

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNERTİL ERKEK HASTALARADA İYON KANAL
EKSPRESYONLARININ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Serkan ÇARKÇI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İrfan ORHAN**

**ELAZIĞ
2016**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murad ATMACA

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İrfan ORHAN

Üroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İrfan ORHAN

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum çok değerli hocalarım; Prof. Dr. İrfan ORHAN, Prof. Dr. A. Rahmi ONUR, Doç. Dr. Fatih FIRDOLAŞ, Yrd. Doç. Dr. Tunç OZAN ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet Karakeçi'ye tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Eğitimim sürecince ve bütün hayatım boyunca bana desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim ve çocuklarımla annesine çok teşekkür ederim.

Elazığ'a ilk geldiğim günden beri benden ve ailemden desteğini hiç esirgemeyen değerli abim Hilmi YÜKSEL'e çok teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanması sırasında büyük emek gösteren Abdulkadir Dursun, Doç. Dr. Ebru ÖNALAN ve Seda ÖZAYDIN'a çok teşekkür ederim.

Eğitimim süresince beraber uyum içerisinde çalıştığım tüm üroloji kliniği asistanları, hemşireleri ve diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkür ediyorum...

ÖZET

Bir yıl düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamama olarak tanımlanan infertilite, çiftlerin yaklaşık %15'inde belirlenmektedir. Kadın ve erkek faktörü etyolojide aşağı yukarı aynı oranda saptanabilmektedir. Özellikle %20 oranında belirlenen idiyopatik infertilite halen yeni araştırma konularıdır.

Fertilite fizyolojisi ve infertilite etyolojisinde iyon kanallarının etkinliğini belirlemek için Haziran 2014-Haziran 2015 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Hastanesi Üroloji kliniğine infertilite nedeni ile başvuran 30'ar hastadan oluşan astenozoospermi, oligozoospermi, oligoastenoteratozoospermi ve teratozoospermili 4 grup, 30 adet kontrol grubu olmak üzere total 150 hasta çalışmaya dahil edildi. Rutin infertilite değerlendirmeleri yapılan hastalar CatSper1, 2, 3, 4, Hv1, KCNU1, Slo3 ve TMEM16A gen ekspresyonları ile değerlendirildi.

Astenozoospermili hastalarda CatSper1, 2, 3, 4, KCNU1, Slo3, TMEM16A gen ekspresyonları kontrol grubuna göre azaldığı, Hv1 gen ekspresyonunda ise anlamlı fark olmadığı bulundu. Teratozoospermili hastalarda CatSper1, 2, 3, 4, KCNU1, TMEM16A gen ekspresyonları azaldığı, Hv1 ve Slo3 gen ekspresyonlarında anlamlı fark olmadığı bulundu. Oligozoospermili hastalarda CatSper1, CatSper4, Hv1, Slo3, TMEM16A gen ekspresyonlarının arttığı, CatSper2 ve CatSper3 gen ekspresyonlarında anlamlı fark bulunmadığı, KCNU1 gen ekspresyonunun azaldığı bulundu. Oligoastenoteratozoospermili hastalarda CatSper1, CatSper4, Hv1, Slo3 ve TMEM16A gen ekspresyonlarının arttığı, CatSper2, KCNU1 gen ekspresyonlarında fark olmadığı, CatSper3 gen ekspresyonunun azaldığı bulundu.

Sonuç olarak bu iyon kanallarının özellikle sperm ileri hareketi ve morfolojisi üzerine etkili olduğu ve bu iyon kanallarında ki mutasyonların infertilite ile sonuçlanabileceği fikrine vardık.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, CatSper1, 2, 3,4, Hv1, KCNU1, Slo3, TMEM16A

ABSTRACT

STUDY OF THE EFFECT OF ION CHANNEL EXPRESSIONS ON MALE INFERTILE PATIENTS

Infertility which is described as not receiving pregnancy despite unprotected and regular sexual intercourse in a one year period is detected by 15% of the couples. Male and female factor in the aetiology may be detected in similar rates. Especially idiopathic infertility which is recorded as 20 % of the cases is a new topic of research.

A total of 150 patients consisting 4 groups as asthenozoospermia, oligozoospermia, oligoasthenoteratozoospermia and teratozoospermia with 30 patients per each group and 30 controls applied to the Urology Clinic of Firat University Hospital because of infertility between June 2014 and June 2015 are included into the study in order to evaluate the physiology of fertility and efficacy of ion channels on the aetiology of infertility. Beside routine infertility evaluation patients were evaluated with CatSper1, 2, 3, 4, Hv1, KCNU1, Slo3 and TMEM16A gen expression.

CatSper1, 2, 3, 4, KCNU1, Slo3 and TMEM16A gen expression by asthenozoospermia patients were detected as lower compared to the controls. Hv1 expression showed no significant difference. CatSper1, 2, 3,4, KCNU1, TMEM16A gen expression by teratozoospermia patients were detected as lower compared to the controls. Hv1 and Slo3 expression showed no significant difference. CatSper1, CatSper4, Hv1, Slo3, TMEM16A gen expression by oligozoospermia patients were detected as higher compared to the controls. CatSper2 and CatSper3 expression showed no significant difference and KCNU1 gen expression was detected as lower compared to the controls. CatSper1, CatSper4, Hv1, Slo3, TMEM16A gen expression by oligoasthenoteratozoospermia patients were detected as higher compared to the controls. CatSper2 and KCNU1 expression showed no significant difference and CatSper3 gen expression was detected as lower compared to the controls.

As a result we have detected that these ion channels have an effect on sperm progressive motility and morphology and mutations in these ion channels may result in infertility.

Key Words: Infertility, CatSper1, 2, 3, 4, Hv1, KCNU1, Slo3, TMEM16A

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAYSAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Erkek Genital Sisteminin Embriyolojik Gelişimi:	2
1.1.2. Erkek Genital Sistem Anatomisi:	2
1.1.3. Erkek Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı:	4
1.1.4. Sperm Oluşumu ve Fizyolojisi:	5
1.1.4.1. Spermatogenez	5
1.1.4.2. Spermiyogenez (Spermatid Fazı)	7
1.1.4.3. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü	8
1.1.4.4. Diğer Faktörler	9
1.1.4.5. Apoptoz ve Spermatogenez	9
1.1.4.6. Spermatozoa	10
1.1.4.7. Sperm Motilite Fizyolojisi:	11
1.1.5. Semen Genel Özellikleri	14
1.1.6. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi	16
1.1.7. Öykü ve Fizik Muayene	16
1.1.8. Labaratuvar ve Görüntüleme	16
1.1.9. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri:	17
1.1.9.1. Pretestiküler Nedenler:	17
1.1.9.1.1. Hipotalamus Hastalıkları:	17
1.1.9.1.1.1. Gonadotropin Eksikliği (Kalman Sendromu)	17
1.1.9.1.1.2. İzole LH Eksikliği	17

1.1.9.1.1.3. İzole FSH Eksikliği	18
1.1.9.1.1.4. Doğumsal Hipogonadotropik Sendromlar	18
1.1.9.1.2. Hipofiz Hastalığı	18
1.1.9.1.2.1. Hipofiz Yetersizliği	18
1.1.9.1.2.2. Hiperprolaktinemi	18
1.1.9.1.2.3. Eksejen Veya Endojen Hormonlar	18
1.1.9.2. Testiküler Nedenler	19
1.1.9.2.1. Kromozomla İlişkili Nedenler	19
1.1.9.2.1.1. Klinefelter Sendromu	19
1.1.9.2.1.2. 46,XX Male Sendromu	19
1.1.9.2.1.3. 47, XYY Erkekler:	19
1.1.9.2.2. Diğer Nedenler:	19
1.1.9.2.2.1. Noonan Sendromu:	19
1.1.9.2.2.2. Miyotonik Distrofi	20
1.1.9.2.2.4. İzole Sertoli Hücresi Sendromu	20
1.1.9.2.2.5. Y Kromozomu Mikrodelesyonları:	20
1.1.9.2.3. Gonadotoksinler	21
1.1.9.2.4. Sistemik Hastalıklar	21
1.1.9.2.5. Defektif Androjen Aktivitesi	21
1.1.9.2.5.1. 5 Alfa Redüktaz Eksikliği	21
2.9.2.5.2. Androjen Reseptör Eksikliği	21
1.1.9.2.6. Testis Hasarlanmaları	21
1.1.9.2.7. Kriptorşidizim	21
1.1.9.2.8. Varikosel	22
1.1.9.2.9. İdiyopatik	22
1.1.9.3. Posttestiküler Nedenler	22
1.1.9.3.1. Reprodüktif Yol Obstrüksiyonu	22
1.1.9.3.1.1. Doğumsal Blokajlar	22
1.1.9.3.1.1.1. Kistik Fibrozis	22
1.1.9.3.1.1.2. Young Sendromu	22
1.1.9.3.1.1.3. Erişkin Polikistik Böbrek Hastalığı	22
1.1.9.3.1.1.4. Ejakülatuar Kanal Blokajı	23
1.1.9.3.1.2. Edinsel Blokajlar	23

1.1.9.3.1.3. Fonksiyonel Blokajlar	23
1.1.9.3.2. Sperm Fonksiyon veya Hareketliliği İle ilgili Hastalıklar	23
1.1.9.3.2.1. Hareketsiz Siliya Sendromları	23
1.1.9.3.2.2. İmmünolojik İnfertilite	23
1.1.9.3.3. Cinsel Birleşmeye İlişkin Bozukluklar	23
1.1.10.1. Fertilizasyonun Moleküler Temeli	23
1.1.10.1.1 Spermin Kadın Genital Sistemindeki Transportu	24
1.1.10.1.2. Akrozom Reaksiyonu	26
1.1.10.1.3. Zona Pellusida (ZP)	27
1.1.10.1.4. ZP Penetrasyonu	27
1.1.10.1.5. Sperm Yumurta Birleşmesi	28
1.1.11. İyon Kanallarının Sınıflandırılması	28
1.1.11.1. CatSper İyon Kanal Ailesi	29
1.1.11.2. Proton Voltaj-Kapılı İyon Kanalı	35
1.1.11.3. Potasyum Voltaj-Kapılı İyon Kanalı	36
1.1.11.8. Ca İle Aktive Edilen Cl Kanalları	37
2. GEREÇ ve YÖNTEM	39
2.1. Hastaların Seçimi	39
2.2. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Aletler	39
2.3. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
2.4. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Yöntemler	40
2.4.1. Total RNA İzolasyonu	40
2.5. Spektrofotometrik RNA Ölçümü	41
2.6. Komplementer DNA Sentezi	41
2.6.1. Kullanılan Çözeltiler	41
2.6.2. Komplementer DNA Sentezi	41
2.7. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu:	42
2.8. İstatistiksel Değerlendirme	43
4. BULGULAR	44
4. TARTIŞMA	52
5. KAYNAKLAR	57
6. ÖZGEÇMİŞ	65

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	WHO 1999 ve 2010 yılı semen parametreleri referans değerleri	17
Tablo 2.	İnsanlar ve farelerde CatSper subünitlerinin kromozomal lokalizasyonu ve Ensembl gen kimlikleri.	30
Tablo 3.	cDNA karışım miktarı	42
Tablo 4.	cDNA sentezi için uygulanan PZR programı	42
Tablo 5.	RT-PCR’ da kullanılan primerler	42
Tablo 6.	RT-PCR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	43
Tablo 7.	Uygulanan RT-PCR programı	43
Tablo 8.	Grupların Çeşitli Özellikleri ve Laboratuar Bulguları	45
Tablo 9.	Kontrol Grubunun Korelasyon Tablosu	45
Tablo 10.	Astenospermi Grubunun Korelasyon Tablosu	46
Tablo 11.	Oligospermi Grubunun Korelasyon Tablosu	46
Tablo 12.	Oligoastenoteratospermi Grubunun Korelasyon Tablosu	47
Tablo 13.	Teratospermi Grubunun Korelasyon Tablosu	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Erkekde HHG aksı	4
Şekil 2.	Spermin Yapısı	5
Şekil 3.	Spermatogenezin aşamaları	6
Şekil 4.	Akrozom reaksiyonu ve sperm motilitesinde moleküler mekanizmalar	13
Şekil 5.	Aksonem yapısı ve bileşenleri (A), Silier aksonemin şematik görünümü 9 mikrotübül çifti (mikrotübüller A ve B) santral kılıfla çevrili iki santral mikrotübülü çevreler (santral çift).	14
Şekil 6.	Spermin kumulus yumurta kompleksine girişi	26
Şekil 7.	Normal sperm ve CatSper'sız sperm	32
Şekil 8.	CatSper'in fonksiyonu ve düzenlenmesi	32
Şekil 9.	CatSper'in Fonksiyonel Önemi	34

KISALTMALAR LİSTESİ

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ACE	: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
Acr	: Akrozomal Enzim
AQP	: Aquaporin
AZF	: Azospermi Faktör
Bak	: Bcl2-antagonist/killer 1
Bax	: Bcl-2-associated X protein
Bcl	: B-cell lenfoma
CaCCs	: Kalsiyum ile Aktive Olan Klor Kanalı
cAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
CatSper	: Katyon Kanal Sperm
Cd	: Cluster of designation
cDNA	: Komplamenter Deoksiribonükleikasit
CFTR	: Kistik Fibroz Transmembran Düzenleyici
DAG	: Diaçil Gliserol
DAZ	: Deleted in Azospermi
DEFB	: Beta Defensin
DHT	: Dihidrotestosteron
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E₂	: Estrodiol
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FSH	: Follikül Uyarıcı Hormon
GnRH	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
HHG	: Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal
hSMP	: İnsan Sperm Membran Proteini
Hv	: Proton Voltaj Kapılı İyon Kanalı
ICSI	: İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu
Ig	: İmmunglobulin
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin

IP3	: İnozitoltrifosfat
IVF	: İnvitro Fertilizasyon
iNOS	: Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentetaz
KAL	: Kalman Geni
KO	: Kumulus Ooforus
KYK	: Kumulus Yumurta Kompleksi
KCNU	: Potasyum kanal, subfamily U
LH	: Lüteinize Edici Hormon
LIF	: Leukemia İnhibitör Faktör
Mcl	: myeloid leukemia cell differentiation protein
mRNA	: Mitokondrial Ribonükleik Asit
NA-NK	: Ne adrenerjik-Ne kolinerjik
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
OA	: Obstruktif Azospermi
OBF	: Oct-binding faktör
PBS	: Fosfat Buffer Saline
PIP2	: Fosfoinozotildifosfat
PKC	: Fosfokinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
PRL	: Prolaktin
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleikasit
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCO	: Sertoli Cell Only
Slo3 (KSper)	: Sperm Potasyum Akımı
SRY	: Sex Determing Region of Y
TAF	: Transcription Initiation Factor
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
Tesp	: Testis Spesifik Serin Proteaz
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü

TM	: Transmembran
TMEM	: Transmembran protein
TNF	: Tumor Nekrozis Faktör
TRUSG	: Transrektal Ultrasonografi
Tssk	: Testis Spesifik Serin Kinaz
T.T	: Total Testosteron
USG	: Ultrasonografi
ÜYT	: Üremeye Yardımcı Teknikler
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ZP	: Zona Pellucida



1. GİRİŞ

Bir yıl düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamama olarak tanımlanan infertilite, çiftlerin yaklaşık %15'inde belirlenmektedir (1). Erkek faktörlü vakaların yaklaşık olarak yarısı oligospermi, azospermi gibi hatalı spermatogenezle ilişkilidir (2). İnfertilite etiyojisinde erkek faktörü %30 olguda tek başına, %20 olguda da kadın faktörü ile birlikte rol alır (3). Özellikle %20 oranında belirlenen idiyopatik infertilite halen yeni araştırma konularıdır.

İnfertilitede sperm morfolojisi (ışık ve elektron mikroskop kullanılarak), sperm fonksiyonu (hareketliliği, akrozom reaksiyonu, sperm zona pellucida etkileşimi, oksidatif stres) ve nükleus değerlendirmesi (kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, anöploidi) gibi alanlar temel inceleme alanlarıdır (4). Sperm ilk olarak çeşitli iyon konsantrasyonu, osmotik basınç ve pH ile değişebilen bir mikro çevre olan kadın üreme sistemine girer. Sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon süreçleri iyon kanallarının normal fonksiyonuna dayanan süreçlerdir. İyon kanal aktiviteleri sperm fizyolojisi ve aktivitesi üstünde önemli ölçüde belirleyici olduğundan infertilite ve doğum kontrolü için kullanılabileceği fikri oluşmuştur (5). Memeli sperm heterojenitesi genel olarak morfoloji, motilite, nükleer farklılaşma, kapasitasyon ve reseptör durumu gibi birçok şekilde tanımlanabilir (6).

Sperm analizi sonucunda, sperm sayısı 15 milyon/ml'den az ise oligozoospermi, ilerleyici motil spermatozoa %32' nin altında olması asthenozoospermi, normal morfolojideki spermelerin %4'den az olması teratozoospermi olarak tanımlanmaktadır (7).

İnfertil erkeklerin sperm hücrelerindeki iyon kanal ekspresyonları yeni araştırma konularıdır. Çalışmamızda oligoasthenoteratozoospermi, izole asthenozoospermi, izole teratozoospermi ve izole oligozoospermi saptanan infertil erkeklerde CatSper1, CatSper2, CatSper3, CatSper4, Slo3/KCNU1, Hv1, TMEM16 iyon kanal ekspresyonlarının normal sperm sayısına sahip fertil bireylerle karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Erkek Genital Sisteminin Embriyolojik Gelişimi

Genital sistemi oluşturan yapılar gonadlar, genital boşaltım kanalları ve dış genital organlar şeklinde ayrılmaktadır. Fertilizasyon sırasında oosit II'deki X kromozomuna spermden gelen bir X veya Y kromozomu bağlanması sonucu fenotipik özellikler ancak altıncı haftadan sonra belirmeye başlar. Üriner sisteme ait yapılar, gonadların bazı bölümleri ve erkek genital sisteminin boşaltım kanalları ara mezodermden gelişir. Paramezonefrik kanallar (Müller kanalları) ise gestasyonun 44. ile 48. günleri arasında karın boşluğunun iç yüzeyini döşeyen sölom epitelinin içeriye doğru kıvrılması ile oluşur (8).

