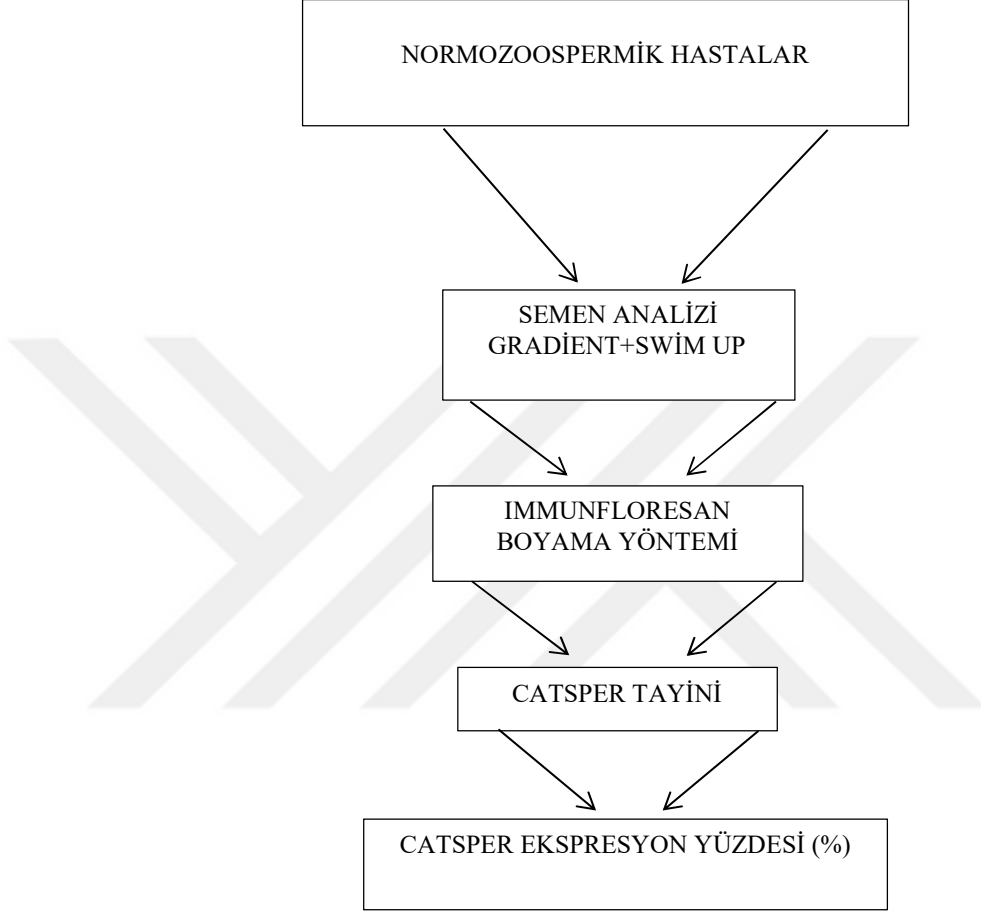
5.1. Hasta Seçimi

ÜYTE Merkezimize başvuran, normozoospermi (n:50) hasta çalışmaya dâhil edildi.

Erkeklerin 18 yaş ve üzeri normal semen parametrelerine sahip olması (normozoospermi) çalışmaya dâhil olma kriteridir.Bunun dışındaki spermiyogram anomalileri, kronik hastalıklar ve üreme sistemiyle ilgili patolojilere sahip hastalar da çalışma dışı bırakıldı.Tanı ve tedavileri için yeterli semen miktarı bulunmayan (<1,5 mL) hastalar çalışmaya dâhil edilmedi.Çalışmayı kabul eden ve 3-5 günlük cinsel perhiz süresine uygun olan erkeklerden semen analizi yapılmış olup DSÖ kriterlerine uygunluk göz önünde bulundurulmuştur.

Çalışmamız Ankara Üniversitesi İlaç Dışı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan kurul onayı alınmış ve çalışmayı kabul eden her hastadan 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu' alınmıştır.

5.2.Çalışma Şeması



5.3. Semen Analizi

-Taze semen örneklerinin likefaksiyonunu takiben semen, gradiyent santrifügasyon yöntemi için iki farklı özgül ağırlıktaki gradiyent medyumlarının santrifüj tüpüne sütun şeklinde üst üste konulmasından sonra, en üst tabaka olarak yayıldı ve 1600 g'de 8 dakika santrifüj edildi.

-Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pellet üzerine 1 ml kadar sperm yıkama medyumunu konulup resüspanse edilecek ve 1600 g'de 8 dakika santrifüj edilerek yıkandı.

-Daha sonra süpernatant kısmı alınıp pellet hareket ettirilmeden taze sperm yıkama solüsyonundan 1 ml eklenerek 30 dak. 37 °C'de inkübe edildi ve swim-up ile hareketli spermeler elde edildi

5.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

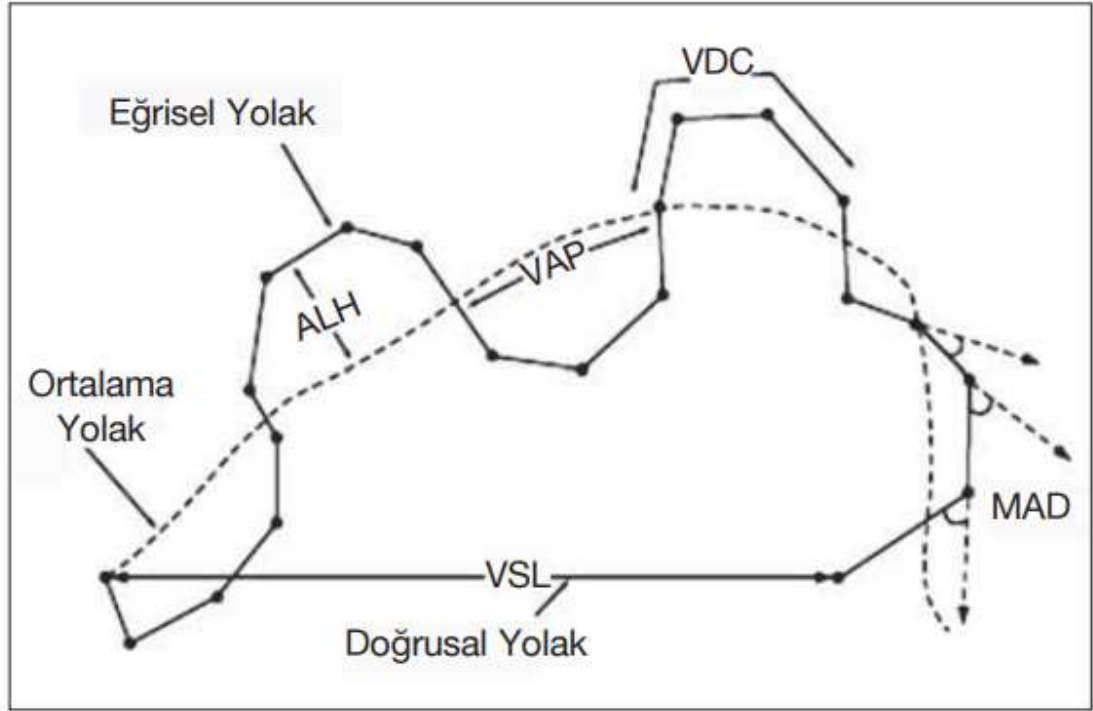
5.4.1. CatSper proteini için CASA yöntemi