Erkek genital sisteminin gelişiminde ilk basamak, SRY (Sex Determining Region of Y) proteininin ifade edilmesidir. SRY geni ifadesi gerçekleşmeyen embriyolar, Y kromozomu bulunsa bile dişi yönde gelişirler. Sertoli hücreleri, Mülleryan İnhibe Edici Faktör ve Androjen Bağlayıcı Proteini (ABP) salgılayarak Leydig hücrelerine dönüşecek olan mezenkim hücrelerinin testise göçünü sağlar ve erkek germ hücrelerinin mayoz döngüsüne girmesini engeller. Leydig hücreleri ise testosteron üretimini sağlar. Testosteron, testis ve genital dokularda bol miktarda bulunan 5 α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülerek, erkek üretrası, prostat, penis, skrotum gelişmesini ve testislerin skrotuma inişini sağlar (9).

1.1.2. Erkek Genital Sistem Anatomisi

Erkek üreme sistemi organları dış ve iç genital organlar olarak ikiye ayrılır. Dış genital organlar penis ve skrotumdan oluşurken, iç genital organlar testis, epididim, spermatik kord, duktus deferens (vaz deferens), seminal keseler, ejakulator kanalları, prostat ve bulboüretal (Cowper) bezlerden oluşur (10).

Testislerin boyutları 4x2.5x3 cm ve bir testisin volümü ≥ 15 ml'dir. Testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücrelerini ve spermlerin beslenmelerini sağlayan, fagositoz yapan ve inhibin hormonunu salgılayan Sertoli hücrelerini içerir. Bu hücrelerin işlevleri hipofiz tarafından denetlenir (11). Sertoli hücreleri seminifer tübüllerde germinal hücreler ile birlikte bulunurken, Leydig hücreleri tübüller arasındaki bağ dokuda (interstisyum) yerleşiktir. Kan-testis bariyerinin oluşumunda Sertoli hücreleri görev alır (12).

Epididim testisin üst-arka kenarında bulunur ve 4 cm uzunluğunda bir tunika içinde yer alan tek bir kanal yumağıdır. Yumak açıldığında uzunluğu insanlarda 3-4 metre, ratlarda yaklaşık 6 metredir. Epididimler spermilerin motilite, morfoloji ve fertilitte olgunlaşmasını sağlar (13).

Spermatik kord testisin vasküler yapılarını, sinirlerini ve duktus (vaz) deferensini içerir ve inguinal kanal ile testis arasında uzanır (14). Duktus deferens inguinal kanaldan karın boşluğuna girer, seminal kesenin kanalı ile birleşerek ejakulator kanal adını alır ve prostatın santral zonundan prostatik üretraya açılır (15).

Seminal keseler, mesane arka alt tarafında yerleşik tubüler yapıda bir çift bezdir. Fruktoz, sitrik asit, fibrinojen, prostaglandinler ve spesifik proteinleri içeren salgıları ile ejakulatın koagülasyonunu, spermatozoa aktivasyonunu ve semenin bazik özelliğini sağlar. Fruktoz spermin temel besin kaynağıdır. Prostaglandinler ise servikal mukusla reaksiyona girerek sperm hareketleri için uygun ortam sağlamanın yanısıra, tuba uterina ve uterusu kasılmalar sağlayarak spermilerin ovuma ulaşmasına yardımcı olur (16).

Prostat bezi mesanenin altında ve rektumun önünde yer alır. Seminal prostat spesifik antijen (PSA) içeren asidik salgıları ile semenin likefaksiyonunu sağlar. Ejakulator kanallar prostat bezinin parankim dokusu içerisinden geçerek kollikulus seminalislerde prostatik üretraya açılır. Cinsel uyarı sırasında cowper bezlerinde salgısı üretra içerisinde kalmış idrarı nötralize eder ve bazik ejakulatın üretradan geçişi ile cinsel ilişkiyi kolaylaştırır (17).

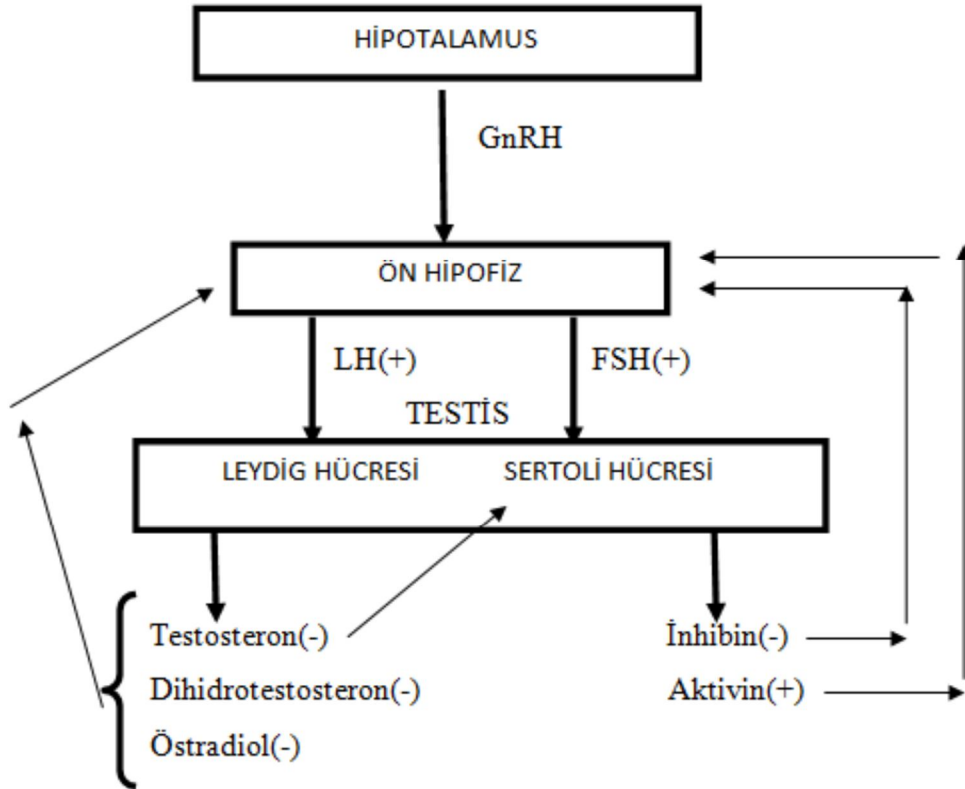
Prostat ve seminal keselerde salgının oluşmasında parasempatik ve nitriderjik (NA-NK) sistem etkili iken, epididimal içerik de dahil salgıların arka üretraya boşalmasında sempatik sistem etkilidir. Sempatik etki ile salgıların arka üretraya boşalması sırasında mesane boynu kapalı ve dış sfinkter gevşektir. Bulböz üretraya dolan salgı pudental sinir uyarımı ile dış sfinkterin ve bulboüretal kasların ritmik kasılmaları ile dışarı atılır (18).

Volümü 2-5 ml olan ejakulat (semen) 300-400 milyon sperm içerir. Semen %60'ını seminal keseler, %30'unu prostat ve %10'unu epididim ve diğer bez salgıları oluşturur (19).

1.1.3. Erkeklerde Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı:

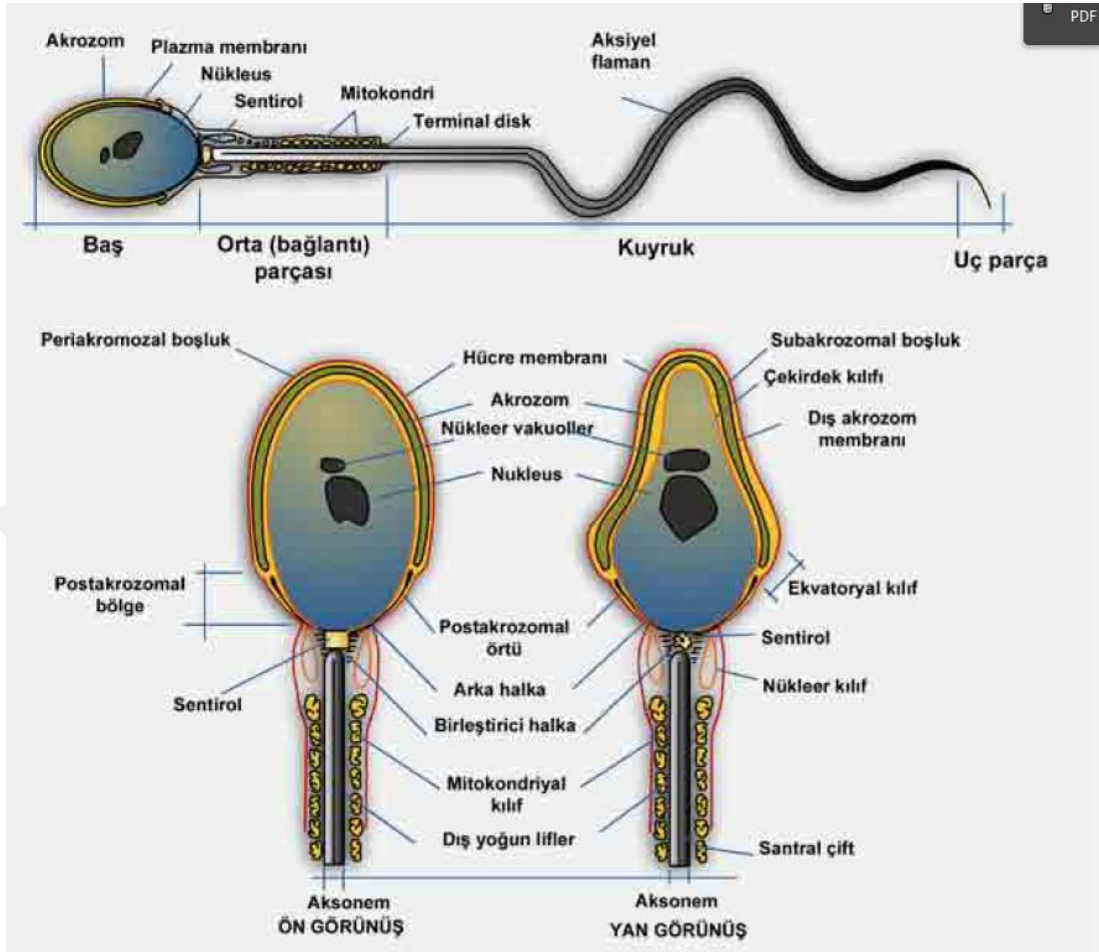
Erkeklerde hipotalamo-hipofizer-gonadal (HHG) aksının iki temel işlevi vardır. Bunlar üreme performansı için gerekli seks hormonlarının salınımı ve türün devamı için gerekli spermatogenetik hücrelerin sağlıklı gelişiminin sağlanmasıdır (20).

Hipotalamustan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salgılır ve portal dolaşımdan geçerek yüksek konsantrasyonlarda ön hipofize gelir. Hipofizdeki gonadotropik hücrelerin reseptörlerine bağlanarak luteinize edici hormon (LH) ve follikül uyarıcı hormon (FSH) salgılatır. FSH ve LH sistemik dolaşım ile testise ulaşır. LH Leydig hücrelerine etki ederek testosteron üretimini sağlarken, FSH Sertoli hücrelerinden ABP, inhibin ve aktivin olmak üzere onlarca molekülün salgılanmasını sağlar. GnRH salınımı pulsatil olduğundan, FSH ve özellikle de LH salınımı da pulsatil bir şekilde olur (20, 21). HHG aksının düzenlenmesi Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Erkeklerde HHG aksı (20)

1.1.4. Sperm Oluşumu ve Fizyolojisi

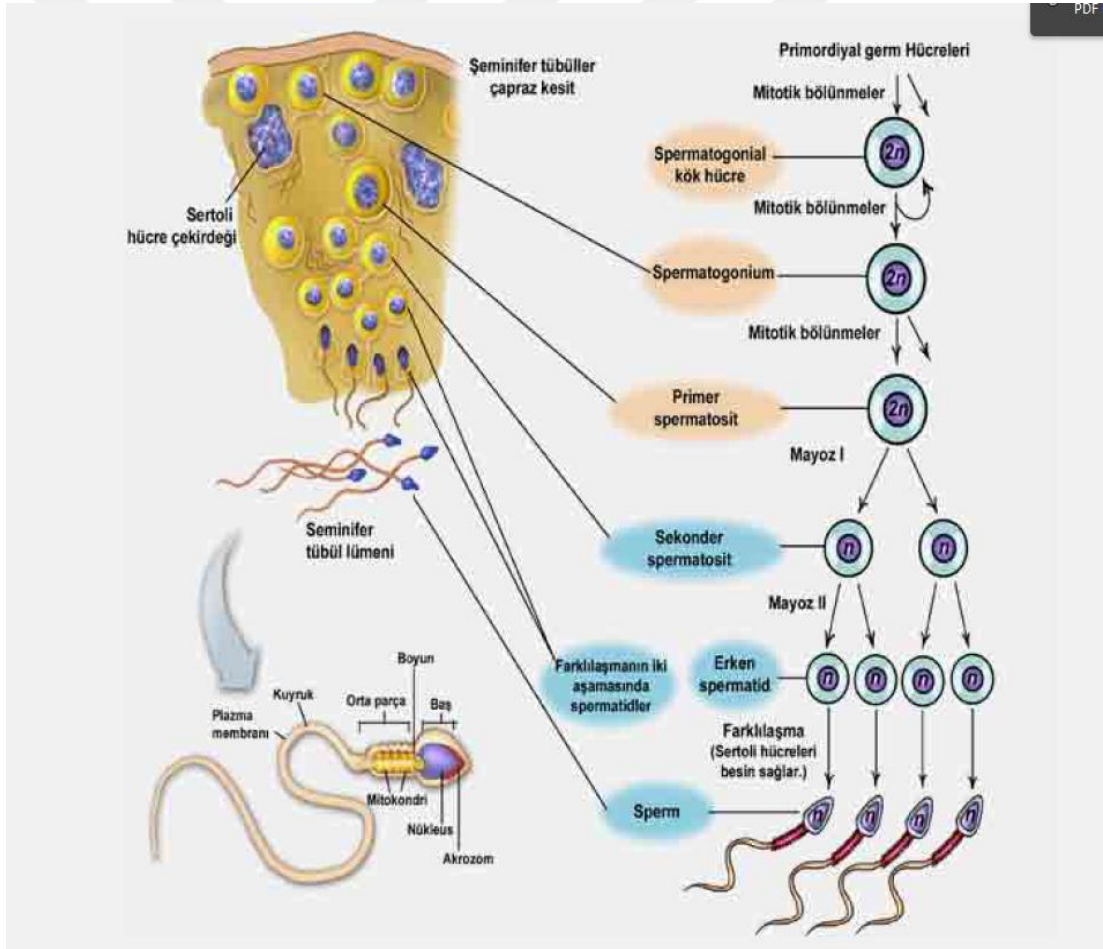


Şekil 2. Sperm Yapası (22)

1.1.4.1. Spermatogenez

Spermatogenez bir hücre farklılaşması olayıdır ve testisin seminifer tübüllerinde gerçekleşir. Endodermden köken alan germ hücrelerinin seminifer tübüle göçünü spermatogonyumların oluşumu izler. Bu dönemde hipofizden salgılanan gonodotropinler önemli rol oynar. Hormonal etkileşim puberteden hemen önce başlar ve yaşam boyu devam eder. Spermatogenezin gerçekleşmesinde seminifer tübüllerdeki epitelyum siklusu ve spermatogenezini etkileyen HHG aksın rolü çok önemlidir. Puberteyle birlikte spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve tip A spermatogonyumları oluştururlar. Tip A spermatogonyumların üretiminin başlamış olması spermatogenezin başlamış olduğunu gösteren bir olaydır. Tip A spermatogonyumlar belirli bir mitoz bölünme süreci sonunda tip B spermatogonyumları meydana getirir. Tip B

spermatogonyumlar mitoz bölünme ile primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler 46 kromozom (44XY) içerirler. Primer spermatositler birinci mayoz bölünmeye girerler ve yaklaşık 22 gün sonra profaz evresine geçerler. Profaz evresi sonunda mayoz bölünme tamamlanır ve 23 kromozom (22X veya 22Y) içeren sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler ikinci mayoz bölünmeyle spermatidleri meydana getirirler. Tip A spermatogonyumların kök hücre topluluğundan ayrılmalarını takiben çoğalıp, farklılaşarak spermatidleri oluşturmalarıyla sitokinez tamamlanır. Hücreler farklılaşma süreci boyunca Sertoli hücrelerinin yanlarında var olan girintilere gömülü halde bulunurlar. Sertoli hücreleri germ hücrelerini koruma, besleme ve destekleme görevi yaparlar. Şekil 3'de spermatogenezin aşamaları gösterilmiştir (22).



Şekil 3. Spermatogenezin aşamaları (22)

1.1.4.2. Spermiyogenez (Spermatid Fazı)

Spermiyogenez, spermatidlerin bir bölünme olmadan farklılaşması ve olgun sperme dönüşmesi sürecidir. Bu dönüşüm üç aşamada gerçekleşir;

Golgi Fazı: Spermatidler, içerisinde çekirdek (nükleus), Golgi kompleksi, mitokondriler, ribozom ve düz yüzlü endoplazmik retikulum içeren bir sitoplazmaya sahiptir. Golgi kompleksinde akrozomal granül oluşturulur ve sperm hareketinden sorumlu olan flagellum bu aşamada oluşmaya başlar.

Akrozomal Faz: Akrozomal granül, nükleusun ön tarafını kaplayacak şekilde yayılır ve akrozomu meydana getirir. Bu sırada nükleus uzar ve daha yoğun bir hal alır. Bir sentriyol gelişir ve flagellumu oluşturur. Sperm hareketi için enerji kaynağı olan mitokondriler flagellumun proksimal kısmında toplanırlar ve spermin orta kısım denilen bölümünü oluştururlar.

Olgunlaşma Fazı: Tüm organeller tamamlanınca geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve olgunlaşan spermeler seminifer tübül lümenine salınırlar.

Spermeler seminifer tübül lümeninden pasif taşıma yoluyla, depolanıp işlevsel olarak olgun hale gelecekleri epididime geçerler. Buradan da emisyon ve ejakulasyon ile vaz deferens yardımıyla üretraya, oradan da dışarıya ulaşırlar. Spermatogonyumun olgun sperm haline gelmesi için gereken süre yaklaşık 64 gündür (22).

Olgun sperm baş ve kuyruktan oluşur. Baş kısmı haploid nükleusu ve nükleusun ön tarafını kapsayacak şekilde fertilizasyon sırasında gerekli olacak enzimleri taşıyan akrozomu barındırır. Sperm hareketini sağlayan kuyruk yaklaşık olarak 50 µm uzunluğundadır ve orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Orta parçada hareket için gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondriler bulunur. Spermiyogenez sırasında nükleusta meydana gelen ana değişimlerden biri de haploid nükleusta bulunan histonların arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirmesi olayıdır. Protaminler %60'ı arjininden oluşan küçük proteinlerdir. Bu değişim sonucunda nükleusta transkripsiyon sonlanır ve sperm genomik DNA'sını stabilize ederek korur (22).

1.1.4.3. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü

Spermatogenez pubertenin hemen öncesinde başlar ve bu olayın gerçekleşmesinde başlıca rol alan hormonlar FSH ve LH'dır. FSH hem Sertoli hücrelerinin, hem de Leydig hücrelerinin gelişmesi ve fonksiyonlarını yapabilmeleri için gereklidir. Puberte öncesi spermatogenezin gerçekleşmesinde tek başına testosteron yeterli değildir. Erişkin erkekte ise daha önce başlamış olan spermatogenezin devam ettirilmesinde, LH'nın etkisiyle salgılanan testosteron en önemli hormondur. Tüm spermatogenez sürecinin kalitatif olarak devam ettirilmesinde tek başına testosteronun, kantitatif olarak sürdürülmesinde ise FSH'nın gerekli olduğu bilinmektedir. FSH, spermatogenezin mayoz öncesi ve sonrası evrelerinde etkisini gösterir. Testosteron ise etkisini Sertoli hücrelerini uyararak göstermektedir (22).

Eğer hipotalamus bir şekilde zarar görürse bunun etkisiyle testislerde atrofi gelişir. Bu olgularda Leydig hücre hiperplazisi, peritübüler hyalinizasyon ve germ hücrelerinde azalma saptanır. LH'nın spermatogenez sürecine katkısı sadece Leydig hücrelerini uyararak yaptığı testosteron salgılatıcı etkisidir. Oysa FSH'nın spermatogenezin devam ettirilmesindeki rolü daha farklıdır. FSH ve testosteron reseptörleri germ hücrelerinde bulunmadığı için bu hormonların asıl etkilediği hücreler Sertoli hücreleridir. Testosteron, Sertoli hücrelerinin spermatidlere yapışmasını sağlar ve spermatogenezi bu yolla etkiler. Testosteron bunun yanında diğer peritubuler hücreleri de etkilemektedir. FSH ve testosteron aynı zamanda germ hücre apoptozunu önlemekte de rol alır. FSH yetersizliğinde spermatogenez çok az sayıda spermatid yapılması ile sonuçlanır. Bunu sağlayan testosteronun ortamda bulunmasıdır. Fakat normalde olduğu gibi çok sayıda matür spermatidin yapılabildiği kantitatif düzeyde spermatogenezin sürdürülebilmesinde testosteron ile birlikte FSH'nın da ortamda olması gerekir. Tek başına testosteron etkili olmaz, çünkü testisler içerisinde yeteri kadar yüksek testosteron konsantrasyonu yoktur. Spermatogenezin sağlıklı biçimde devam edebilmesi için testislerde normal dolaşımdaki testosteronun en az 100 katı kadar testosteron gereklidir. Primer spermatositler östrojen reseptörleri taşımaktadır. Bu reseptörlerin fonksiyonel olması spermatogenez için gereklidir. Spermatogenezi etkileyen diğer bir hormon da tiroid hormonudur. Bu hormon Sertoli hücreleri üzerinden spermatogenezi etkiler. Sertoli

hücre kaynaklı İnhibin B de spermatogenez sürecini etkileyen başka önemli bir endokrin faktördür (22).

1.1.4.4. Diğer Faktörler

Testislerde spermatogenezin sağlanmasında hormonların dışında başka faktörler de önemlidir. Y kromozomunun uzun kolu üzerindeki genlerin spermatogenezini düzenleyici rolleri bulunur. DAZ (deleted in azoospermia) geni bunlardan birisidir. Obstrüksiyon bulunmayan azoospermi olgularının %13'ünde bu genin yokluğu bildirilmiştir. Ayrıca, seminifer büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü (FGF), İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF- 1), Sertoli hücrelerinden salgılanan büyüme faktörü, mayoz inhibe edici madde ve mayoz önleyici madde gibi parakrin ya da otokrin faktörlerin de spermatogenez üzerinde rolleri vardır. Bunların başlıcaları interlokinler (IL-1, IL-2, IL-4), kök hücre faktörü, leukemia inhibitör faktör (LIF), kemik morfogenetik proteini-4 süreçte rol alan diğer önemli proteinlerdir (22).

Peritübüler hücrelerin germ hücrelerinin çoğalmasını uyardığı ve germ hücre farklılaşması için gerekli olan retinolün, seminifer tübülde germ hücre farklılaşmasına ve seminifer epitel siklusuna aracılık ettiği gösterilmiştir (22).

İnsan sperm membran proteini-1 (hSMP-1) insan sperm başının akrozom bölgesinin yüzeyindeki bir proteindir. Bu protein testiste spermatogenezin her aşamasında, hemen hemen tüm germ hücrelerinden salgınır. Bu protein germ hücre farklılaşmasında rol alır (25).

Ayrıca magnezyum, çinko, bakır ve kalsiyum spermatogenez sırasında nükleusta kromatin yoğunlaşmasında görev alırlar (22).

Testiküler makrofajlar sertoli hücre aktivasyonu ve germ hücrelerinin yaşamını etkiler. Spermatogenez bozulursa bu durum testiste makrofaj sayısının artması için bir nedendir (22).

1.1.4.5. Apoptoz ve Spermatogenez

Apoptoz, hücrelerin yaşamları boyunca yapım-yıkım dengesini ayarlayan, vücutta gereksiz hücreleri ortadan kaldıran programlanmış hücre ölümdür. Bu süreçte hücre morfolojisi tamamen değişmektedir. İlk olarak gerçekleşen hücre büzüşmesi sonrasında kromatin parçalanması, membranda kabarcıkların oluşması,

nükleusta yoğunlaşma ve sonunda fagosite edilebilen apoptotik cisimlere bölünme gerçekleşir. Apoptozis ve nekroz farklı süreçlerdir. Apoptoza sitoplazmanın parçalanma sürecinde oluşan kabarcıklar plazma zarı ile korunmuş durumdadırlar. Bu kabarcıklar makrofajlar tarafından fagosite edilirler, ancak herhangi bir enflamatuvar cevap oluşmaz. Nekrozda ise hücre şişer, organellerin hacmi artar ve sonuçta patlayarak içeriği hücre dışına atılır. Makrofajlar nekrotik hücre kalıntılarını fagosite ederler ve enflamatuvar cevap oluşmasını sağlayacak moleküller salgırlar. Apoptoza bağlı olarak meydana gelen en belirgin değişiklikler; fosfolipidlerin çıkışı ve DNA parçalanmasıdır (22).

Germ hücreleri farklı gelişim aşamalarında apoptoz yoluyla yok olurlar. Bu durum karmaşık fizyolojik bir süreçtir. Bcl-2 ailesinde yer alan proteinler germ hücre homeostazı için yaşamsal olan bir sinyal iletir. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1 diğer sorumlu proteinlerdir. Bu sayılan moleküller hücrenin yaşaması gerekliliği konusunda sinyal iletirken, Bax, Bak ve Bim proteinleri hücre ölümü için sinyal yollar. Apoptoz sertoli hücre ve germ hücrelerin oranını belirlemede önemlidir. Germ hücreleri olması gerektiği şekilde gelişimini tamamlayamazsa apoptoz döngüsüne girer ve ölürler. Radyasyon, toksik maddeler, transforme edici büyüme faktörü (TGF), GnRH antagonistleri, ısı ve stres apoptozu hızlandıran olaylardır. Buna karşılık seminifer tübülün östrojenle etkileşimi, kök hücre faktörü ve LIF apoptozu engeller (22).

Ejakulat içinde bulunan spermlerdeki apoptozun karakteristik özellikleri; ultrastrüktürel olarak görülebilen kromatin, mitokondri, nükleus membranı ve plazma membranı anormallikleri ve sitoplazmik vakuol ve apoptotik cisimlerin oluşumudur (22).

1.1.4.6. Spermatozoa

Spermiogenezisi tamamlayan hücrelere “Spermatozoa” denir. Bunlar morfolojik olarak matür; ancak fonksiyonel olarak immatürdürler. Sperm motilitelerini epididimde kazanırlar. Epididim fonksiyonu için gerekli olan hormon dihidrotestosterondur. Epididime ait patolojiler, ejakülattaki sperm karakter ve işlevinde değişikliklere yol açarlar. Deneysel olarak, epididim başından alınan sperm ovumu fertilize edemezken; epididim kuyruk bölümünden alınan sperm fertilize edebilmektedir. Bu da sperm karakterinin epididimden aldığı beslenmeye bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bu da sperm karakterinin epididimden aldığı beslenmeye bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

yeteneklerini epididimde kazandıklarını göstermektedir. Spermilerin epididimden geçiş süresi yaklaşık olarak 2 gündür. Daha sonra rete testis sıvısıyla duktus deferense gelirler (22).

Spermatozoa, 50-60 mikron uzunluğundadır. Baş, boyun, orta ve kuyruk olmak üzere dört kısımdan oluşur. Baş kısmının uzunluğu 5-6 mikron, genişliği 2,5-3,5 mikrondur. Akrozom kısmı, başın %40- %70 ini oluşturmaktadır. Orta parçanın genişliği 1 mikron, uzunluğu 1,5 x baş uzunluğu kadardır. Kuyruk kısmının boyu 45 mikrondur. Orta parçadan daha incedir ve kıvrılmamış bir yapıdadır. Baş bölümünün büyük kısmını, içerisinde paternal DNA'nın olduğu çekirdek kaplamaktadır (22).

1.1.4.7. Sperm Motilite Fizyolojisi:

Spermin motilitesinde sperm içine giren Ca^{+2} iyonunun önemli rolü vardır. CatSper geni sperm kuyruğunun esas parçasında yerleşmiştir ve Ca^{+2} 'nin hücre içine alınmasında önemli rol oynamaktadır. Bu gen spermilerin hızlı hareketinden sorumlu tutulmaktadır. Şekil 4'de sperm motilitesinde Ca^{+2} 'nin rolü ve akrozom reaksiyonlarında moleküler mekanizmalar gösterilmiştir (22).

CatSper geni pH değişikliklerinden etkilenmektedir. Bunun yanında KSper (Slo3)' de sperm kuyruğunda Ca^{+2} 'nin hücre içine alınmasında önemli rolü olan diğer bir genidir. Sentrin/kaltractin de kuyruk flagellumunun hareketinde rol oynayan proteinlerdir. Sperm motilite bozukluğu olanlarda CatSper geninin mRNA ekspresyonu daha azdır (22).

Spermatogenezde önemli etkileri olan bir diğer molekül grubu Aquaporinlerdir. Hücreler arası su transportu Aquaporinler (AQP) aracılığı ile yapılır ve 10 farklı Aquaporin tipinin var olduğu bilinmektedir. Bunların en önemlilerinden birisi AQP-7 dir ve sıçanlarda spermin kuyruk bölümünde yer alır. AQP-7 negatif sperm örneklerinde motilite yavaşlar ve epididimal geçiş boyunca sperm gerekli olgunlaşmayı sağlayamaz (22).

Nitrik oksit sentaz (NOS) ekspresyonu normospermik fertil erkeklerde infertilere göre daha yüksektir. Buna karşılık uyarılabilir NOS (iNOS) ve nitrotirozin immunhistokimyasal boyama sonuçlarına göre astenospermik olgularda daha fazla eksprese edilir (22).

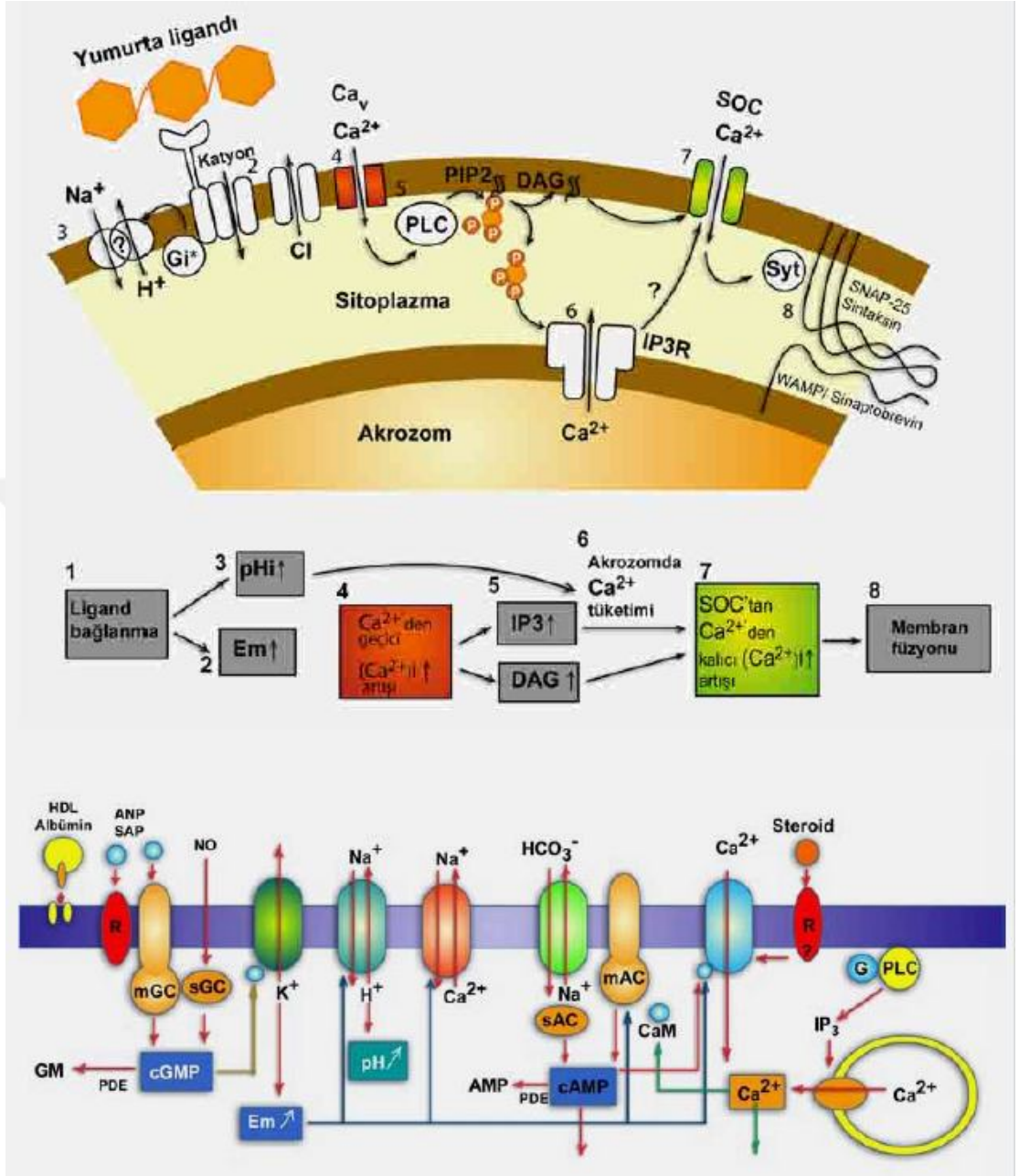
TNF- α , IL1- β ve IL-6 gibi sitokinler artmış immotil sperm sayısından sorumludur. Bu olgularda sitokinleri baskılayan spesifik monoklonal antikorların

sperm motilitesini artırdığı gösterilmiştir. Oluşan ROS, hücre içi sinyallerle sitokinlere ait etkilere aracılık eder. Yüksek oksijen konsantrasyonlarında spermatozoanın hızla motilitesinin azaldığı rapor edilmiştir (22).

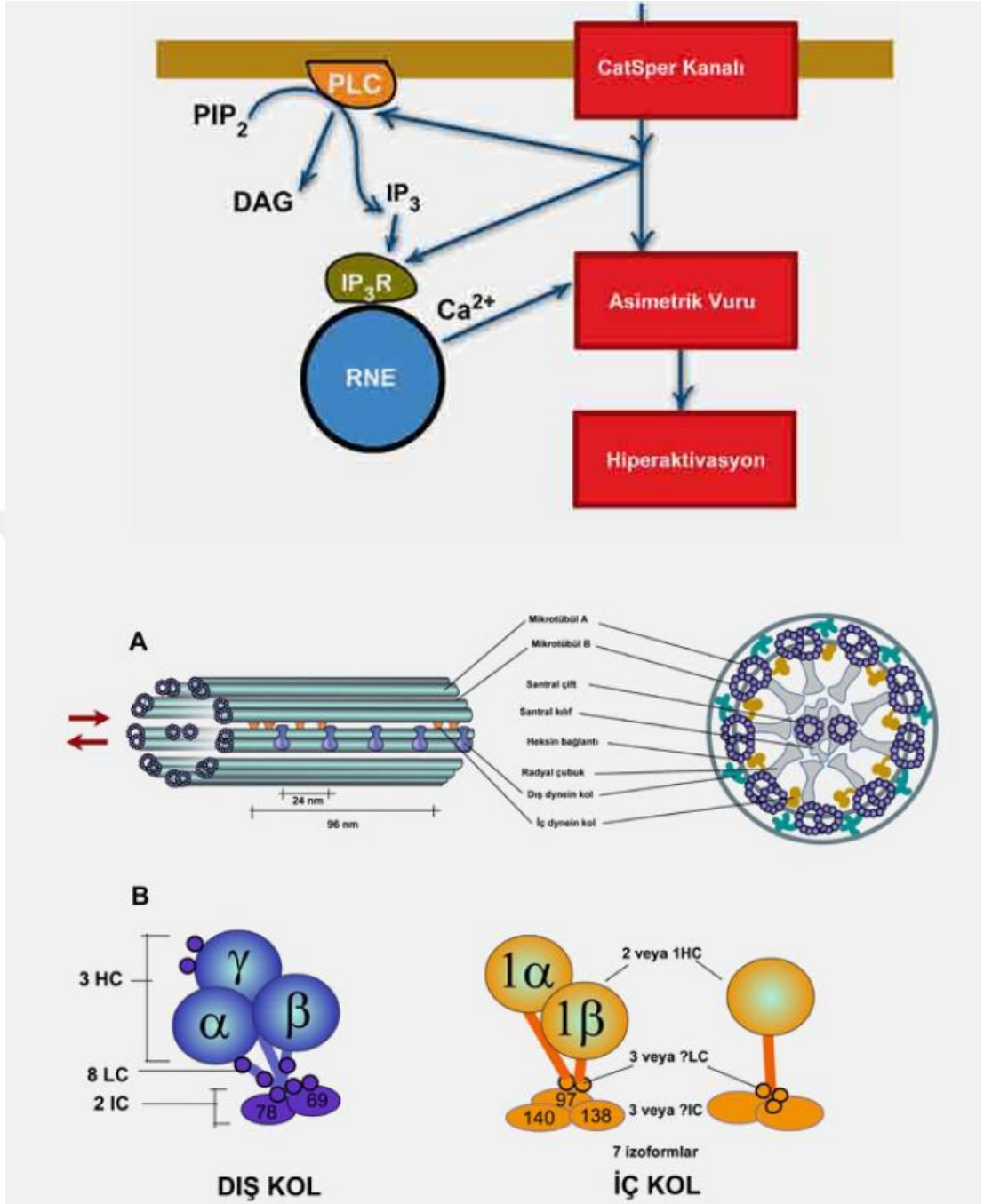
ROS'a karşı glutasyon, katalaz, α -tokoferol ve askorbik asit ile sperm motilitesi yeniden düzelebilmektedir ve bunlar medikal tedavi seçeneği olarak klinik pratikte kullanılmaktadır (22).