-Deney gruplarında sperm hücrelerinin konsantrasyonu ve motilite karakteristiğinin belirlenmesi için CASA (Bilgisayar Destekli Sperm Analizi) cihazı kullanıldı.

CASA ile sperm motilite ölçümü yapılırken değerlendirilen bazı parametreler şunlardır (Şekil 14).

1. VCL: Eğrisel Hız ($\mu\text{m/s}$). Sperm başının ilerlerken katettiği 2-boyutlu gerçek eğrisel yoldaki hızı. Hücre canlılığının bir göstergesidir.
2. VSL: Doğrusal Hız ($\mu\text{m/s}$). Sperm başının tespit edilen ilk noktadan son noktaya gidene kadar olan hızı.
3. VAP: Ortalama yol hızı ($\mu\text{m/s}$). Sperm başının ortalama yolaktaki hızı. Bu yolak eğrisel yolun CASA cihazlarındaki algoritmalara göre düzeltilmesi ile hesaplanır. Bu algoritmalar cihazlar arasında farklılık gösterebileceği için VAP farklı CASA sistemleri arasında mukayese edilebilir bir ölçüt değildir.
4. ALH: Sperm başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklık (μm).
5. LIN: Doğrusallık. Eğrisel yolların doğrusallığı, VSL/ VCL.
6. WOB: kararsızlık. Gerçek yolda ilerlerken izlenen dalgalanmanın ölçüsü, VAP/VCL.

7. STR: Doğrusallık. Ortalama yolun doğrusallığı, VSL/ VAP.
8. BCF: Çapraz geçiş frekans ritmi (Hz). Eğrisel yolağın ortalama yolaktan geçme frekansı.
9. MAD: Ortalama açısal hareket (derece). Sperm başının anlık dönüşleri sırasında yaptığı açısal değişikliğin ortalaması



Şekil 14. CASA ile ölçülen semenin motilite parametreleri için standart terminoloji

Kaynak: WHO, 2010

5.4.2. CatSper proteini için immün floresan boyama prosedürü

-Yıkama işlemi yapılmış sperm örneği Poly L Lizin İle kaplanmış lama alınmak üzere hazırlandı.

-Pol L Lizinli Lam üzerine pap pen(doku sınırlandırıcı kalem) ile negatif ve pozitif olmak üzere iki drop çizildi.

- Dropların içerisinde PBS- Sükroz eklendi ve hasta örneğinden 2ul ilave edildi.Bir gece +4°C de dinlenmeye bırakıldı.Bu sayede spermilerin çöktürülmesi sağlandı

- Ertesi gün PBS- Sükroz arındırılmak üzere PBS İle 3 kez yıkama yapıldı.

- %3'lük PFA ile fiksasyon başlatıldı. Tekrar PBS ile 3 kez yıkama yapıldı.
- Daha sonra Triton X -100 İle permeabilize edildi. PBS ile 3 kez yıkama yapıldı.
- Bloklama işlemi yapılmak üzere alınan örnekler 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Ardından yıkama yapılmadı.
- Direkt Primer Antikor(1:100) Catsper B Polyclonal antibody(Bioss-USA Katologno: Bs-13607R) dilüsyon yapılarak 20 uL pozitif droba eklendi.
- Negatif drop ise PBS koyularak 1 Gece +4°C dinlenmeye bırakıldı.
- 3.gün sonunda Primer Antikor PBS İle 3 kez yıkandı. Her iki droba 20 uL Sekonder Antikor Fluorescein FITCH-Affini puregoat Anti-Rabbit (H+L)(Jackson Immuno research katologno: 111-095-003) eklenerek etüvde 37°C de 1 saat bekletildi.
- Örneklere yıkama yapıldıktan sonra mm with Hoechst kapama medyumunu ile kapatıldı.
- Daha sonra hücreler floresan mikroskopta 100x büyütmede değerlendirildi ve rastgele 100 hücre sayılarak CatSper ekspresyonu oranı tespit edildi.

5.5. İstatistik Yöntemler

Bu çalışmada Normozoospermi hasta korelasyonunda Pearson korelasyon testi kullanılmıştır.