Bir insanda her epididimde ortalama 150-200 milyon sperm bulunur ve bunların yaklaşık yarısı epididimin kuyruk bölümünde yerleşir. Epididimin kuyruğundaki spermatozoalar testiküler sperme göre daha hareketlidir ve yumurtayı dölleme oranları daha yüksektir. Şekil 5'de aksonemin hareket fizyolojisindeki moleküler mekanizmalar gösterilmiştir (22).

Spermatogonyumun olgun sperm haline gelmesi için gereken 64 günde hormonlar, büyüme faktörleri, proteinler ortamda bulunmalıdır. Bunların eksikliği astenospermi ve infertilite olarak kliniğe yansıtacaktır (22).



Şekil 4. Akrozom reaksiyonu ve sperm motilitesinde moleküler mekanizmalar (22)



Şekil 5. Aksonem yapısı ve bileşenleri (A), Silier aksonemin şematik görünümü 9 mikrotübül çifti (mikrotübüller A ve B) santral kılıfla çevrili iki santral mikrotübülü çevreler (santral çift). (22).

1.1.5. Semen Genel Özellikleri

Semen; seminal plazma ve spermatozoadan oluşur. Spermatozoidlerin dışındaki kısım, seminal plazma olarak adlandırılır. Total volümün % 1 den azını spermatozoidler oluşturur. Ejakülat ortalama 3- 3,5 ml. dir. Bunun 1,5- 2 ml. si

seminal vezikülden; 0,5 ml. si prostattan; 0,1- 0,2 ml. si Cowper ve Littre bezlerinden gelir. Ejekülatın ilk bölümü spermden zengindir; sonraki kısımları ise seminal vezikül salgısından oluşur. Seminal sıvı visköz, nötral veya hafif alkali olup; içerdiği flavine bağlı olarak sarı renktedir. Bu madde semenin ultraviyole ışığında florans vermesini sağlar (23). Semen normal bir şekilde oluşabilmesi için, ejakulasyonda seminal vezikül, prostat, Cowper ve Littre bezlerinin sekresyonlarının birleşmesi gerekir (24).

Seminal plazmanın pH' sı 7,2- 7,8 dir. En önemli görevi spermatozoanın transportunu sağlamak ve vajenin pH' sını tamponlamaktır. Seminal plazmanın pH' sı 6,2 nin altına düştüğünde spermatozoa motilitesi azalmaya başlar. Semen hacmi az olduğunda da; yeterince tampon kapasitesi oluşturamayacağı için, spermatozoanın motilitesi azalır. Hacim fazla olduğunda ise spermatozoanın konsantrasyonu düşecektir. Spermatozoa ejakülatın ilk kısmında yer aldığından bu durum bir dezavantaj oluşturmaz (25).

Seminal plazma kompozisyonu mevsimsel olarak farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca ejakulasyondan sonra, seminal plazmadaki enzim ve spermlerin metabolik aktivitesine bağlı olarak da, seminal plazmanın kompozisyonu değişmektedir. İnsan ejakülatının ilk bölümü, sperm ve prostatik bir sekresyon olan sitrik asit yönünden zengindir. Fruktoz, seminal veziküllerin majör sekretuar ürünüdür. Diğer vücut sıvılarından farklı olarak seminal plazma yüksek konsantrasyonlarda potasyum, çinko, sitrik asit, fruktoz, fosforilkolin, spermin, serbest amino asitler ve prostaglandinler içermektedir. Ayrıca önemli düzeylerde asit fosfataz, beta glukronidaz, laktat dehidrogenaz, alfa amilaz ve prostat spesifik antijen (PSA) içermektedir (26). Ayrıca Ig G, Ig A, Ig E, Ig M, FSH, LH, antitripsin, glikoprotein, inhibin, insülin, kininojen, prolaktin, relaksin, steroid bağlayıcı proteinler ve kan grubu antijenlerini de içermektedir (27).

Semende spermatozoa dışındaki diğer hücreler bazı patolojik koşullarda görülürler. Bunlar eritrosit, lökosit, makrofaj, epitel hücresi, sertoli hücresi ve prostatik hücrelerdir (28). Seminal sıvının içindeki maddeler, semenin fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra; spermatozoaların aktivitesini ve fertilizasyon yeteneğini de önemli ölçüde değiştirebilirler. Bu nedenle infertil bir olguda, semen analizi ile birlikte tüm bezlerin sekresyonları da değerlendirilmelidir (29, 30,31).

1.1.6. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

İnfertilite nedeniyle başvuran erkeğin öyküsü, özgeçmişi ve soygeçmişi iyi sorgulanıp fizik muayenesi sistematik bir şekilde yapılmalıdır (32).

İnfertil erkeğin değerlendirilmesindeki temel amaçlar:

1. Düzeltilebilir durumları aydınlatmak.
2. Erkek eşin spermi kullanılarak üremeye yardımcı teknikler (ÜYT) ile tedavi edilebilen düzeltilemeyen durumları saptamak.
3. Hiçbir teknik ile düzeltilemeyen sadece donör inseminasyon veya evlat edinme ile tedavi edilebilen durumları saptamak.
4. Erkeklerde kısırlıkla birlikte olan önemli hastalıkları saptamak.
5. Hastayı ve doğacak bebeği etkileyen kromozomal ve genetik anomalileri belirlemektir.

1.1.7. Öykü ve Fizik Muayene

Hastanın infertilite öyküsü, seksüel öykü, çocukluk çağı, tıbbi öykü, cerrahi öykü ve aile öyküsü detaylıca sorgulandıktan sonra fizik muayenede genel vücut görünümü, sekonder seks karakterleri, skrotum, testis volümleri, vaz deferens ve epididimler değerlendirilmelidir.

1.1.8. Laboratuvar ve Görüntüleme

İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde öykü ve fizik muayeneden sonra ilk istenecek laboratuvar testi semen analizidir. WHO 1999 ve 2010 yılı semen parametreleri referans değerleri tablo 1'de gösterilmiştir. İlk semen analizi normal ise yeni bir semen analizine gerek yoktur, anormal ise bir ay sonra ikinci bir semen analizi yapılır (1). HHG aksın değerlendirilmesi açısından sabah (saat 07-11 arasında) kanında FSH ve Total Testosteron (TT), gerektiğinde LH, Prolaktin (PRL) ve Estradiol (E2) düzeyleri ölçülmelidir. Öykü, fizik muayene ve laboratuvar bulgularından sonra gerektiğinde skrotal ultrasonografi (USG) ve transrektal ultrasonografi (TRUSG) gibi görüntüleme yöntemlerine başvurulur.

Tablo 1. WHO 1999 ve 2010 yılı semen parametreleri referans değerleri (34)

PARAMETRE	WHO-1999	WHO-2010
Semen hacmi (ml)	≥2	≥1,5
Toplam sperm (10 ⁶ /ejakülat)	≥40	≥39(33-46)
Sperm sayısı (10 ⁶ /ml)	≥20	≥15(12-16)
Motalite a+b (%)	>50	>40(38-42)
Hızlı ileri hareketli (%)	>25	>32(31-34)
Vitalite (%)	≥75	≥58(55-63)
Morfoloji (%)		4(3-4)
pH	≥7,2	≥7,2
Lökosit (10 ⁶ /ml)	<1	<1

1.1.9. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri:

1.1.9.1. Pretestiküler Nedenler:

1.1.9.1.1. Hipotalamus Hastalıkları:

1.1.9.1.1.1. Gonadotropin Eksikliği (Kalman Sendromu)

Hipogonadizm ile seyreden Kallman Sendromu 30.000 doğumda bir görülen infertilite nedenlerinden biridir. Olguların yaklaşık %11'i X kromozomuna bağlı gen mutasyonu gösterirken, diğerleri otozomal kalıtım şekli göstermektedir (34). Erken embriyonik dönemde X kromozomu üzerinde KAL-1 (Xp22.3) genindeki delesyonun neden olduğu Kallman sendromu, hipogonadotropik hipogonadizm ile karakterizedir (35).

1.1.9.1.1.2. İzole LH Eksikliği

İntratestiküler testosteron üretimini ve spermatogenezi uyarmak için yeterli ancak virilizasyonu teşvik etmek için yetersiz LH'nın üretildiği kısmi gonadotropin eksikliğine bağlıdır. Bu erkeklerin karakteristik olarak testisleri normal büyüklüktedir. Ejakulatlarında sperm sayısı azalmıştır. Plazma FSH seviyeleri normal olsa da serum LH ve testosteron seviyeleri normal veya düşük düzeydedir (36).

1.1.9.1.1.3. İzole FSH Eksikliği

Hipofizden FSH üretimi yetersizdir. LH mevcut olduğu için hastaların virilizasyonu normaldir. Testis büyüklüğü, LH ve testosteron seviyeleri normaldir. Sperm sayısı azoospermiden çok düşük sayılara (oligozoospermi) kadar değişiklik gösterir (36).

1.1.9.1.1.4. Doğumsal Hipogonadotropik Sendromlar

Prader-Willi sendromu genetik obesite, gelişme geriliği, küçük eller ve ayaklar, hipogonadizmle karakterize olup nedeni hipotalamik GnRH eksikliğidir. 15. Kromozom üzerinde tek gen delesyonu vardır. Bardet-Biedl sendromu GnRH eksikliğinin neden olduğu hipogonadotropik hipogonadizmin bir başka nadir, otozomal resesif formudur. Retardasyon, retinitis pigmentosa, polidaktili ve hipogonadizmle karakterizedir. Serebellar ataksi hipogonadotropik hipogonadizmle ilişkili olabilir (36).

1.1.9.1.2. Hipofiz Hastalığı

1.1.9.1.2.1. Hipofiz Yetersizliği

Tümörler, enfarktlar, cerrahi, radyasyon, infiltratif ve granüloamatöz süreçler hipofiz yetersizliğine neden olabilirler (36).

1.1.9.1.2.2. Hiperprolaktinemi

Dolaşımda PRL düzeyinin artmasına bağlıdır. En sık ve en önemli nedeni PRL salgılayan hipofiz adenomudur. PRL düzeyinin yükselmesi genellikle FSH, LH, testosteron seviyelerini azaltır ve infertiliteye neden olur. Libidonun azalması, empotans, galaktore ve jinekomasti ilişkili semptomlardır (36).

1.1.9.1.2.3. Eksejen Veya Endojen Hormonlar

Seks steroidlerinin, östrojenler veya androjenlerin fazlalığı testosteron-östrojen oranında dengesizliğe bağlı olarak erkek infertilitesine neden olabilir. Östrojen ve androjen fazlalığı hipofizden gonadotropin salgılanmasını azaltarak ve sekonder testis yetersizliğine neden olarak infertiliteye aracılık eder. Endojen ve eksojen glikokortikoidlere aşırı maruziyet spermatogenezde azalma ile sonuçlanabilir. Plazma kortizon seviyelerinin yükselmesi LH salgılanmasını baskılar ve sekonder

testis yetmezliğini tetikler. Anormal derecede yüksek veya düşük serum tiroit hormonu seviyeleri hem hipofiz hem de testis düzeyinde spermatogenezi etkiler (36).

1.1.9.2. Testiküler Nedenler

1.1.9.2.1. Kromozomla İlişkili Nedenler

1.1.9.2.1.1. Klinefelter Sendromu

Toplumda görülme sıklığı 500 erkek doğumda birdir. Erkek hipogonadizminin ve erkek infertilitesinin en sık görülen nedenlerindendir (37). Olguların %80'inde konjenital sayısal kromozomal aberasyon (47,XXY) sorumlu iken, %20 olguda 46,XY/47,XXY mozaizmi veya 48,XXYY gibi bir ya da daha fazla Y kromozomu görülür (38). Bu sendromun klasik üçlemesi küçük, sert testisler; jinekomasti ve azospermiden ibarettir (36).

1.1.9.2.1.2. 46,XX Male Sendromu

XX erkekler, dişi karyotipi gösterirler, ancak fenotipik olarak erkektirler. Dişi genital taşımazlar (39). Bu genetik bozukluğun prevalansı 1:10.000-1:20.000 arasındadır. Rekombinasyon sırasında SRY, X kromozomuna yapıştığı için gonadlar testise dönüşür ancak azospermi faktör (AZF) genleri Y kromozomu üzerinde kalacağı için XX erkekler azospermiktir ve infertildir (40).

1.1.9.2.1.3. 47, XYY Erkekler:

Bin canlı erkek doğumda bir görülür. Erkekte mayoz II esnasında Y kromozomundaki ayrılmama nedeniyle oluşur. Bu olgular genellikle fertildirler (38). Hormon değerlendirmesinde FSH yükselmiş, testosteron ve LH seviyeleri normaldir. Semen analizinde oligozoospermi veya azospermi tespit edilir (36).

1.1.9.2.2. Diğer Nedenler:

1.1.9.2.2.1. Noonan Sendromu:

Karyotip normal (46,XY) veya mozaiktir (X/XY). Doğumda %75'nin erişkin dönemde fertilitiyi kısıtlayan kriptorşidizmi vardır. Testisler tam inmişse fertilité mümkündür (36).

1.1.9.2.2.2. Miyotonik Distrofi

Erişkin dönemde başlayan kas distrofisinin en sık karşılaşılan nedenidir. Erkeklerin çoğunda testis atrofisi olsa da fertilité bildirilmiştir. İnfertil erkeklerin düşük veya normal testosteron ile birlikte yükselmiş FSH ve LH düzeyleri vardır (36).

1.1.9.2.2.3. Kaybolan Testis Sendromu

Testisler ftaltorsiyon, travma, vasküler zedelenme ve enfeksiyona bağlı olarak kaybedilmiştir. Karyotip normaldir. Serum FSH ve LH seviyeleri yüksek, testosteron seviyeleri çok düşüktür (36).

1.1.9.2.2.4. İzole Sertoli Hücresi Sendromu

Germ hücre aplazisi de denilen izole sertoli hücresi sendromlu hastalar testis biyopsileri germinal epitel dışında tüm testis hücrelerinin var olduğunu gösteren azospermik erkeklerdir. Testosteron ve LH seviyeleri normal, FSH seviyeleri ise yükselmiştir (36).

1.1.9.2.2.5. Y Kromozomu Mikrodelesyonları:

Y kromozom mikrodelesyonları azosperminin en yaygın nedenlerinden biridir (41). Yq distal bölümü üzerinde bulunan AZF bölgesi sperm gelişimi ve farklılaşmadan sorumludur (42). AZF gen bölgesi delesyonu için tarama endikasyonları sperm sayısına göre konulmaktadır ve azospermik veya şiddetli oligospermik hastalar bu endikasyonu oluşurmaktadır (43).

Yq üzerinde birçok gen tanımlanmıştır ve delesyonları sıklıkla nonobstruktif azospermili erkeklerde izlenir (44). Azospermik erkeklerin %13'nde, şiddetli oligospermiklerin ise %6'sında DAZ delesyonu izlenmektedir (45).

AZF bölgesi delesyonlarının %69'u AZFc, %6'sı AZFa ve %14 AZFb bölgesinde görülmektedir. Kalan kısım ise bu bölgelerin kombine delesyonları şeklindedir (46). AZFc bölgesi içinde ek bir AZFd bölgesi tanımlanmıştır, ancak prognostik önemi yoktur (47). AZFc delesyonu olan erkeklerin 2/3'ünün ejakulatında az da olsa sperm bulunabilmektedir (48). AZFc delesyonu olan azospermik olgularda testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) işlemi ile %58-75 oranında sperm bulunabilmektedir (49). AZFb delesyonu olan erkeklerde ejakulatta veya TESE ile sperm bulma şansı ciddi oranda düşüktür (50). AZFb delesyonlarında genellikle

azospermi ile birlikte testiste parsiyel mayotik arrest ve nadiren de “elongated” spermatid görülür. Bu nedenle tam AZFb delesyonu varlığında TESE işlemi yapılmamalıdır (51). AZFa bölgesinin tamamını içeren delesyon varlığında testis biyopsisinde “Sertoli Cell Only” (SCO) sendromu görülür. (52).

1.1.9.2.3. Gonadotoksinler

Radyasyon ve çeşitli ilaçlar testisler üzerine etki ederek infertiliteye neden olabilirler (36).

1.1.9.2.4. Sistemik Hastalıklar

Böbrek yetmezliği, karaciğer sirozu ve orak hücreli anemi çeşitli mekanizmalar ile testisler üzerine etki ederek infertiliteye neden olabilirler (36).

1.1.9.2.5. Defektif Androjen Aktivitesi

1.1.9.2.5.1. 5 Alfa Redüktaz Eksikliği

Testislerin ve Wolf kanalları türevlerinin (iç genital organlar) normal gelişmesi ile birlikte belirsiz dış genital organların oluşmasına yol açar. Skrotuma inmiş testislerde spermatogenez tanımlanmış olmasına rağmen bu hastalarda fertilitate bildirilmemiştir. İnfertilite geniş ölçüde dışgenitallerin fonksiyonel bozukluklarına bağlı olabilir (36).

2.9.2.5.2. Androjen Reseptör Eksikliği

Androjen reseptörü geni, Xq11.2-12’de yer almaktadır. Androjen reseptörü geninde meydana gelen mutasyonlar 46,XX infertil kadın ve 46,XY azospermik erkek fenotiplerine neden olmaktadır (53).

1.1.9.2.6. Testis Hasarlanmaları

Orşit, torsiyon ve travma bu grup içerisinde sayılabilir (36).