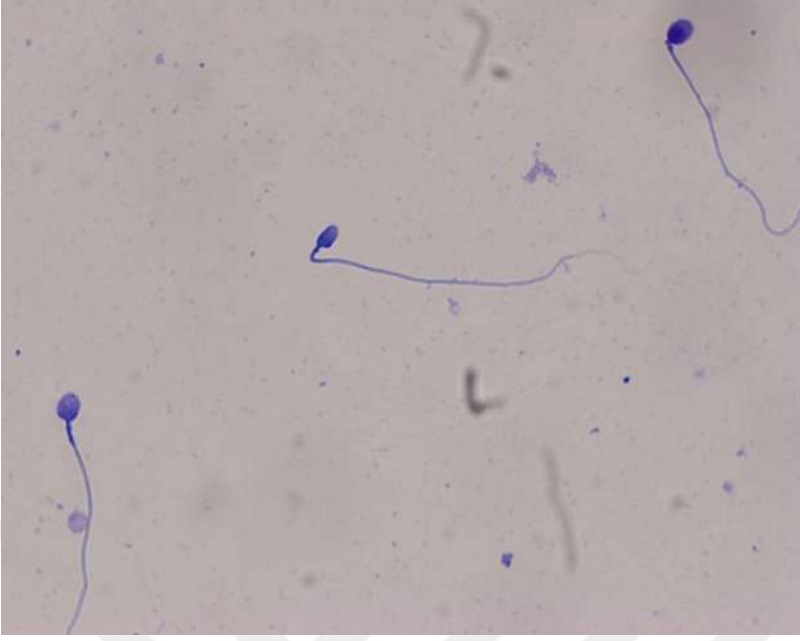
6.BULGULAR

Bu prospektif kontrollü çalışmada, Aralık 2018 ve Ağustos 2019 tarihleri arasında ‘Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi ÜYTE merkezine başvuran hastalardan çalışma kriterlerine uyan kontrol grubu normospermik (n:50), tanısı olan toplam 50 hastadan sperm örnekleri alınarak CatSper proteini immün floresan boyama yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

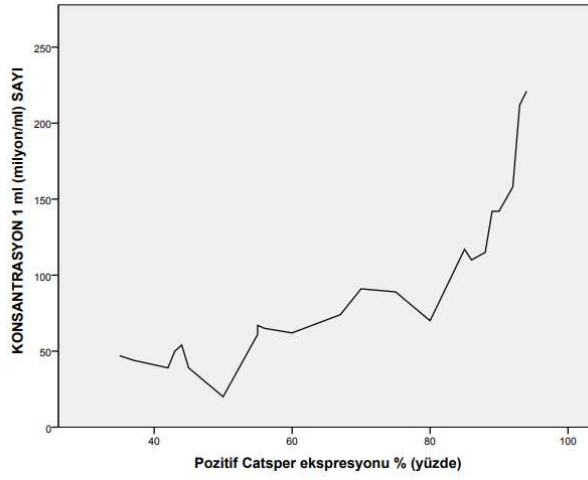
Normozosperm morfolojisine sahip semen örneklerinde CatSper proteini orta parçada ve kuyruk bölgesinde bulunmuştur.İmmün floresan boyama tekniğiyle boyanan semen örneklerinde CatSper proteini orta parçada görülmüştür.Kuyruk kısmında ise nokta şeklinde rastlanmıştır.



Şekil 15. Sperm morfoloji değerlendirmesi Normozoospermi örneğinin gösterilmesi (100x immersiyon objektif ışık mikroskobu görüntüsü)

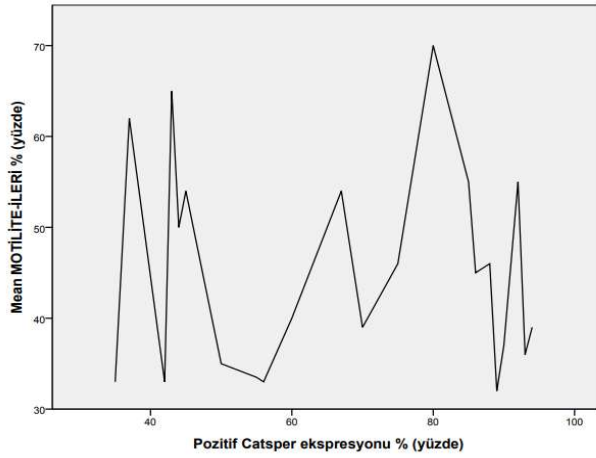


Şekil 16. Sperm morfoloji değ erlendirmesi Normozoospermi örneğinin gösterilmesi (100x immersiyon objektif    k mikroskobu g r nt   )



Şekil 17. Normozospermik olgularda konsantrasyon ile CatSperin Ekspresyon % korelasyon sonuçları

CatSper ekspresyon yüzdesi ile sperm parametreleri arasındaki ilişki (Pearson korelasyon testi) ($p < 0,05$ istatistiksel anlamlı)



Şekil 18. Normozospermik olgularda motilitenin Catsperin Ekspresyon % korelasyon sonuçları

CatSper ekspresyon yüzdesi ile sperm parametreleri arasındaki ilişki (Pearson korelasyon testi) ($p < 0,05$ istatistiksel anlamlı)

P değeri Yorumu

$p < 0.05$ İstatistiksel anlamlılık *

$p < 0.01$ Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık **

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

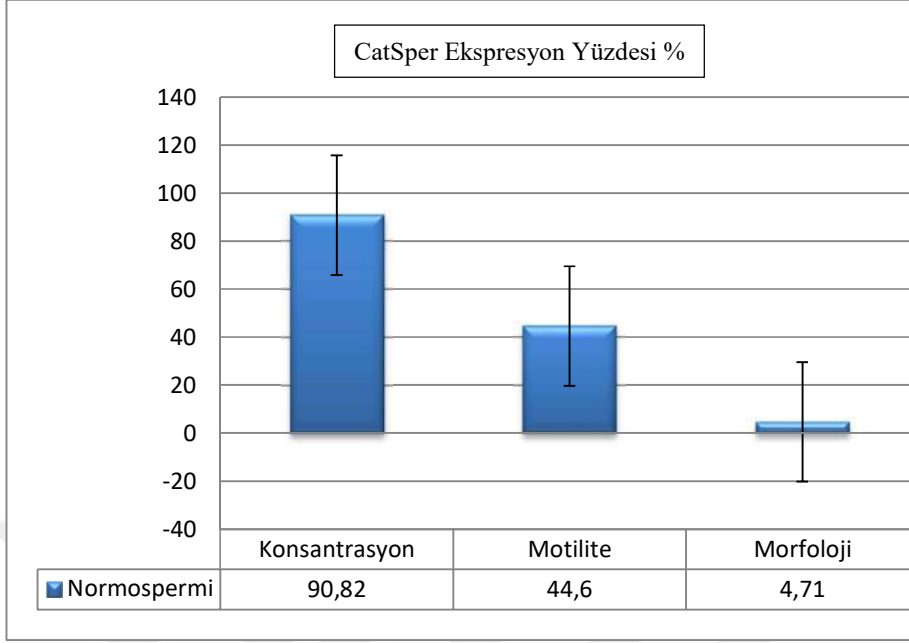
$0.05 \leq p < 0.10$ Anlamlılık eğilimi (sınırdan anlamlılık)