1.1.9.2.7. Kriptorşidizm

Bir gelişim kusuru olduğu düşünülmekte ve testisi kanserleşme riski altına sokmaktadır. Yenidoğanda inmemiş testis morfolojik olarak normal olmasına rağmen 2 yaşına gelindiğinde sıklıkla erken evredeki germ hücrelerinde bozulma görülmektedir (36).

1.1.9.2.8. Varikosel

Skrotal venlerin pampiniform plexusunu içinde genişlemiş ve kıvrımlaşmış olarak tanımlanmaktadır. Birçok nedenle testisi etkileyerek infertiliteye neden olmaktadır (36).

1.1.9.2.9. İdiyopatik

İnfertil erkeklerin en azından %25-50'sinde herhangi bir tanımlanabilir neden yoktur (36).

1.1.9.3. Posttestiküler Nedenler

1.1.9.3.1. Reprodüktif Yol Obstrüksiyonu

1.1.9.3.1.1. Doğumsal Blokajlar

1.1.9.3.1.1.1. Kistik Fibrozis

Kistik Fibrozis otozomal resesif bir hastalıktır. CFTR genindeki (7q31.20) mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Olguların %90'ı konjenital bilateral vaz deferens agenezine bağlı olarak OA'dır (55). Beyaz ırkta en yaygın görülen genetik hastalıktır; beyaz ırkın %4'ü CFTR gen mutasyon taşıyıcısıdır. CFTR geni iyon kanalı olarak görev yapan ve ejakulatuar kanal, seminal vezikül, vaz deferens ve epididimin distal 2/3'ünün formasyonunu etkileyen bir membran proteinini kodlamaktadır (55).

Vaz deferensin tek taraflı agenezi genellikle aynı taraf böbreğin yokluğu ile birlikte ve olasılıkla değişik genetik bir nedene dayanmaktadır (56,57). Olguların kadın partnerlerinde de CFTR mutasyonu araştırılmalı ve ÜYT öncesinde genetik danışmanlık verilmelidir (58).

1.1.9.3.1.1.2. Young Sendromu

Kronik sinüzit, bronşiyektazi ve obstruktif azospermi üçlemesi gösterir (36).

1.1.9.3.1.1.3. Erişkin Polikistik Böbrek Hastalığı

İnfertilite genellikle epididim veya seminal veziküldeki tıkaçıcı bir kistin varlığına bağlıdır (36).

1.1.9.3.1.1.4. Ejakülatuvar Kanal Blokajı

Obstruksiyon doğumsal olabildiği gibi Müller kanalı kistleri (divertikülleri), doğumsal atrezisi, seminal vezikül taşları, cerrahi veya enflamasyon sonrası skar dokusunun oluşumuna bağlı olabilir (36).

1.1.9.3.1.2. Edinsel Blokajlar

Vazektomi, kasık ve fitik cerrahileri, bakteriyel enfeksiyonlar bu grup içinde sınıflandırılabilir (36).

1.1.9.3.1.3. Fonksiyonel Blokajlar

Seminal veziküller veya vaz deferensin kasılma yeteneğini bozan sinir zedelenmesi veya ilaçlar neden olabilir (36).

1.1.9.3.2. Sperm Fonksiyon veya Hareketliliği İle ilgili Hastalıklar

1.1.9.3.2.1. Hareketsiz Siliya Sendromları

Spermdeki defektlerin nedeni sperm ve diğer siliyalı hücrelerin aksonemlerindeki anormalliklerdir. Kartagener sendromu bir örnektir (36).

1.1.9.3.2.2. İmmünolojik İnfertilite

Testis yüksek oranda antijenik sperm içermektedir. Vazektomi, testis torsiyonu veya testis biyopsisi sonucu birpatolojik immun mekanizmanın tetiklenmesi sonucu sperm antikörlerinin oluşması otoimmun infertiliteye yol açmaktadır (36).

1.1.9.3.3. Cinsel Birleşmeye İlişkin Bozukluklar:

Empotans ve hipospadiyas bu grup içinde sınıflandırılabilir (36).

1.1.10. İyon Kanallarının Fertilizasyon Üzerine Etkileri

1.1.10.1. Fertilizasyonun Moleküler Temeli

Spermatogenezin başlamasından 72 gün sonra sperm epididimin kuyruğuna ulaşır. Motilite ve fertilizasyon yeteneği epididimdeki transport sırasında yavaş yavaş kazanılır. Ejakulasyon sonrası semen önce koagüle olur, daha sonra 20-30 dakika içinde prostat enzimleriyle likefiye olur. Alkali pH vajenin asidik ortamında spermleri geçici olarak korur, vajende kalan spermler iki saat içinde fonksiyonlarını

yitirirler. Cinsel ilişki sonrasında vajene giren ejakulattaki spermelerin %35'i geri akımla kaybedilir. Ejakulasyondan 90 saniye sonra sperm servikal mukusa ulaşır. Ancak, bunların sadece %1'i üst genital sisteme ulaşır (59).

Erkek spermının yumurta ile birleşebilmesi için kadın genital sisteminde belli bir süre kalması gerekmektedir. Sperm fertilizasyon yeteneği elde etmesi için bazı gerekli hücrel değişiklikler olmalıdır ve buna sperm kapasitasyonu adı verilir. Bu olay sonunda sperm hiperaktif motilite özelliği kazanır, akrozom reaksiyonunu gerçekleştirebilir ve zona pellusidaya bağlanabilir. Kapasitasyon sadece memeli spermalarında gerçekleşen bir olaydır (59).

1.1.10.1.1 Sperm Kadın Genital Sistemindeki Transportu:

Kadın genital sistemindeki transportu sırasında sperm fertilizasyonu başarmak için bazı fonksiyonlar kazanmaktadır. Seminal sıvı ve epididimde bulunan kolesterol ve benzeri maddeler yolculuk sırasında sperm yüzeyinden arınmaktadır. Yardımcı üreme tekniklerinde kullanılan spermelerin "swim up" ve/veya benzeri yöntemlerle yıkanmasındaki amaç, kapasitasyon benzeri bir durum sağlamak ve yüzeylerindeki kapasitasyonu önleyici maddelerden kullanılacak spermeleri arındırmaktır. Kapasitasyon sırasında gerçekleşen önemli olayların başında proteinlerin fosforilasyonu ve kalsiyumun sperm içine girmesi gelir (59).

Boyutuyla karşılaştırıldığında sperm, fertilizasyonu sağlayabilmek için çok uzun bir yolculuk yapmak zorundadır. Sperm uterus bileskeye yönelmesi ve buradan geçip yumurta ile buluşup onun ekstrasellüler matriksine girmesi sürecinde çok sayıda moleküler olay eşlik eder. Beta-defensin 126 (DEFB126) adı verilen ve sperm dış yüzeyinde bulunan bir protein kanal epitelleri üzerinde sağlanan elektrik yükü sayesinde sperm kolayca ilerleyip servikal mukustan geçmesini kolaylaştırmaktadır. DEFB126 ve benzeri proteinler erkek aksesuar bezlerinden salgılanır ve bunların sperm hareketindeki önemi bu proteinin olmadığı knock-out (genetiği değiştirilmiş) farelerde gösterilmiştir (59).

Sperm kadın genital kanalının uterus bileske, istmus ve ampullada hareketi biyolojik olarak yönetilmektedir. Tubanın istmus bölgesindeki mukozal katlantılar ve mukus varlığı sperm ampullaya geçişini yavaşlatır, böylece fallop tüpünde sperm geçirmesi gereken süreyi uzatır ve polispermik fertilizasyonu

engeller. Sadece kapasitasyon sürecini tamamlayan spermiler ampullaya doğru ilerleyebilirler (59).

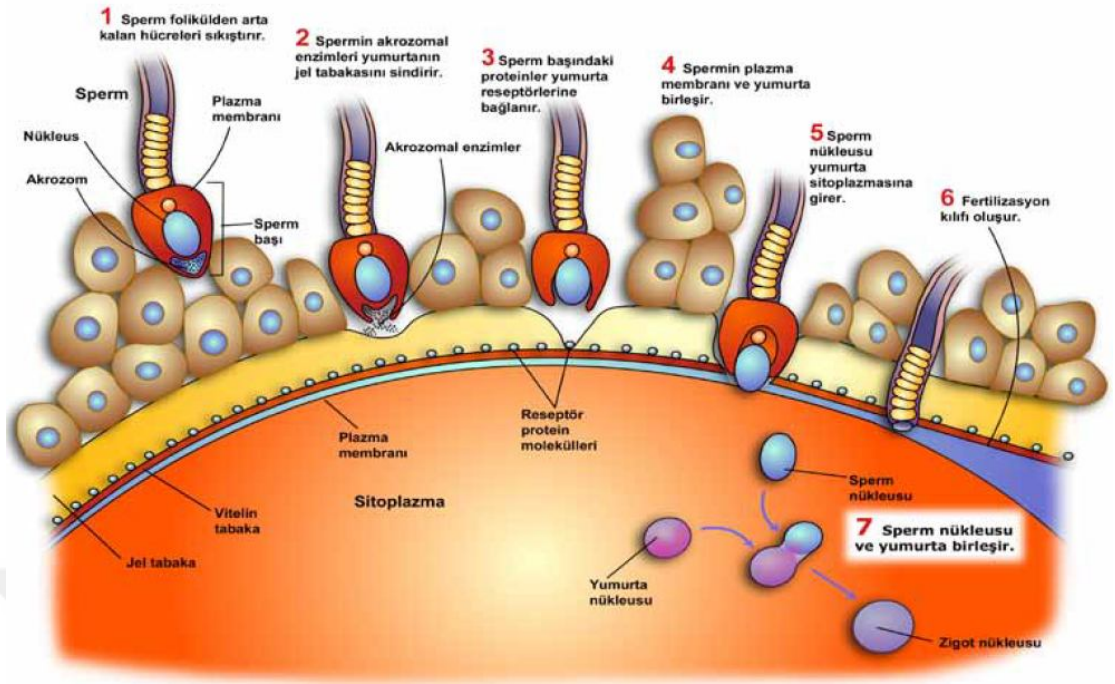
Ejakulattaki 200-300 milyon sperminden yalnızca birkaç yüz adedi (<1000) oositin yakınına ulaşabilir. Tubada sperm rezervuarı oluşmaz. Endosalpingeal epitel sperm fertilité ve motilitesini korumak için en uygun ortamdır. Uterotubal bileşkeyi geçmek için sperm yüzey membran proteinleri (calmegin, fertilin β , testis spesifik ACE), Adam1a, Adam2, veya Adam3 gerekir. Bu proteinlerin eksikliğinde normal motilité ve morfoloji sağlansa bile tubal geçiş garanti edilememektedir. Uterotubal bileşkeyi geçen spermiler istmus üzerindeki mukozal katlantılar üzerinde fertilizasyon oluşana kadar bekler. Bu evrede annexin ailesinden bazı proteinler sperm bağlama ve istmusda sperm depolamada görev alır. Bu proteinler erkek seminal vezikülünden salgılanır (59).

Kadında ovulasyona yaklaştıkça bazı faktörler sayesinde sperm istmusdan ayrılır ve ampullaya doğru hareketlenir. Bu hareketi ancak kapasitasyonu tamamlayabilen spermiler yapabilmektedir. Spermin kadın genital kanalındaki hiperaktif hareketleri de kapasitasyon sonrasında kazanılır (59).

CatSper spermdeki katyon kanal protein ailesindedir, CatSper1 $-/-$ fare spermileri istmus epitelinden ayrılamamakta ve ampullaya doğru hareket edememektedir (59).

CatSper1 kanalları sayesinde kalsiyum hücre içine alınmakta, spermin hiperaktif hareketlerinin oluşturulması sağlanmaktadır. CatSper1 genini kodlayan proteindeki bir mutasyonun infertilite sebebi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İstmusta kapasitasyonunu tamamlayamayan spermilerin hareketlerinin engellenmesi, birden fazla sperm tarafından fertilizasyonu önlemektedir (59).

Sperm depolandığı bölgeden ampullaya hareket ettiğinde tek amacı kumulus yumurta kompleksini (KYK) bulmak ve fertilizasyonu gerçekleştirmektir. KYK zona pellusida (ZP) ile çevrili ovulasyonu bitmiş yumurtadan oluşmaktadır. Spermin KYK'yı bulmasına moleküler düzeyde yardımcı proteinler bulunmaktadır. Bu maddeler hem KYK'da, hem de foliküler sıvı içinde bulunmaktadır. Progesteron bunlara bir örnektir (59).



Şekil 6. Sperm kumulus yumurta kompleksine girişi (59)

1.1.10.1.2. Akrozom Reaksiyonu

Akrozom sperm başında bulunan bir yapıdır. Akrozom reaksiyonu sadece kapasitasyonunu tamamlamış sperm tarafından gerçekleştirilebilir ve sperm yumurta birleşmesi için ön koşuldur (59).

Akrozom reaksiyonunun in vitro gerçekleştirilmesi için ZP'nin bütünlüğünün bozulmuş olması gerekmektedir. Bunun yanında intakt ZP ile yapılan çalışmalarda akrozom reaksiyonu gerçekleşmemektedir. Akrozom reaksiyonunun kumulus hücreleri tarafından uyarıldığını ve ZP ile alakalı olmadığını öne sürmektedirler. Kumulus hücrelerinden salgılanan progesteronun akrozom reaksiyonunu başlattığı da gözlemlenmiştir (59).

Bununla beraber %20–40 oranında kapasitasyonun tamamlandığı İVF ortamında hücrelerin kendi kendine akrozom reaksiyonunu gerçekleştirdiği, herhangi ek bir tedaviye gerek göstermediği anlaşılmıştır. Bu spermelerin de herhangi bir tedaviye gerek duyulmadan in vitro yumurtalarla herhangi bir “Kumulus Ooforus (KO)” ve ZP olmadan fertilizasyonu gerçekleştirdiği görülmüştür. Bundan dolayı akrozom reaksiyonu için doğrudan sperm ZP bağlantısı gerekmediği, hatta bunun in vivo fertilizasyon için bile gerekliliğinin tartışmalı olduğu belirtilmiştir. Akrozom reaksiyonunun mekanizması açıktır. Kalsiyumun hücre içine transportu sonrası

fosfolipaz C (PLC) ve aktive PLC PIP₂'den IP₃ ve diaçilgliserol (DAG) oluşturur. IP₃ hücre içi depolardan Ca⁺² salınımına neden olur ve DAG sayesinde PKC aktivasyonu ve gerekli proteinlerin fosforilasyonu gerçekleştirilir (59).

1.1.10.1.3. Zona Pellusida (ZP)

ZP üç glikolize edilmiş proteinden oluşmaktadır ve bunlar Zp-1, -2 ve -3 olarak adlandırılmaktadır. Bunlardan Zp-3'ün sperm reseptörü olduğu ve akrozom reaksiyonunu başlattığı gösterilmiştir. Zp-2'nin akrozom reaksiyonunu bitirmiş sperm için ZP'den geçerken bir reseptör olduğu düşüncesi kabul görmüştür. Fertilize olan yumurtada Zp-2 Zp-2f'ye dönüşür ve diğer spermelerin aynı işi yapmasını engeller. Zp-1, Zp-2/Zp-3 bağlanmasını sağlar ve ZP'nin ipliksi yapısının oluşmasından sorumludur. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda Zp-1 ve -2'nin olmadığı durumlarda dahi ZP oluşmakta ve yumurta fertilize olabilmektedir. Zp-3'de bir bozukluk olduğunda ise ZP oluşmamaktadır. ZP'si olmayan veya çok zayıf olan yumurta hücreleri (Zp3^{-/-} ve Zp2^{-/-} yumurtalar) normal sperm ile fertilize olabilmektedir. Zp-4 insan ve diğer benzeri canlılarda tanımlanmış fakat fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır. Zp sadece bir reseptör değil, aynı zamanda türe özgü bir bariyerdir. Örneğin Rankin fare Zp-2 ve Zp-3'ünü insanınki ile değiştirmiş ve hem fare hem de insan spermi ile fertilizasyonu incelemiş, fakat sadece fare sperminin yumurtayı fertilize edebildiğini göstermiştir. Zp-3'un primer sperm reseptör olduğu ve türe özgü seçiciliğinin de peptid sıralanmasından kaynaklandığı gösterilmiştir (59).

1.1.10.1.4. ZP Penetrasyonu

Sperm yüzeyindeki hücre yüzey proteazları proteinlerin bütünlüğünü bozarak spermin yumurta içine girmesini sağlamaktadır (59).

Acr bir akrozomal enzimdir ve akrozom reaksiyonu sonrasında ortaya çıkar. Acr enziminin önemli olduğuna dair çok sayıda yayın olsa da Acr^{-/-} spermler fertilizasyon gerçekleştirebilmektedir. Baba ve arkadaşları yaptığı çalışmalarda Acr-knock-out farelerde spermlerin fertilizasyon yetenekleri alternatif proteazların kullanılmasına bağlanmaktadır. Beş testis spesifik serin proteaz bulunmuş ve Tesp1–Tesp5 olarak adlandırılmıştır. Bunlardan sadece Tesp5 “knockout” olan fareler üzerinde çalışılmış ve bunların ZP'ye bağlanması ve yumurta ile birleşmesinde

yavaşlama olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda erkek ve dişi arasında ortak kompleks bir yapı olduğu üzerinde durulmaktadır (59).

1.1.10.1.5. Sperm Yumurta Birleşmesi:

ZP'yi geçen akrozom reaksiyonunu tamamlamış spermler hemen yumurtanın plazma membranına yapışır. Sadece akrozom reaksiyonunu tamamlamış spermlerdeki “fusogenler” aktive olabilmektedir. Mn9, Cd46 ve Izumo1 gibi sperm antijenleri sadece akrozom reaksiyonu bitmişse antikorlarla reaksiyona girebilmektedirler. Bunlardan OBF13 bir monoklonal antijendir ve sperm-yumurta füzyonunu engellemektedir. Aynı aileden olan antijenler füzyon için önemli adaylardır. Izumo1^{-/-} erkek farelerde mutant spermler ZP'yi geçip yumurtaya ulaşsalar dahi tamamen infertildirler. Izumo1^{-/-} erkek farelerde mutant spermler kullanılarak yapılan ICSI'de birleşme aşaması “bypass” edildiği için yumurta fertilize olabilmekte ve sıçan uterusuna yerleştirildiğinde gelişim devam edebilmektedir. Bu nedenle Izumo1 proteini yumurta sperm birleşebilmesi için önemlidir. Akrozom reaksiyonu sonrasında Izumo1 füzyonu gerçekleştiren spermin başının ön kısmında yerleşmektedir. Testis-spesifik serine kinaz 6 (Tssk6) eksikliği olan farelerde ZP'ye bağlanmada Izumo1 üzerinden ilerleyen mekanizmada bozulma oluşmaktadır. Yumurta üzerindeki $\alpha 6\beta 1$ integrin sperm için önemli bir füzyon proteindir. Bazı araştırmalarda bunun olmazsa olmaz bir bağlanma proteini olmadığı gösterilmiştir. Bunların içinde tetraspan Cd9 bir yumurta yüzey proteindir ve fertilizasyon için önemlidir. Cd9 birçok hücre tarafından sunulan bir proteindir. Cd9'un farelerde sperm yumurta birleşmesi için önemli olduğu gösterilmiştir. Izumo1 spermin yumurtaya bağlanmasında önemliyken Cd9'da yumurtanın sperme bağlanmasında önemlidir. Bu ikisinin beraber hareket ettiğine dair görüşler de bulunmaktadır (59).