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

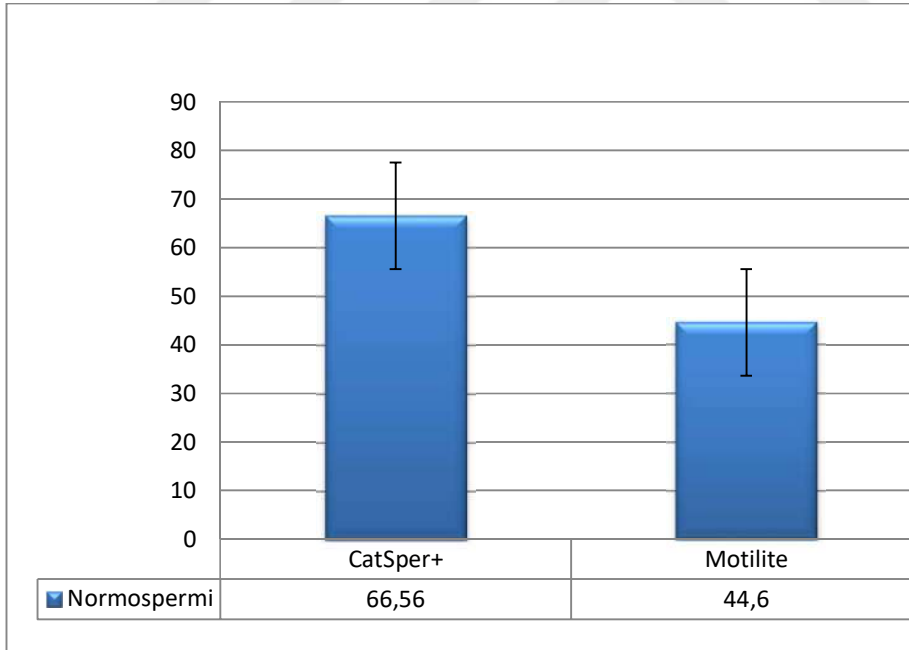
Tablo 3. Normospermik olgularda konsantrasyon, motilite, normal morfoloji istatistik sonuçları.

	$X \pm SD$	r	p
Konsantrasyon (mil/ml)	$90,8261 \pm 54,0266$	,864	,000
Motilite (%)	$66,5652 \pm 20,5511$	,371	,082
Normal Morfoloji (%)	$4,7391 \pm 0,8643$	,403	,050

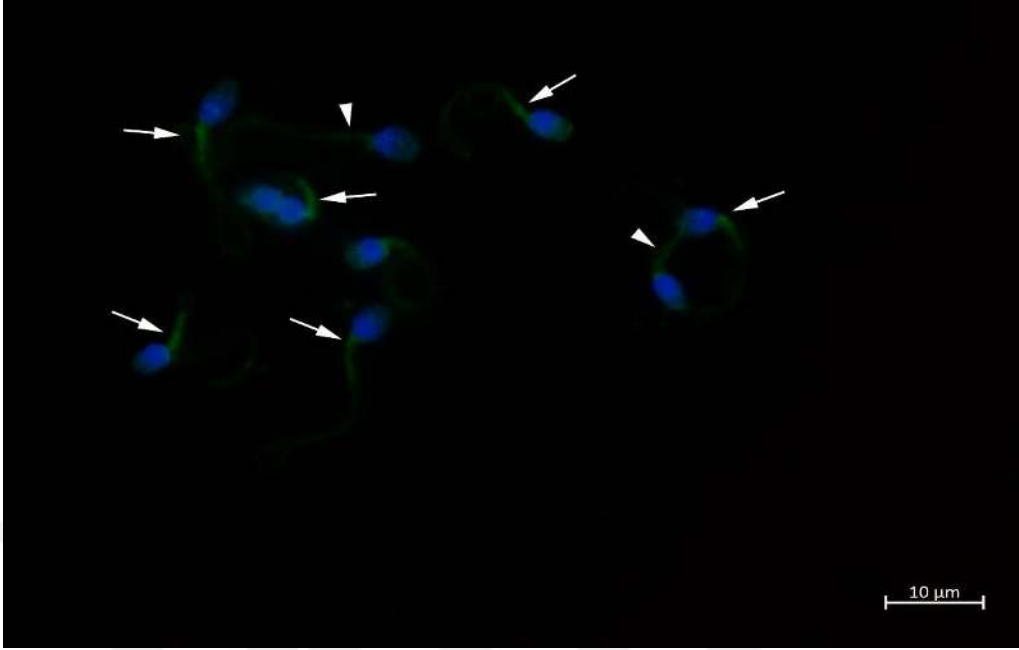
Normal semen örneklerinde CatSper pozitifliği ile sperm konsantrasyonu ve normal sperm morfolojisi oranı arasında ilişki saptandı. Sperm motilitesi ilişkisi ise istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır ($p < 0,05$). Veriler ortalama $\pm$ SD (Standart sapma) olarak gösterilmiştir.



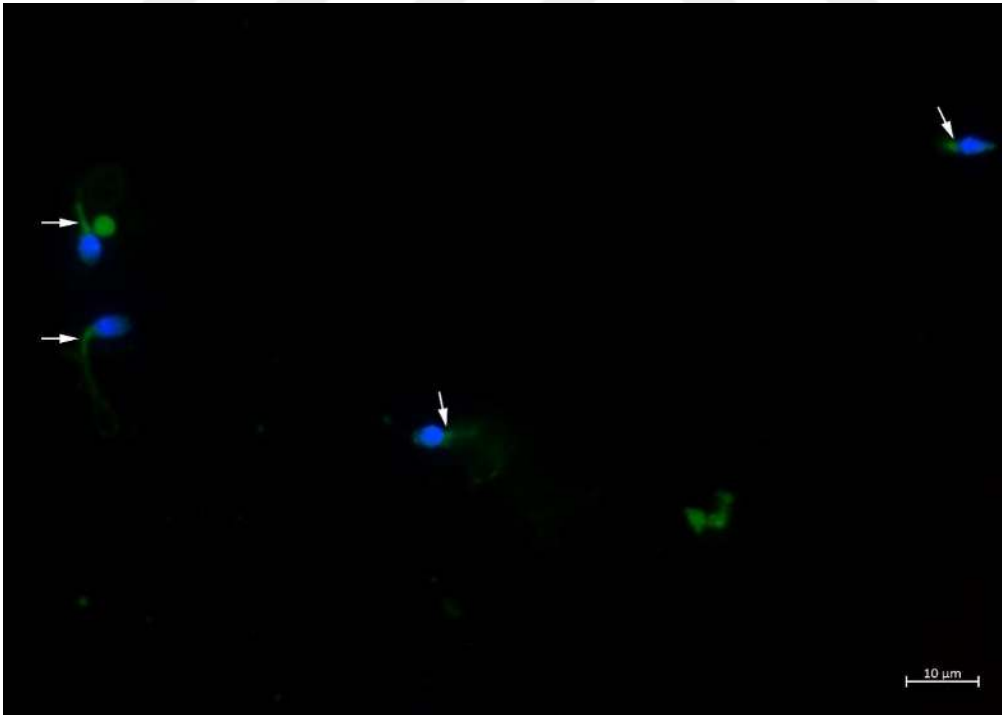
Şekil 19. Normozoospermi hastlarda konsantrasyon-motilite ve morfolojinin istatistiksel analizi



Şekil 20. Normozoospermik olgularda CatSper ve progresif motilite tayini



Şekil 21. Spermde bulunan pozitif ve negatif CatSper ekspresyonu (100X floresan mikroskobu görüntüsü,beyaz ok pozitif CatSper'i göstermektedir,ok başı negatif CatSper'i göstermektedir) Bar: 10 μ m



Şekil 22. Spermde bulunan Pozitif CatSper ekspresyonu (100X floresan mikroskobu görüntüsü,beyaz ok pozitif CatSper'i göstermektedir) Bar: 10 μ m

7.TARTIŞMA

CatSper kanalı, spermatozoa'ya Ca^{+2} akışını kontrol ederek erkek fertilitesinde kritik bir rol oynar.Birçok çalışma, CatSper kanalının protein ve hormona dayalı düzenleyici mekanizmasını ortaya çıkardı.Bu nedenle çalışmamızı bu yönde araştırdık.

Şimdiye kadar, çeşitli Ca^{+2} kanalları bulunmuş ve bu kanallar yüksek voltaj kapılı (Ca^{+2} kanalı (Cav), siklik nükleotit kapılı Ca^{+2} kanalı (CNG) ve TRP kanalı) spermin farklı alt bölgelerine dağıtılmış halde olduğu gözlenmiştir.Çeşitli kanıtlar N tipi, R tipi ve T tipi voltaj kapılı Ca^{+2} kanalı olduğunu gösterir (Singh, 2010)

CatSper kanalı, yalnızca testislerde eksprese edilen bir Ca^{+2} kanalıdır,bu nedenle CatSper'in, benzersiz özelliklerine ve düzenlemesine katkıda bulunan faktörlere veya protein-protein etkileşimlerine sahip olabileceğini tahmin ediyoruz.

Sadece CatSper kanalı, sperm hiperaktivasyon, sperm kapasitasyonu, yumurtaya karşı kemotaksis ve akrozom reaksiyonunun fizyolojik süreçlerini doğrudan modüle eder (Singh, 2015).pH duyarlı bir iyon kanalı olmasından dolayı bazı iyon kanalları ya da enzimler örneğin (sNHE, CA ve HCO_3^- taşıyıcı) H konsantrasyonunun değiştirilmesiyle sperm pH değerini pozitif yönde değiştirir.Tüm bu biyolojik moleküllerin CatSper kanalının açılma derecesini etkilediğini biliyoruz, ancak hepsinin CatSper kanalı için gerekli olduğunu biliyor muyuz? Bunlardan biri mutasyona uğramış veya silinmişse, CatSper kanalı normal şekilde çalışmaya devam edebilir mi? Bu biyolojik moleküllerin birbirleriyle nasıl etkileşime girdiği çok açık değildir.CatSper kanallarının fare sperm doğurganlığındaki temel rolü açıkça gösterilmiştir (Ren, et al., 2001;Shukla, et al., 2012).CatSper'i oluşturan proteinleri kodlayan genlerin herhangi birinin nakavt edilmesi, olgun spermde kanalın ekspresyonu eksikliğini ve hiperaktivasyonlu motiliteye ulaşma yeteneğini belirler (Carlson, et al., 2005 ; Qi et al.,2007).Genel olarak, CatSper genlerinin ve proteinlerin düzenlenmesinin, olgun spermelerde fonksiyonel kanalın farklı ekspresyon seviyelerine ve bunun sonucunda hareketlilik değişikliklerine yol açan spermatogenez sırasında meydana gelebileceğini göstermektedir.

CatSper kanalı boyunca Ca^{+2} akışını başka hangi elementlerin arttırabileceğinin ortaya konması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. İnsan spermatazoasını kalsiyum açısından beslediği ve aynı zamanda fertilite açısından yeni bir parametre oluşturabileceği ortaya konulmuştur. Buna rağmen, CatSper agonistleriyle ilgili çalışmalar hala çok nadirdir. Ek olarak, erkek kısırlığını tedavi eden CatSper hedefli ilaçları araştırmak için CatSper kanalının mekanizmasını incelemek gerekir (Zou, et al., 2017). CatSper promoter sekansına etki eden daha spesifik bir proteinin varlığı, gelecekteki çalışmalar için önemli bir alan olabilir.