1.1.11. İyon Kanallarının Sınıflandırılması:

İyon kanalları kapı ile sınıflandırılabilir ve voltaj kapılı iyon kanalları plazma membranında voltaj gradientine bağlı olarak açılır veya kapanır. Pekçok voltaj kapılı iyon kanalları için gözenek oluşturucu alt birimler α -alt birimdir ve yardımcı alt birimler β , δ ve v.b. olarak adlandırılır. Bazı kanallar, sadece pozitif (katyon) ve negatif (anyon) yüklü iyonların geçişine izin verir. Voltaj kapılı iyon kanalları

genellikle Na^+ , Ca^{++} ve K^+ iyonların selektif iletkenliğine dayalı olarak sınıflandırılır. Ligand kapılı kanallar bir ligandın kanala bağlılığında açık veya kapalıdır. Ligand kapılı iyon kanallarının temel sınıflaması asetilkolin, 5-hidroksitriptamin ve γ -aminobütirik asit gibi primer sinyal transmitterlerine göre yapılır (60).

1.1.11.1. CatSper İyon Kanal Ailesi:

Katyon kanal sperm (cation channel sperm; CatSper), sperm spesifiktir, zayıf voltaj bağımlıdır, kalsiyum selektiftir, pH duyarlıdır, sperm hücrelerinin içine pozitif yüklü kalsiyum iyonlarının girişini kontrol eder, sperm hiperaktivasyonunda ve erkek fertilitesinde gereklidir (61).

CatSper dört ayrı gözenek oluşturuca alfa alt birimden oluşan heterotetramerik kalsiyum kanalıdır. CatSper 1-4 ve üç yardımcı alt birim vardır: CatSper β (beta), CatSper γ (gama) and CatSper δ (delta), en az yedi gen ile kodlanır (şekil 8). Çeşitli alt birimlerin katılımı kanalı kompleks hale getirir; bununla birlikte spermatozoanın fonksiyonel koordianasyonu için, flagella da lokalizedir ve intrasellüler pH'ya duyarlıdır, progesteron, prostaglandinler, kokular, bazı başka proteinler ve hücre sinyal molekülleri aktivasyonu için gereklidir. İlk gözenek oluşturan CatSper alt birimi, CatSper1, 2001 yılında keşfedilmiş ve özel olarak spermatozoa da ve erkek üreme sistemi için gerekli olduğu bulunmuştur. CatSper1, voltaj kapılı kalsiyum selektif kanalların araştırılması esnasında bulundu. CatSper2, bir sinyal peptid trapping metodu kullanılarak bir sperm hücre spesifik kopya gibi tespit edildi. Ailenin diğer iki üyesi olan CatSper3 ve CatSper4 daha sonra tanımlanmıştır (61).

CatSper1 insanda 11q13.1 kromozom bölgesinde lokalizedir, 12 ekzona sahip olup 780 aminoasit kodlamaktadır. CatSper2 15q15.3 kromozom bölgesinde lokalizedir, 14 ekzon içerip 528 aminoasit ile kodlanmaktadır. CatSper3 5q31.1 kromozom bölgesinde lokalizedir, 8 exona sahip olup 398 aminoasit ile kodlanmaktadır. CatSper4 1p36.11 kromozom bölgesinde lokalizedir, 10 exona sahip olup 472 aminoasit ile kodlanmaktadır. CatSper beta, CatSper'in yardımcı alt birimi database araştırması ve reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak tespit edilerek ilk rapor edilmiş olup, CatSper β insanda 14q32.12 kromozom bölgesinde lokalizedir, 27 exona sahip olup 1116 aminoasit ile kodlanmaktadır (62). CatSper beta iki transmembran segmenti ile iki kısa sitoplazmik alan ve bir büyük

extrasellüler alan içermektedir (61). Diğer yardımcı alt birim, CatSper γ insanda 19q13.13 kromozom bölgesinde lokalizedir, 29 exonu sahip olup 1159 aminoasit ile kodlanmaktadır (62). Bir tek transmembran segment ile bir büyük ekstrasellüler alan ve bir küçük sitoplazmik kuyruktan oluşmaktadır (61). CatSper δ geni son zamanlarda bir database araştırması ile tanımlandı ve bir subünit kodları, bir tek transmembran segmenti ile büyük bir ekstrasellüler alan ve bir kısa sitoplazmik kuyruktan oluşmaktadır (61). CatSper δ insanda 19p13.3 kromozom bölgesinde lokalizedir, 22 exonu sahip olup 798 aminoasit ile kodlanmaktadır (62). İnsanlar ve farelerde CatSper subünitlerinin kromozomal lokalizasyonu ve Ensembl gen kimlikleri tablo 2’de listelenmiştir.

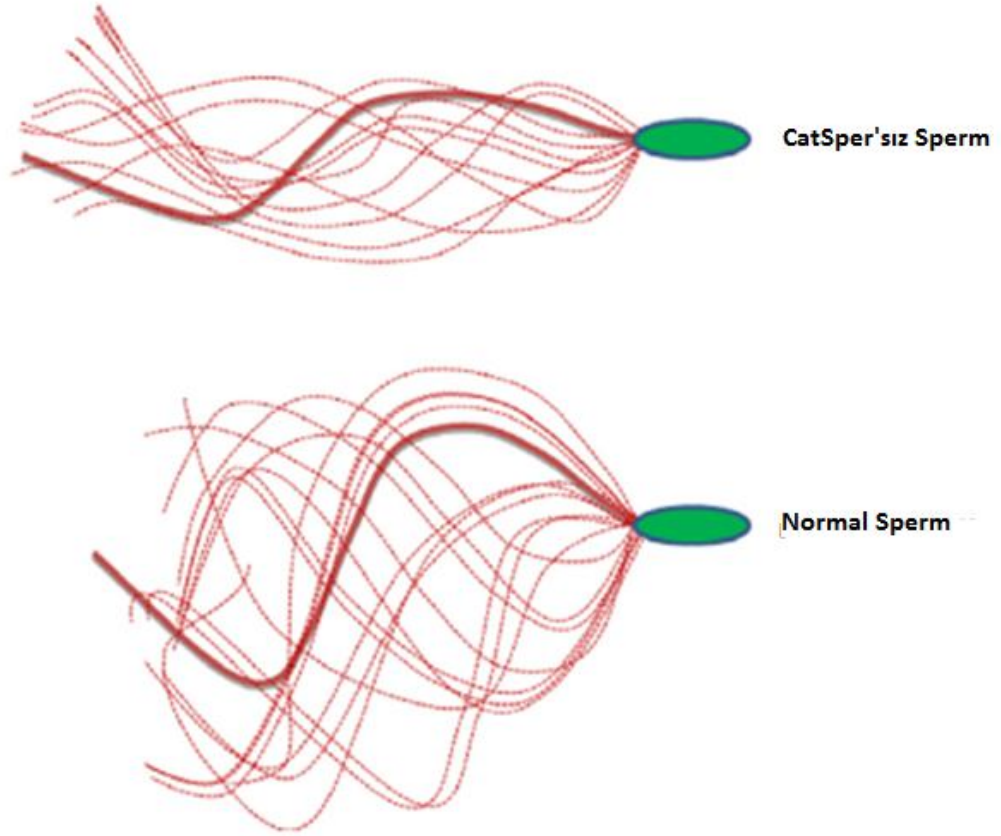
Tablo 2. İnsanlar ve farelerde CatSper subünitlerinin kromozomal lokalizasyonu ve Ensembl gen kimlikleri (61).

GEN ADI	KROMOZOM İNSAN	ENSEMBL TANIMLAYICI	KROMOZOM FARE	ENSEMBL TANIMLAYICI
CatSper 1	11q13.1	ENSG00000175294	19A	ENSMUSG00000038498
CatSper 2	15q15.1-15.3	ENSG00000166762	2E5	ENSMUSG00000033486
CatSper 3	5q31.1	ENSG00000152705	13B1	ENSMUSG00000021499
CatSper 4	1p36.11	ENSG00000188782	4D3	ENSMUSG00000048003
CatSper β	14q32.12	ENSG00000133962	12E	ENSMUSG00000047014
CatSper γ	19q13.2	ENSG00000099338	7B1	ENSMUSG00000049123
CatSper δ	19p13.3	ENSG00000174898	17D	ENSMUSG00000040828

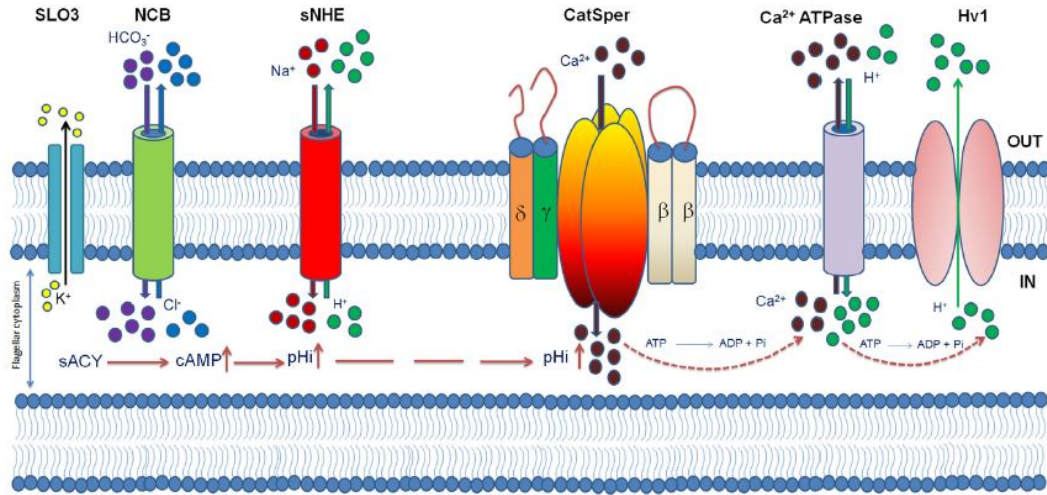
CatSper diğer voltaj kapılı kalsiyum kanallarına benzerdir. Çift değerlikli katyonların yokluğunda, sodyum ve sezyum gibi tek değerli katyonları iletebilir; bununla birlikte CatSper’in afinitesi çift değerli katyonlara daha yüksektir. CatSper kanalları, normal fizyolojik koşullar altında, sperm membran potansiyeli ve intrasellüler pH gibi değerlerde minimal seviyede aktif kalır, agonistler ve fizyolojik uyarının varlığında sadece potansiyel olarak aktiftir. Voltaj kapılı iyon kanallarının bir kısmı testis, spermatositler ve spermatozoada tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, iyon kanal proteinlerinin bazıları diğer dokularda gözlenebilir, beyin gibi, bu durum sperm fizyolojisi için eşsiz bir fksiyonel öneme sahip olan iyon kanallarının ayırt edilmesini zorlaştırıyor. Bu nedenle Ren ve Xia, 2010 yılında sperm fizyolojisinde önemli olan iyon kanallarını belirlemek için birkaç ayırıcı özellik önerdi; 1) protein spermde saptanabilir olmalı ve antikör spesifitesi için bir negatif kontrol olarak knock-out sperm ile doğrulanmış olmalıdır; 2) tüm sperm akımı patch-clamp

kayıtları ile saptanabilir olmalı; 3) yüksek selektif sperm iyon kanal blokörlerinin uygulanması doğal fizyolojik aktiviteleri etkileyerek sperm fonksiyonlarını bozmalı; 4) sperm fizyolojisi ve erkek fertilesindeki kusurlar ile proteini kodlayan genin mutasyonları ve hedeflenen genin bozulması. CatSper bu belirtilen kriterlerinin çoğunu karşılaması üzerine spermatozoa da fizyolojik önemi olan bir kanal yapmaktadır (61).

CatSper kanalı, fare ve insanlarda sperm flagellumunun ana parçasında lokalizedir. Kalsiyum girişi ile spermde intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu yükselir, sperm hareketleri daha hızlanır ve güçlenir. Ayrıca, kalsiyum kanalının benzersiz bu sınıfı hiperaktif sperm motilitesinde, dişi üreme yolunun epitelyumunda sperm ayrışmasında, yumurtaya penetrasyonda ve fertilizasyonda gerekli olduğu gösterilmiştir. Hiperaktif motilite, asimetrik yüksek amplitüdü ve düşük frekanslı flagellar vuru ile karakterizedir, fertilizasyon alanına, isthmik rezervuara ulaşmak serbest sperm için esansiyeldir, daha sonra yumurtayı çevreleyen zona pellucidaya doğru penetrasyon ile sonuçlanmaktadır (şekil 7). CatSper kanalı, diğer iyon kanalları ve pompaları ile birlikte, sperm motilitesinde hızlı değişiklikler için gerekli kalsiyum girişini kolaylaştırır, fertilizasyon için spermin yumurtaya yerleşmesi sırasında dişi reproduktif sistem engellerine doğru yolculuğuna izin vermektedir. Spermatozoa kadın üreme yolunda muhtemelen birden çok sinyal alır, spermatozoanın hiperaktif motilite kazanması ve yumurtayı fertilize etmesi için bilgi ve işaret sağlamaktadır. İnsanlarda, CatSper kanal mutasyonlarının infertilite ile ilişkili olduğu bulunmuştur (61).



Şekil 7. Normal sperm ve CatSper'sız sperm (61).



Şekil 8. CatSper'in fonksiyonu ve düzenlenmesi (61).

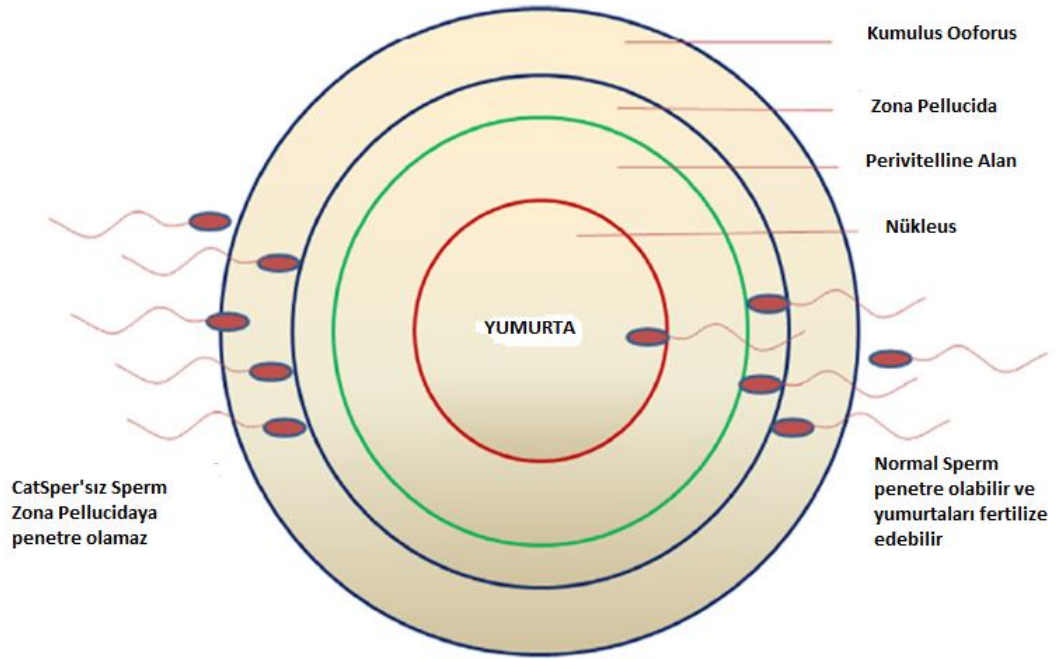
Dört CatSper alt birimleri transmembran bölgelerinde nispeten düşük bir dizi benzerliğe sahiptir, varyasyon formları %16-22'dir. İnsan CatSper benzerlikleri fareye göre yüksektir (%55 benzerlik); transmembran alanında %81 benzerlik ve por bölgelerinde %89 benzerlik göstermektedir. Dört ayrı gözenek oluşturuca CatSper-

alfa subünitlerinin her biri altı transmembran segmentine sahiptir (S1-S6) ve iki fonksiyonel farklı modülü vardır: voltaj duyarlı alan (S1-S4) ve gözenek oluşturucu alan (S1-P loop-S6). CatSper alfa subünitlerinin (CatSper 1-4) dördüncü transmembran segmenti (S4) birkaç pozitif şarjlı aminoasit rezidüleri içermektedir (lizin/arjinin). CatSper1, kuvvetli voltaj sensitif kanallardaki gibi aynı davranışta olan altı pozitif şarjlı aminoasit (lizin/arjinin) içermektedir. CatSper2, dört rezidü, CatSper3 ve CatSper4 sadece iki rezidü içermektedir (61).

CatSper genlerinin bozulması ile spesifik motilite parametreleri belirgin azalmıştır. Basit bir mikroskopik inceleme ile motiliteyi ölçerek CatSper +/+ ve CatSper-/- sperm arasındaki farkı tespit etmek mümkün olabilir. Canlı spermın ayrıntılı bir motilite analizi, tercihen bilgisayar destekli otomatik sperm analizörü kullanılarak, mutant ve normal tip sperm arasında önemli farklılıklar ortaya çıkabilir. Bilgisayar destekli sperm analizi yol hızı, ilerleyici hız ve rota hızı gibi spesifik motilite parametrelerinin, mutant spermde anlamlı derecede bozulduğunu göstermektedir. CatSper1'siz farelerin sperm yüzme hızında bir azalma bulunmuş, daha sonra CatSper'sız spermın başlangıç motilitesinin normal ve CatSper'sız fare spermının en önemli kusurunun hiperaktif motilitenin eksikliği olduğu bildirilmiştir. Normal tipte spermın flagellar vuru aktivitelerinin CatSper1'siz spermatozoa ile başarılı bir karşılaştırılmasında, mutant spermatozoa hiperaktif motilite sergileyemediği ve onların flagellar vurusunun düşük eğrilik ile simetrik ve kapasitasyon ortamında küçük amplitüdlü kaldığı gösterilmiştir (Şekil 7). Çalışmalar CatSper'sız fare spermının yüksek visköz ortamda normal tip fare sperminden daha az motil olduğunu göstermiştir. Hiperaktivasyon, ovidukta sperm migrasyonu için esastır, özellikle kadın üreme sisteminde sperm deposu olan alt istmustan kaçmak için gereklidir. Ancak, in vivo hareketlilik davranışı değerlendirmek zor olmuştur. CatSper knock-out sperm sadece bazal motilitesini korur, onlar hiperaktif motilitenin in-vivo mekanizmasını test etmek için bir modeli temsil eder. Ayrıca mutant sperm oviduktal sperm deposunun ötesine taşınmayabilir, büyük olasılıkla ovidukta yapışık epitelyal hücrelerin mekanik gücünden kurtulması yetersizdir yani kemotaksisi eksiktir. Hiperaktif motilitenin yokluğunda sperm fizyolojik olarak kusurlara sahiptir, ovidukta yüksek visköz ortama doğru geçişte ve yumurtanın

yüzeyinde kumulus oophorus ve zona pellucida gibi koruyucu bariyerlere penetrasyonda başarısız olmaktadır (61).

CatSper mutant sperm ($CatSper^{-/-}$) fertilizasyon yeteneğini değerlendirmek için, IVF denemesi yapılmış. Kapasitan normal tip ve 24 saat boyunca mutant sperm ile süperovüle normal tip dişi matür yumurtaların inkübasyonu karşılaştırıldığında normal tip sperm ile yumurtaların %81 fertilize olduğu, mutant sperm ile fertilize olmadığı gösterilmiştir. Hiperaktif motilitenin eksikliğinden dolayı çok muhtemel bazı $CatSper^{-/-}$ sperm yumurtalara yapışmış fakat penetrasyonun yetersiz olduğu izlenmiştir (şekil 9). Doğal fertilizasyon esnasında, sperm yumurtaların plazma membranı ile kaynaşarak kumulus oophorus ve zona pellucidaya penetre olur. İlginç bir şekilde, dış tabakaları enzimatik olarak kaldırılmış (zona pellucidasız) yumurtalar ile mutant sperm ve normal tipin her ikisinde de fertilizasyon ve penetrasyon gösterilmiştir. Bu nedenle, CatSper'in yumurtanın dış katmanları üzerinden penetrasyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (61).



Şekil 9. CatSper'in Fonksiyonel Önemi (61)

Spermatogenezis veya spermiogenezis de CatSper kanalındaki defektler sperm fizyolojisinde bozukluklara neden olmaktadır. Fare modelleri ve proteinler arasındaki fiziksel etkileşimde CatSper alfa alt birimlerinin ($CatSper\ 1-4$) dört knock-out'unun herbirinde fenotipik benzerlik olduğu öne sürülmüştür, bu 4 CatSper protein formu heterodimerik kanalın ve onların herhangi birinin bozulması bu

kanalın fonksiyonunun bozulması ile erkeklerde infertilite ile sonuçlandığı öne sürülmüştür. İnfertil insanlarda CatSper1 ve CatSper2 mutasyonlarının asthenoteratospermia ile ilişkili olduğu bulunmuştur; bununla birlikte, infertil bireylerde CatSper3 ve CatSper4 mutasyonlar bugüne kadar rapor edilmemiştir. Benzer şekilde, CatSper β , CatSper γ mutasyonları da rapor edilmemiştir. Bu yedi bilinen CatSper alt birimlerin herhangi birinininde fonksiyon kaybı sonunda erkek infertilitesine yol açabilir (61).

Knock-out çalışmaları mutant farelerin vücut ve testislerinin ağırlığının normal tip örneklerinden farklı olmadığını göstermektedir. Mutant ve normal tip epididim kuyruğunun sperm sayısı anlamlı farklı değildir ve mutant spermatozoanın belirgin sitolojik özellikleri ayırtedilemez. CatSper^{-/-} farelerde spermatogenezis defektlerinin yokluğu normal tip ve mutant fare testisleri arasındaki morfolojik farklılıkların eksikliği ile desteklenmektedir. İnfertil bireylerin çok sayıda mikroskopik incelenmesi üzerine herhangi bir saptanabilir sperm anormalliği mevcut değildir. Aynı zamanda, onların dişi partnerlerinde anomali yoktur. Hiperaktif motilitenin kaybı bu gibi bireylerde infertilitenin kaybının gerisindeki birkaç olası faktörlerden biri olabilir. Bu nedenle, normospermik infertil bireyler insan infertilitesinde CatSper mutasyonlarının analizi için uygun aday grubunu oluşturmaktadır (61).

1.1.11.2. Proton Voltaj-Kapılı İyon Kanalı:

Proton voltaj kapılı iyon kanalı (Hv1) voltaj sensörü protomerlerin bir dimeri olarak hücre membranında mevcuttur. Geçerli teori her bir sensör kendi proton iletim yolunu içermesidir. Hv1 sperm flagellumunun esas parçasında ifade edilmiştir (60). Hv1 insanda 12q24.11 kromozom bölgesinde lokalizedir, 7 exona sahip olup 273 aminoasit ile kodlanmaktadır (62).

İnsan spermatozoasının whole-cell patch-clamp kayıtları yüksek proton iletkenliğini ortaya koyar. İnsan spermatozoası erkek üreme sisteminde hareketsizdir ve kadın üreme sistemi içine girer girmez aktivasyona geçmektedir. Bu süreç, sperm sitoplazmanın alkalizasyonunu gerektirdiği bilinmektedir. Sağlam flagellar Hv1 bağımlı proton iletkenliği membran depolarizasyon ile aktive edilir; bir alkalik ekstrasellüler ortam; endocannabinoid anandamid; ve ekstrasellüler çinkonun ortamdaki uzaklaştırılması, bir güçlü Hv1 blokördür. Hv1 protonların sadece dış

taşınmasına izin verir ve bu nedenle intrasellüler alkalizasyonun uyarılmasında ve spermatozoanın aktivasyonunda rol alır. Çünkü Hv1 ve CatSper kanalları aynı hücre içi etki alanında bulunması nedeniyle, Hv1 kanalları aracılığıyla proton ekstrüzyonu intraflagellar alkalizasyonu indükleyebilir ve CatSper iyon kanallarını aktif hale getirebilir. Bu nedenle, insan spermatozoasında Hv1 ve CatSper kanallarının birlikte hareketi kadın üreme sisteminde Ca^{++} gereken sperm aktivasyonunu ve her ikisi intrasellüler pH'nın artmasını uyarabilir (60).

İnsanlarda bu kanalda meydana gelen mutasyonların, sperm aktivasyonunda ve akrozom reaksiyonunda ki önemli rolünden dolayı infertilite ile sonuçlanması muhtemeldir. Bu gende ki mutasyonların sperm sayısını etkilemesi olası değildir; bu nedenle, normospermik infertil bireyler bu tür çalışmalar için en iyi adaylardır. Sperm aktivasyonunda Hv1'in önemi, erkek fertilitasını kontrol etmek için onu cazip bir hedef yapar (60).

1.1.11.3. Potasyum Voltaj-Kapılı İyon Kanalı:

Diğer pozitif yüklü iyonlar arasında, K^+ iyonları ve taşıyıcıları hücresel migrasyon mekanizmasının esas bileşenidir. Slo3 insanda 2p13.1 kromozom bölgesinde lokalizedir, 9 exona sahip olup 743 aminoasit ile kodlanmaktadır. KCNU1 8p11.23 kromozom bölgesinde lokalizedir, 27 exona sahip olup 1149 aminoasit ile kodlanmaktadır (62).

Non-kapasitan farelere ait spermatozoa dinlenme membran potansiyeli yaklaşık -30mV'dur. Kapasitasyondan sonra, sperm hücresi yaklaşık -60 mV ile hiperpolarizedir. Sperm patch-clamp tekniği ile yapısal olarak aktif, zayıf dışarı doğru yönelen K^+ akımı (KSper) ölçüldü. Bu KSper özellikle sperm flagellum'un ana parçasına lokalizedir. Farelerde Slo3 geninin KSper için önemli olduğu ifade edilmiştir. Farelerde Slo3 testise özgüdür (memeli spermatositlerinde bolca ifade edilmiştir) ve onun iyon kanal özellikleri KSper ile benzerdir. Slo3'ün pH ve voltajın her ikisine duyarlılığından dolayı, sperm kapasitasyonunda ve/veya akrozom reaksiyonunda rol aldığı, intrasellüler pH ve membran potansiyelinin her ikisinde değişiklik olduğu zaman fertilizasyon için esas adımların olduğu bilinmektedir (60).

Zeng ve arkadaşları 2011 yılında korpus epididim sperminde fizyolojik membran potansiyellerinde tüm pH bağlı K^+ akımının Slo3'ün genetik delesyonu ile ortadan kalktığını göstermişlerdir. KSper/Slo3'ün tüm fare spermlerinde K^+

akımından ve bu spermde tek pH bağımlı K^+ iletkenliğinden sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Fizyolojik iyonik gradientler (alkalinizasyon) ile normal tip spermde KSper/Slo3 aracılı hiperpolarize olurken, SLO3-/- spermatozoa depolarize olmaktadır. Slo3-/- erkek fareler infertildir, fakat Slo3-/- sperm invitro fertilizasyon yöntemlerinde bazen fertilizasyon özelliği göstermektedir. Slo3-/- spermde morfolojik anomali insidansı daha yüksektir ve uyarının olmadığı koşullar altında KSper'in anlamlı bir rolü, bikarbonatın yokluğunda da motilitede eksiklikler sergilemesidir. Birlikte, bu sonuçlar IKsper'in primer spermatozoada, K^+ akımı olduğu ve KSper/Slo3 hiperosmotik ortamlar olduğu zaman sperm motilitesi ve normal morfolojisinin kazanılmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir, fertilité için Slo3 kritik bir rol oynadığı ifade edilmiştir (60).

Sperm fizyolojisi ve fertilitéde IKsper'in kaçınılmaz bir rolü hayvan modeli çalışmalarında açıktır. Bu kanalı kodlayan gendeki mutasyonlar spermde aktivasyon ve fertilitéde bozulma ile sonuçlanacağı muhtemeldir. Bu nedenle, bu kanalı kodlayan genler infertil erkeklerdeki tarama için iyi adaylardır. Şu anda, Slo3 bu kanalı kodlayan tek bir gen gibi görünmektedir; bununla birlikte insan erkek infertilitesinde tarama için daha fazla genlerin sağlanması, bu kanalın oluşumu/aktivitesi daha fazla genlerin tanımlanmasına katkı sağlayabilir. Şu ana kadar ki bilgilere göre, infertil insanlarda böyle bir mutasyon bildirilmemiştir. Slo3'ün yüksek testis spesifik ekspresyonundan dolayı, insanlarda Slo3 kanallarını etkileyen farmakolojik ajanlar fertilizasyon fizyolojisinin düzgün çalışması ve fertilitenin geliştirilmesi veya kontrolünde yada her ikisinde kullanılabilir (60).

1.1.11.8. Ca İle Aktive Edilen Cl Kanalları

CaCCs, plazma membran kanalları sayesinde intrasellüler depolar veya akımdan serbestlenerek sitozolik serbest Ca^{++} konsantrasyonunun artırılması ile aktive edilir. Son zamanlarda, üç çalışma grubu CaCCs'nin aktivitesi ile güçlü ilişkili bir membran proteinine benzer TMEM16A'yı (aynı zamanda anoctamin-1 olarak bilinir) bağımsız olarak tanımlamışlardır. TMEM16A TMEM16B-K olarak adlandırılan diğer dokuz üye içeren bir protein ailesinin bir parçasıdır. CaCCs ile TMEM16B'nin birlikte ekspresyonu, TMEM16A'nın birlikte ekspresyonu ile ilişkili farklı biyokimyasal özellikler (voltaaj bağımlılık, üniter iletkenlik) sergilediği gösterilmiştir. Tüm TMEM16 proteinleri benzer varsayımsal bir topolojiye sahiptir,

sekiz transmembran segmenti ve sitozolik N- ve C- terminalinden oluşur (63). İnsanda TMEM16A 11q13.3 kromozom bölgesinde lokalizedir, 26 exona sahip olup 986 aminoasit tarafından kodlanmaktadır. TMEM16B 12p13.31 kromozom bölgesinde lokalizedir, 27 exona sahip olup 999 aminoasit tarafından kodlanmaktadır (62).

İnsan sperm baş kısmında iyon kanal aktivitesinin hücre bağımlı modda 'haritalama' patch-clamp çalışmaları uzun kararlı açıklıklar gösteren bir Cl⁻ geçirgen kanalı ortaya koymaktadır. Sperm baş kısmının farklı parçaları farklı kanallara sahiptir ve bir fonksiyonel öneme sahip dikkat çekici bir kümelenme vardır. Delikli patch-clamp tekniği kullanılarak matür insan spermatozoasının baş kısmından tüm hücre kayıtları elde edilerek CaCCs akımlarının varlığı ortaya konulmuştur, bunların TMEM16 proteinleri ile taşındığı düşünülmektedir. CaCCs insan spermatozoasının fizyolojisinde önemli bir rol oynar ve solubl ZP ile indüklenmiş AR'da muhtemelen rol alır, fakat onların sperm motilitesindeki rolü henüz belirlenmemiştir (64).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca onaylanan çalışmada, Haziran 2014-Haziran 2015 arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji AD, Androloji BD'na infertilite nedeni ile başvuran hastalar çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya aile öyküsü ve genetik profili normal olan ve varikoseli olmayan hastalar dahil edildi.

Hastalar değerlendirilirken anamnezde yaş, primer veya sekonder infertil olup olmadığı, herhangi bir korunma yöntemi kullanıp kullanmadığı, eğer kullanıldıysa ne kadar süre ile kullanıldığı, cinsel ilişki sıklığı ve ailede infertil bireyler olup olmadığı, sigara, kabakulak, orşit, prostatit epididimit öyküsü, bu zamana kadar herhangi bir yardımcı üreme tekniği uygulanıp uygulanmadığı sorgulandı. Fizik muayenede testis hacmi, skrotum, epididim, vaz deferens ve varikosel muayenesi yapıldı. Laboratuvar muayenesinde total testosteron, FSH, LH ve prolaktin seviyelerine bakıldı. Semen parametreleri anormal olan hastalara bir ay ara ile en az iki defa spermiogram tahlili yapıldı.

Çalışmaya dahil edilen hastalar sonrasında Avrupa Üroloji Derneği 2015 yılı erkek infertilitesi guideline'na uygun olarak 5 gruba ayrıldı.

- 1) Normozoospermi (kontrol grubu)
- 2) Oligozoospermi
- 3) Astenozoospermi
- 4) Teratozoospermi
- 5) Oligoastenoteratozoospermi

2.2. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Aletler

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuare, Meksika
- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukrayna
- Falkon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centri füge Tube, Meksika
- Mini Plate Spin: Labnet C1000, ABD
- Otomatik Pipetler: Socorex, Acura 825,Switzerland, İsviçre

- PZR ve Qubit tüpleri (0,6ml): Neptune, Katalog: 3737.S.X, Biotix Laboratory Media, İngiltere
- Plate Yapıştırıcı: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Optical Adhesive Film, ABD
- Plate: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Fast Optical 96-Well Reaction Plate With Barcode (0,1 mL), Singapur
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Biometra, Almanya
- Qubit® 2,0 Fluormeter: Invitrogen by life technologies, Avustralya
- Real Time- PCR: AB Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA
- Santrifüj: Sigma, Almanya
- Spin: Labnet International, Katalog No:C1031B-230V, Kore
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye

2.3. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Kimyasal Maddeler

- cDNA Kiti: AB Applied Biosystems, High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Part No:437522 REVB, Foster City, CA
- TaqMan® Gene Expression Master Mix: AB Applied Biosystems, Katalog No:4369016, ABD
- Temizleme Solüsyonu: Bioshop, Nuclease Removal Reagent (500 mL), Kanada
- Tri Reagent, Molecular Research Center, Cat No: TR 118, Montgomery Road Cincinnati, OH, USA

2.4. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Total RNA İzolasyonu

Donuk haldeki örnekler eritildi ve 5 dakika 5000 g'de 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve pelleti 1 ml %0,5 Triton-X'de çözüldü. Örnekler somatik hücrelerin lizisi için buzda 10 dakika bekletildi. 5 dakika 5000g'de 4 °C'de santrifüj ile hipotonik/Triton-X solüsyonu atıldı ve pellet PBS ile yıkanıldı. Örnekler 10⁸ hücreye 1 ml olacak şekilde Trizol'de çözüldü. Solüsyon 30G iğne aracılığı ile 3 defa çekilip bırakıldı ve 30 saniye kuvvetlice vortexlendi. Sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Homojenize örnekleri 12.000g'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi ve

süpernatant alındı. Son olarak 200 µl kloroform eklendi. Örnekler 30 saniye vortexlendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 12.000g, 15 dakika, 4 °C’de santrifüj edildi. Oluşan fazlardan sulu faz yeni tüpe aktarıldı ve aynı miktarda izopropanol, 10’da 1’i kadar 3M amonyum asetat ve 1 µl glikojen eklendi. Örnekler 30 dakika oda ısısında inkübe edildi ve 20.000g, 30 dakika, 4 °C’de santrifüj edildi. Süpernant atıldı ve pellet %75 etanol ile yıkandı. Örnekler 12.000g, 5 dakika, 4 °C’de santrifüj edildi. Etanol atıldı ve pellet oda ısısında kurutuldu. 20 µl suda çözüldü ve 15 dakika 58 °C’de ısı uygulandı.

2.5. Spektrofotometrik RNA Ölçümü:

RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen/Molecular Probes) kullanıldı. RNA miktarı µg/ml olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı.

2.6. Komplementer DNA Sentezi

2.6.1. Kullanılan Çözeltiler

High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti: Kit içinde 10X RT Buffer, 25XdNTP mix, 10XRT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase hazır halde bulunmaktadır.