CatSper kanal bozukluklarına sahip spermilere alternatif çalışmalar yapılmalıdır. Mohammadi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Gama ışınına maruz kalan sperm kanallarında kalsiyum düşüşü olduğunu gözlemlemiştir (Mohammadi, et al., 2019). Yapılan çalışmalarda CatSper ekspresyonları sperm kamçısında gösterilirken, bu çalışmada ise spermin orta parça bölgesinde CatSper ekspresyonunu gösterdik. Avenarius ve arkadaşları CatSper δ bulunmayan farelerde CatSper1 in gerekli olduğu göstermiştir (Avenarius, et al., 2009). Catsper1 yoksun farelerde spermde düşük eğrilik, küçük genlik vardır. Carlson ve arkadaşları asimetrik ve titreşimli dalgalanma sperm kapasitasyonu ve fertilizasyon için gerekli olduğundan hiperaktif eksikliği kaynaklı infertilizasyona yol açtığını bulmuştur (Carlson, et al., 2003). Spermde yumurtaya yapışır fakat hiperaktif motilite eksikliği nedeniyle oosite penetre olmazlar. Bu çalışma sonrasında yapılacak çalışmalara hiperaktivasyon araştırılması için destek sağlamıştır.

CatSper ekspresyonunun ve fonksiyonunun konsantrasyon ile pozitif bir ilişki bulduk ve CatSper kanallarının üreme üzerine etkisini inceleyip hem erkek kısırlığının tedavisi için hem de kontraseptif amaçlar için yeni yollar açacağını gösterdik. Lischko ve arkadaşları erkek fare üzerinde yaptıkları çalışmalar da CatSper'in Protein işlevselliğini bozan CatSper gen mutasyonları sonucu ortaya çıkan anormal protein, spermin hareket yeteneğini yok ederek yumurtanın döllemesine engel olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda progresif motilite azlığı sonucu hastalardaki hiperaktivasyon eksikliğinde CatSper pozitif ekspresyonunu etkilemektedir. Çalışmamız da progresif motilite azlığı olan spermelerde daha az CatSper pozitif ekspresyonu olduğunu gözlemledik.

Tamburrino ve ark. yaptıkları çalışmada CatSper1 ekspresyonu ile, sperm konsantrasyonu ve toplam sperm sayısı arasında anlamlı bir korelasyon bulmuşlardır (Tamburrino, et al., 2014).

Erkek infertilitesinde rol oynayan CatSper konsantrasyon ve morfoloji açısından yapılacak yeni testler ile infertilitenin nedeni açıklama da yardımcı olabilecek moleküler bir mekanizmanın alt yapısını oluşturulabilir.



8.SONUÇ VE ÖNERİLER

Normozospermik olguların konsantrasyon, motilite ve morfolojisine bakıldı. Bu değerlendirme sonucu istatistik verilere dayanarak konsantrasyon anlamlı bir farklılık gösterdi.Sperm konsantrasyon değerleri yüksek olan hastalarda CatSper protein yüzdeleri anlamlı bir şekilde arttı.Sperm ileri motilitesi ile ilişki anlamlı bulunmamıştır.Elde ettiğimiz sonuç yaptığımız çalışmayı pozitif anlamda destekledi.Sperm parametrelerinden konsantrasyonun CatSper pozitif yüzdesi ile ilişkisi olduğu kanıtlandı.Çalışmamız CatSper proteininin erkek infertilitesine ve fertilizasyona katkısını öne çıkarmıştır.Erkek infertilitesi ve açıklanamayan infertilite açısından bir parametre oluşturarak fertilizasyona ve sağlıklı gebeliğe öncü olması açısından katkı sağlar.

9.KAYNAKÇA

- Aitken, J., Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16(4), 259-267.
- Avenarius, M. R., Hildebrand, M. S., Zhang, Y., Meyer, N. C., Smith, L. L., Kahrizi, K., ... & Smith, R. J. (2009). Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *The American Journal of Human Genetics*, 84(4), 505-510.
- Baerwald, A.R., Adams G.P., Pierson, A. (2012), Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update*. 18:73-91.
- Benoff, S. (1993), Preliminary to fertilization. The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. *Hum REPROD*. 8:2001-2008.
- Benon, M., Linet, T. (2005). Sperm hyperactivated motility: influence of the capacitation medium. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction*, 34(5), 488-492.
- Bensdorp, A., Cohlen, B.J., Heineman, M. J., Vanderkerchove, P. (2007). Intra-uterine insemination for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4).
- Bhilawadikar, R., Zaveri, K., Mukadam, L., Naik, S., Kamble, K., et al. (2013), Levels of tectin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate. *J Assist Reprod Genet*, 30(4), 513-23.
- Brehm, R., Steger, K. (2005). Regulation of Sertoli Cell and Germ Cell Differentiation. *Berlin Heidelberg: Springer Verlag*, 1-10.

- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krähling, M., ... & Strücker, T. (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *The EMBO journal*, 31(7), 1654-1665.
- Cantineau, A. E., Cohlen, B. J., Heineman, M. J., Marjoribanks, J., & Farquhar, C. (2013). Intrauterine insemination versus fallopian tube sperm perfusion for non-tubal infertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10).
- Carlson, B. M. (2008). *Human Embryology and Developmental Biology E-Book: WithStudentConsult Online Access*. ElsevierHealthSciences.
- CentersforDisease Control andPrevention, A.S.f.R.M., Society for Assisted Reproductive Technology. (2017), 2015 assistedre productive technology fertility clinic success rates report. Atlanta, GA, US Dept of Healthand Human Services.
- Correia, J., Michelangeli, F., Publicover, S. (2015). Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction*, 150(2), R65-R76.
- Çelik, Ö. (2011), *Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar İstanbul Nobel Kitabevleri*.
- Çiçek N. (2008). *Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., Trevino, C.L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*. 91:1305-55.
- De Jonge, C.J.,Barratt, C.L. R. (2006). *The Sperm Cell, Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press 2006:1-25.
- Elder, K.,Dale, B. (2010). *In-vitrofertilization*. Cambridge University Press.

Eşrefoğlu, M. (2009), Özel Histoloji. Malatya: Medipres Matbaacılık.

Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. Reproductive and Toxicology 2006 Aug;22(2):133-41. Epub 2006 Jun 27. PMID:16806807 doi:10.1016/j.reprotox.2006.04.016

Gartner, L. P., Hiatt, J.L. (2006). Color Text book of Histology. 3rd edition, Saunders Elsevieri 490-500.

Gianaroli, L., Racowsky, C., Geraedts, J., Cedars, M., Lobo, R. (2012). Best practices of ASRM and ESHRE: a journey through reproductive medicine. Fertil Steril, 98:1380-94.

Goldenberg, M., Rabinovici, J., Bider, D., Lunenfeld, B., Blankstein, J., Weissenberg, R. (1992). Intra-uterine insemination with prepared sperm vs. unprepared first split ejaculates. A randomized study. Andrologia, 24(3), 135-140.

Gupta, G.S. (2005). Proteomics of Spermatogenesis. Springer Science. Business Media, Inc, 3-13.

Hardy, D.M. (2002). Fertilization. USA: Academic Press.

Henkel RR, Schill WB(2003).Sperm preparation for ART .Reproductive biology and endocrinology. RB&E;1:108.

İşeri, Y., CatSper, F.B. (2016). Ү Genlerinin Crispr/cas9 ve Ayrık-egfp Sistemleri İçin Genom Değişirme Araçlarının Oluşturulması ve Doğrulanması. Fen Bilimleri Enstitüsü.

Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, et al. (2007), CatSper3 and CatSper4 are essential for sperm

- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., et al. (2012), European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *EurUrol*, 62(2), 324-32.
- Keshtgar, S., Ghanbari, H., Ghani, E., & Moosavi, S. M. S. (2018). Effect of CatSper and Hv1 Channel Inhibition on Progesterone Stimulated Human Sperm. *Journal of reproduction & infertility*, 19(3), 133.
- Kişnişçi, H., Gökşin, E., Durukan, T., Üstay, K., Ayhan, A., et al. (1996), Erkeğe bağlı infertilite, androloji. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Ed. Ankara: Güneş, 1287.
- Lishko, P.V. and Y. Kirichok, The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol*, 2010. 588(Pt 23): p. 4667-72.
- Mohammadi, S., Kianmehr, M., Mohammadi, M., Fahimian, Z., Karimimanesh, E., Farazifar, M., ... & Mansouri, A. (2019). Correlation between expression of CatSper1, 2 and sperm parameters in the gamma irradiated adult mouse testis. *International journal of radiation biology*, 95(6), 691-696.
- Nikpoor, P., Mowla, S.J., Movahedin, M., Ziaee, S.A., Tiraihi, T. (2004). CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. *Hum Reprod*, 19:124-8.
- Nolon, J.P., Hammerstedt, R.H. (1997). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J*, 11:670-682.
- N Schlegel, P., Phardy, M., Goldaterin, M. (2007). *Male Reproductive Physiology*. 9th edition, Saunders Elsevier, 581-600.
- Özkavukçu, S., Aras, D. (2017). IUI ve IVF İçin Sperm Hazırlama Yöntemleri.

- Parinaud, J., Le Lannou, D., Vieitez, G., Griveau, J. F., Milhet, P., Richoilley, G. (1997). Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Human Reproduction*, 12(11), 2434-2436.
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., ... & Clapham, D. E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1219-1223.
- Rehfeld, A., Egeberg, D., Almstrup, K., Juul, A., Skakkebaek, N. E. (2019). Medium-Throughput Screening Assays for Assessment of Effects on Ca²⁺-Signaling and Acrosome Reaction in Human Sperm.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., ... & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603.
- Sadler T.W. (2006). *Langman's Medical Embryology*. 10th edition. Lippincott Williams Wilkins, 25-28.
- Schreiber, M., et al., (1998) Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), p. 3509-3516.
- Shukla, K.K., Mahdi, A.A., Rajender, S. (2012), Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. *J Androl*, 33(5), 777-88.
- Singh, A.P., Rajender, S. (2015), CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online*, 30(1), 28-38.

- Strunker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, et al. (2011), The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature*, 471:382-6.
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Minetti, F., Forti, G., Muratori, M., Baldi, E. (2014). The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Hum Reprod.* 29:418-28.
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Vicini, E., Muciaccia, B., Cambi, M., Pellegrini, S., et al. (2015), Quantification of CatSper1 expression in human spermatozoa and relation to functional parameters. *Hum Reprod.* 30:1532-44.
- Toshimori, K. (2009). *Dynamics of the Mammalian Sperm Head*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1-17.
- Wennemuth, G., Westenbroek, R. E., Xu, T., Hille, B., & Babcock, D. F. (2000). $\text{Ca}_v2.2$ and $\text{Ca}_v2.3$ (N- and R-type) Ca^{2+} channels in depolarization-evoked entry of Ca^{2+} into mouse sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21210-21217.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129-1137.
- WHO. (1999). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Cambridge university press.
- WHO. (2010), *Who laboratory manual for the examination and processing of human semen*. (5.th edition).

Zheng, L. P., Wang, H. F., Li, B. M., & Zeng, X. H. (2013). Sperm-specific ion channels: targets holding the most potential for male contraceptives in development. *Contraception*, 88(4), 485-491.

Zou, Q. X., Peng, Z., Zhao, Q., Chen, H. Y., Cheng, Y. M., Liu, Q., ... & Zheng, L. P. (2017). Diethylstilbestrol activates CatSper and disturbs progesterone actions in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 32(2), 290-298.



10.EKLER

EK 1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın adı: Semendeki CatSper ekspresyon değerlerinin üremeye yardımcı tedavi sonuçlarıyla ilişkisinin incelenmesi

Araştırmanın kolay anlaşılır adı: SemendekiCatsper molekül sonuçlarının üremeye yardımcı tedavi sonuçlarıyla ilişkisini incelenmesi

Sorumlu Araştırmacı: Dr. Sinan Özkavukcu

Araştırmanın yürütüleceği yer: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi

Üremeye yardımcı tedaviler ve bununla ilgili tıp teknolojisi sürekli gelişmekte, yeni tedavi protokolleri kullanıma girmektedir.Semen(sperm) sıvısının içerisinde iyon kanalları bulunur ve bu kanallar semenin sağlıklı embriyo elde etmesi için spermi besler. Semen hareket kabiliyetine, üreme yeteneğine ve döllenmesine yardımcı olur.Bu çalışmamızda iyon kanal proteini olan Catsper'in spermin aktivesine olan etkisini incelemekteyiz.Catsper spermin kuyruk kısmında bulunur.Spermin hareket edebilmesi için kalsiyum iyonlarının sperm hücresine girişini kontrol eder.Kalsiyum açısından zenginleşen semen hareketlilik kazanarak yumurtaya daha kolay ulaşır.Amacımız henüz bir işlem görmemiş spermlerdeki Catsper miktarını tespit ederek daha sonra aynı örneklerden aşılama(IUI) yaptıktan sonra gebelik elde eden hastaları takip ederek, Catsper proteinin sonuçlarıyla karşılaştırıp üreme üzerine başarısını araştırmaktır. Bu çalışmada sizden aldığımız örneğin tedavinizi etkilemeyecek kadar küçük bir bölümü kullanılacaktır. Ayrılan bu örneklerde Catsper değerleri belirlenerek gebelik sonuçlarıyla ilişkisi incelenecek ve bu ayrılan sperm hücreleri kesinlikle başka bir amaçla kullanılmayacaktır. Deney kısmında semendeki Catsper kanal proteinini inceleyecek testler yapılacaktır. Bu testlerden sonra arda kalan hücreleriniz hemen imha edilecektir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı istiyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllölük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız. İmzalı formun bir örneği size verilecektir.

Araştırmaya davet edilmenizden nedeni erkeğe ya da kadına bağlı infertilite (kısırlık) tanısı ya da şüphesiyle Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tüp Bebek Merkezine başvurmuş olmanızdır. Bu çalışmada zaten tedaviniz sırasında gerekli olan ve sizden masturbasyon yoluyla alınan meni sıvısının içerisinde bulunan ve tedaviniz sonrası imha edilecek olan arta kalan yaklaşık 1 mL hacim içerisindeki sperm hücreleriniz çalışmaya dâhil edilerek ortaya çıkan olumlu ya da olumsuz etkiler çeşitli yöntemlerle yine Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tüp Bebek Merkezi Laboratuvarında analiz edilecektir. Daha sonra bu hücreler başka hiç bir amaçla kullanılmamak üzere imha edilecektir.

Araştırmaya dâhil olmanız durumunda herhangi bir zarar görmeyeceksiniz. Çalışmanın sonunda çıkan veriler eşliğinde verdiğiniz örneklerden elde edilen sonuçlar sizinle paylaşılabılır. Verdiğiniz örnekler sonucu ortaya çıkacak veriler ışığında kısırlık tedavisinde büyük bir yol katedilebilir ve tüp bebek tedavi yöntemleri iyileştirilebilir.

Bu araştırmaya en az 18 yaşındaki, normal sperm hücresi düzeylerine sahip 100 adet erkek hasta dâhil edilmektedir ve çalışmanın 12 ay sürmesi planlanmaktadır. Eęer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Doç. Dr. Sinan Özkavukcu veya Semra YAZICI tarafından sperm örneğiniz Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda alınacak ve testlere tabi tutulacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Araştırmanın bütçesi projelerden ve merkezimizin mevcut imkânları dâhilinde karşılanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide ya da bundan sonra kliniğimizde size karşı davranışlarımızda herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahip olduğunuz gibi, araştırıcı da sizi çalışma dışında bırakabilir. Eğer bu araştırmaya katılırsanız hekim ile aranızda kalması gereken size ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacaktır. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz ihtimamla korunacaktır.

Araştırma ile ilgili herhangi bir sorunuz olursa Dr. Sinan Özkavukcu'ya 05323524490 numaralı cep telefonundan ulaşabilirsiniz.

EK 2

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Semendeki CatSper Ekspresyon değerlerinin üremeye yardımcı tedavi sonuçlarıyla ilişkisinin incelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.İ.Sinan ÖZKAVUKÇU		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kadın Hastalıkları ve Doğum		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
		FAZ 4	☐	
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐	
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐	
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐	
		İlaç dışı klinik araştırma	☐	
	Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Araştırması			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒
				ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:



Funda BAYKAL KILIÇ
AÜTF-Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Araştırma Gözetmeni

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Semendeki CatSper Ekspresyon değerlerinin üremeye yardımcı tedavi sonuçlarıyla ilişkisinin incelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRMELERİ	☐		
	DİĞER:	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:85-298-18	Tarih:12 Mart 2018		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın yapılmasını gerektirir, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın yapılmasını başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Levent YAZICIOĞLU	Kalp ve Damar Cerrahisi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. İsmail İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Zariife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü. Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Derya GÖKMEN	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Ali Doğan DURSUN	Fizyoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
İffet BERKTAŞ	Matematik Mühendisliği	Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet MELLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Funda BAYKAL KÖR
AÜTF Klinik Araştırma Etik Kurulu
Asst. Prof. Dr.

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: SEMRA YAZICI

Doğum Tarihi ve Yeri :15/10/1991

Mail Adresi: ssemra53@gmail.com

Unvanı: Biyolog

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
Lisans	Uludağ Üniversitesi Biyoloji (İngilizce)	2015

SEMENDEKİ CATSPER EKSPRESYON DEĞERLERİNİN ÜREMeye YARDIMCI TEDAVİ SONUÇLARIYLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Yazar Semra Yazıcı

Gönderim Tarihi: 31-May-2019 03:53PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1138356553
Dosya adı: SEMRA_YAZICI_TEZ.docx (1.94M)
Kelime sayısı: 4744
Karakter sayısı: 34190

SEMENDEKİ CATSPER EKSPRESYON DEĞERLERİNİN ÜREMeye YARDIMCI TEDAVİ SONUÇLARIYLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 9	% 0	% 11
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to İstanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 6
2	www.uroturk.org.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
4	Submitted to TechKnowledge Öğrenci Ödevi	% 1
5	www.drsuathazer.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.kaanaydos.com.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	www.tjrms.org İnternet Kaynağı	% 1
8	www.dradilesen.com İnternet Kaynağı	<% 1

9	slideplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
10	Submitted to Mugla University Öğrenci Ödevi	<%1
11	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
13	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
14	Maria-Giuliana Vannucchi, Letizia Corsani, Maria-Grazia Giovannini, Maria-Simonetta Faussone-Pellegrini. "Expression of dystrophin in the mouse myenteric neurones", Neuroscience Letters, 2001 Yayın	<%1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

Kapat