2.6.2. Komplementer DNA Sentezi

cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. cDNA sentezi toplam 20µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için 10µl RNA örneği, 2 µl 10XRT random primer, 2 µl 10XRT buffer, 0.8 µl 25XdNTP mix, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5 dk ve 4°C’de ∞ olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

Tablo 3. cDNA karışım miktarı

Bileşik	Hacim (µl)	Katalog No
10X RT Tamponu	2.0	4319981
25X dNTP karışımı (100mM)	0.8	4367381
MultiScribe™Revers Transkriptaz	1.0	4319983
10XRT Random Primer	2.0	4319979
Nükleaz içermeyen H₂O	4.2	
Reaksiyon toplamı	10.0	

Tablo 4. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı

PZR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

2.7. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu:

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile amplifiye edildi. Genlerin ifadelerinin belirlenmesi için tabloda verilen primerler kullanıldı.

TaqMan Gene Expression Assay Gex: AB Applied Biosystems, ABD, 250µl

Tablo 5. RT-PCR' da kullanılan primerler

Test	Katalog Numarası
GADPH	HS02758991_G1
CatSper 1	HS00364950_M1
CatSper 2	HS00542505_M1
CatSper 3	HS00604374_M1
CatSper 4	HS01374398_M1
Slo3	HS00900982_M1
Hv1	HS01032834_M1
KCNU-1	HS00748551_S1
TMEM-16	HS00216121_M1

Real Time PCR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PCR Plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2µl kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5µl TaqMan Master Mix, 2,5µl nükleaz içermeyen su ve 0,5µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara kondu ve vortekslendi. Plate'deki cDNA örneklerinin üzerine 8µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate'in üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 6. RT-PCR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşikler	Hacim(µl)X Örnek Sayısı
cDNA	2.0
Primer	0.5
TaqMan Mix	5.0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2.5
Toplam	10.0

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakika X 40 siklüs, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 7. Uygulanan RT-PCR programı

RT-PCR X 40 döngü				
	1. Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2dk	10dk	15sn	1dk

2.8. İstatistiksel Değerlendirme

Bu tez çalışmasında istatistiksel değerlendirme; Fırat Üniversitesi Lisanslı (193.255.124.131) IBM SPSS 22.0 paket program kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki gen ifade düzeyleri ve demografik veriler arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Student's t testi kullanıldı. Veriler arasındaki korelasyonların belirlenmesinde Pearson korelasyon analizi uygulandı. İstatistiksel değerlendirmede p<0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma grubunu oluşturan 150 olgunun yaş aralığı 19 ile 55 yıl olup yaş ortalaması $32,7 \pm 6,7$ yıl; sperm sayısı ortalaması $40,4 \pm 31,5$ milyon; FSH ortalaması $5,6 \pm 3,6$ mIU/ml; LH ortalaması $4,5 \pm 2,4$ mIU/ml; total testosteron ortalaması $409,5 \pm 149,7$ ng/dl; PRL ortalaması $8,4 \pm 3,8$ ng/ml; Kruger ortalaması $3,0 \pm 1,5$; motilite ortalaması $34,3 \pm 13,5$ idi. Tablo 8'de çalışma gruplarının çeşitli özellikleri ve laboratuvar bulguları belirtilmiştir.

Kontrol grubu ile astenozoospermi grubunun karşılaştırılmasında FSH ve LH düzeylerinde negatif anlamlılık, Kruger ve morfoloji düzeylerinde pozitif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile oligozoospermi grubunun karşılaştırılmasında sperm sayısı ve Kruger düzeylerinde pozitif anlamlılık, FSH ve LH düzeylerinde negatif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile oligoastenoteratozoospermi grubunun karşılaştırılmasında sperm sayısı, Kruger ve morfoloji düzeylerinde pozitif anlamlılık, FSH ve LH düzeylerinde negatif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile teratozoospermi grubunun karşılaştırılmasında sperm sayısı ve Kruger düzeylerinde pozitif anlamlılık, FSH ve LH düzeylerinde negatif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Astenozoospermi ile oligozoospermi gruplarının karşılaştırılmasında sperm sayısı düzeyinde pozitif anlamlılık ve morfoloji düzeyinde negatif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Astenozoospermi ile oligoastenoteratozoospermi gruplarının karşılaştırılmasında sperm sayısı, Kruger ve motilite düzeylerinde pozitif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Astenozoospermi ile teratozoospermi gruplarının karşılaştırılmasında Kruger düzeylerinde pozitif anlamlılık ve motilite düzeyinde negatif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Oligozoospermi ile oligoastenoteratozoospermi grupları karşılaştırıldığında sperm sayısı düzeyinde negatif anlamlılık, Kruger ve motilite düzeylerinde pozitif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Oligozoospermi ile teratozoospermi grupları karşılaştırıldığında sperm sayısı düzeylerinde negatif anlamlılık, FSH ve Kruger düzeylerinde pozitif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$). Oligoastenoteratozoospermi ile teratozoospermi grupları karşılaştırıldığında sperm sayısı, Kruger düzeylerinde pozitif anlamlılık ve motilite düzeyinde negatif anlamlılık bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 8. Grupların Çeşitli Özellikleri ve Laboratuvar Bulguları

	Kontrol	Astenospermi	Oligospermi	Oligoastenoteratospermi	Teratospermi
Yaş (yıl)	31,6±6,1	33,2±8,1	34,2±7,0	34,8±7,7	31,5±4,9
Sperm Sayısı (milyon)	63,0±27,02	54,5±31,1	5,5±3,3	9,5±4,0	41,0±21,9
FSH (mIU/ml)	3,4±1,4	5,0±2,9	8,7±5,5	6,8±3,1	5,2±2,5
LH (mIU/ml)	3,3±1,1	4,5±1,7	5,6±3,9	5,1±2,9	4,6±2,0
T.T. (ng/dl)	428,6±125,7	402,7±130,1	410,5±236,4	369,6±107,3	426,0±141,4
PRL (ng/ml)	8,3±4,2	7,8±2,9	8,4±2,4	8,1±4,7	9,6±4,9
Kruger (%)	4,4±0,5	4,0±0,7	3,9±0,6	0,8±0,8	1,5±0,5
Motilite (%)	43,2±7,1	21,2±6,8	43,9±9,9	15,6±8,5	41,0±7,2

Kontrol grubunun yaş ortalaması 31,6±6,1 yıl; sperm sayısı ortalaması 63,0±27,0 milyon; FSH ortalaması 3,4±1,4 mIU/ml; LH ortalaması 3,3±1,1 mIU/ml; total testosteron ortalaması 428± 125,7 ng/dl; PRL ortalaması 8,3±4,2 ng/ml; Kruger ortalaması 4,4±0,5; motilite ortalaması 42,9±7,2 idi. Kontrol grubunda yaş, sperm sayısı, FSH, LH, total testosteron, PRL, Kruger ve motilite düzeyleri arasında bir korelasyon olmadığı tespit edildi.

Tablo 9. Kontrol Grubunun Korelasyon Tablosu

	Yaş	Sperm Sayısı	FSH	LH	T.T	PRL	Kruger	Motilite
Yaş		p=0,78	p=0,37	p=0,57	p=0,62	p=0,52	p=0,79	p=0,08
Sperm Sayısı	p=0,78		p=0,72	p=0,33	p=0,78	p=0,17	p=0,09	p=0,89
FSH	p=0,37	p=0,72		p=0,10	p=0,24	p=0,66	p=0,16	p=0,90
LH	p=0,57	p=0,33	p=0,10		p=0,78	p=0,59	p=0,12	p=0,69
T.T	p=0,62	p=0,78	p=0,24	p=0,78		p=0,22	p=0,13	p=0,86
PRL	p=0,52	p=0,17	p=0,66	p=0,59	p=0,22		p=0,86	p=0,63
Kruger	p=0,79	p=0,09	p=0,16	p=0,12	p=0,13	p=0,86		p=0,44
Motilite	p=0,08	p=0,89	p=0,90	p=0,69	p=0,86	p=0,63	p=0,44	

Astenospermi grubunda yaş ortalaması 33,2±8,1 yıl; sperm sayısı ortalaması 54,5±3,1 milyon; FSH ortalaması 5,0±2,9 mIU/ml; LH ortalaması 4,3±1,7 mIU/ml; total testosteron ortalaması 402,7±130,1 ng/dl; PRL ortalaması 7,8±2,9 ng/ml; Kruger ortalaması 4,0±0,7; motilite ortalaması 21,6±6,9 idi. Astenospermi grubunda yaş ile FSH, PRL ile LH arasında pozitif korelasyon bulundu.

Tablo 10. Astenospermi Grubunun Korelasyon Tablosu

	Yaş	Sperm Sayısı	FSH	LH	T.T	PRL	Kruger	Motilite
Yaş		p=0,68	p=0,006	p=0,39	p=0,11	p=0,79	p=0,27	p=0,15
Sperm Sayısı	p=0,68		p=0,13	p=0,83	p=0,72	p=0,93	p=0,25	p=0,64
FSH	p=0,006	p=0,13		p=0,54	p=0,14	p=0,70	p=0,71	p=0,23
LH	p=0,39	p=0,83	p=0,54		p=0,79	p=0,01	p=0,48	p=0,74
T.T	p=0,11	p=0,72	p=0,14	p=0,79		p=0,57	p=0,16	p=0,44
PRL	p=0,79	p=0,93	p=0,70	p=0,01	p=0,57		p=0,32	p=0,89
Kruger	p=0,27	p=0,25	p=0,71	p=0,48	p=0,16	p=0,32		p=0,20
Motilite	p=0,15	p=0,64	p=0,23	p=0,74	p=0,44	p=0,89	p=0,20	

Oligospermi grubunda yaş ortalaması 34,2±7,0 yıl; sperm sayısı ortalaması 5,5±3,3 milyon; FSH ortalaması 8,7±5,5 mIU/ml; LH ortalaması 5,6±3,9 mIU/ml; total testosteron ortalaması 410,5±236,4 ng/dl; PRL ortalaması 8,4±2,4 ng/ml; Kruger ortalaması 3,9±0,6; motilite ortalaması 41,6±10,7 idi. Oligospermi grubunda yaş, sperm sayısı, FSH, LH, total testosteron, PRL, Kruger ve motilite düzeyleri arasında bir korelasyon olmadığı tespit edildi.

Tablo 11. Oligospermi Grubunun Korelasyon Tablosu

	Yaş	Sperm Sayısı	FSH	LH	T.T	PRL	Kruger	Motilite
Yaş		p=0,26	p=0,15	p=0,26	p=0,92	p=0,17	p=0,31	p=0,68
Sperm Sayısı	p=0,26		p=0,09	p=0,78	p=0,41	p=0,62	p=0,32	p=0,50
FSH	p=0,15	p=0,09		p=0,29	p=0,58	p=0,93	p=0,27	p=0,78
LH	p=0,26	p=0,78	p=0,29		p=0,43	p=0,41	p=0,37	p=0,42
T.T	p=0,92	p=0,41	p=0,58	p=0,43		p=0,80	p=0,34	p=0,35
PRL	p=0,17	p=0,62	p=0,93	p=0,41	p=0,80		p=0,84	p=0,52
Kruger	p=0,31	p=0,32	p=0,27	p=0,37	p=0,34	p=0,84		p=0,56
Motilite	p=0,68	p=0,50	p=0,78	p=0,42	p=0,35	p=0,52	p=0,86	

Oligoastenoteratospermi grubunda yaş ortalaması 34,8±7,7 yıl; sperm sayısı ortalaması 9,5±4,0 milyon; FSH ortalaması 6,8±3,1 mIU/ml; LH ortalaması 5,1±2,9 mIU/ml; total testosteron ortalaması 369,6±107,3 ng/dl; PRL ortalaması 8,1±4,7 ng/ml; Kruger ortalaması 0,8±0,8; motilite ortalaması 14,9±8,7 idi. Oligoastenoteratospermi grubunda yaş ile FSH, Kruger ile yaş ve Kruger ile FSH arasında pozitif korelasyon, total testosteron ile LH arasında negatif korelasyon tespit edildi.

Tablo 12. Oligoastenoteratospermi Grubunun Korelasyon Tablosu

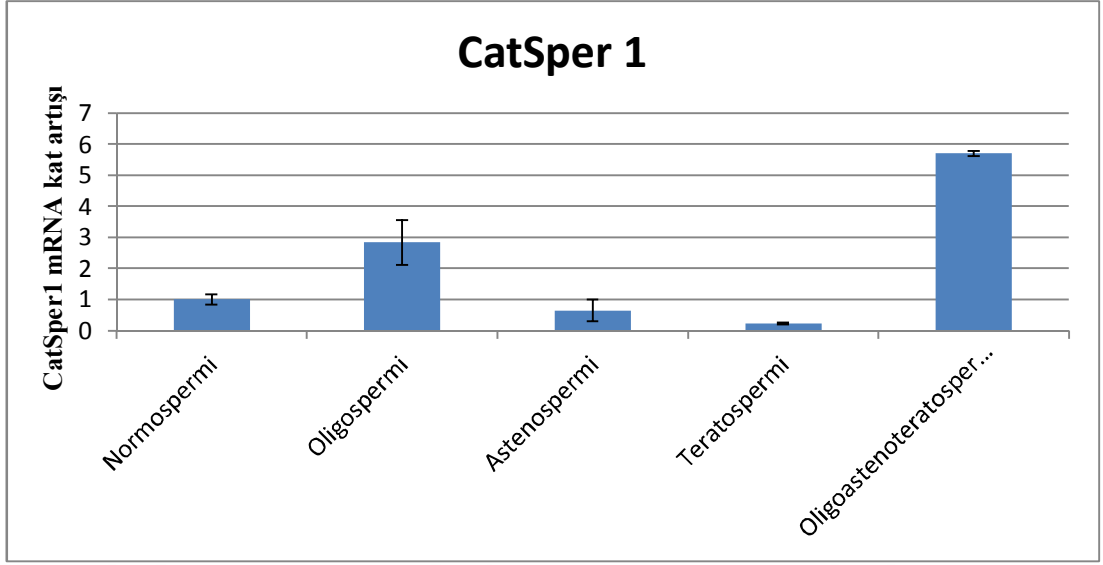
	Yaş	Sperm Sayısı	FSH	LH	T.T	PRL	Kruger	Motilite
Yaş		p=0,32	p=0,01	p=0,41	p=0,91	p=0,67	p=0,02	p=0,57
Sperm Sayısı	p=0,32		p=0,61	p=0,40	p=0,94	p=0,57	p=0,92	p=0,20
FSH	p=0,01	p=0,61		p=0,71	p=0,47	p=0,71	p=0,03	p=0,73
LH	p=0,41	p=0,40	p=0,71		p=0,04	p=0,55	p=0,51	p=0,98
T.T	p=0,91	p=0,94	p=0,47	p=0,04		p=0,89	p=0,54	p=0,75
PRL	p=0,67	p=0,57	p=0,71	p=0,55	p=0,89		p=0,35	p=0,66
Kruger	p=0,02	p=0,92	p=0,03	p=0,51	p=0,54	p=0,35		p=0,55
Motilite	p=0,57	p=0,20	p=0,73	p=0,98	p=0,75	p=0,66	p=0,55	

Teratospermi grubunda yaş ortalaması 31,5±4,9 yıl; sperm sayısı ortalaması 41,9±21,9 milyon; FSH ortalaması 5,2±2,5 mIU/ml; LH ortalaması 4,6±2,0 mIU/ml; total testosteron ortalaması 426,0±141,4 ng/dl; PRL ortalaması 9,6±4,9 ng/ml; Kruger ortalaması 1,5±0,5; motilite ortalaması 41,1±7,2 idi. Teratospermi grubunda Kruger ile total testosteron arasında ve yaş ile motilite arasında negatif korelasyon tespit edildi.

Tablo 13. Teratospermi Grubunun Korelasyon Tablosu

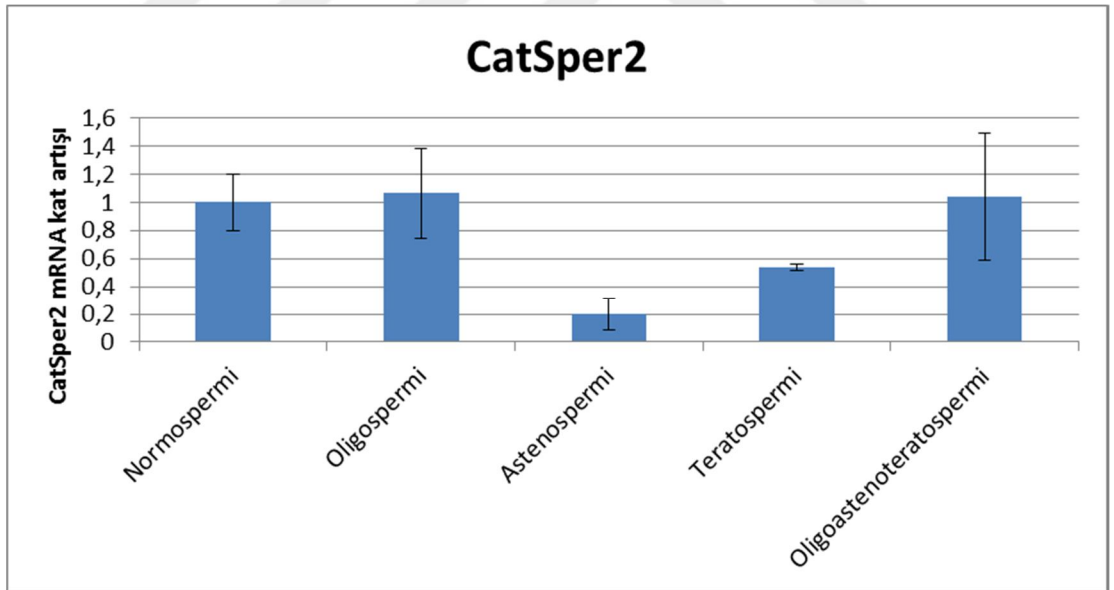
	Yaş	Sperm Sayısı	FSH	LH	T.T	PRL	Kruger	Motilite
Yaş		p=0,76	p=0,35	p=0,32	p=0,46	p=0,97	p=0,69	p=0,03
Sperm Sayısı	p=0,76		p=0,71	p=0,05	p=0,60	p=0,44	p=0,24	p=0,71
FSH	p=0,35	p=0,71		p=0,64	p=0,85	p=0,32	p=0,63	p=0,84
LH	p=0,32	p=0,05	p=0,64		p=0,84	p=0,07	p=0,70	p=0,96
T.T	p=0,46	p=0,60	p=0,85	p=0,84		p=0,30	p=0,01	p=0,88
PRL	p=0,97	p=0,44	p=0,32	p=0,07	p=0,30		p=0,70	p=0,95
Kruger	p=0,69	p=0,24	p=0,63	p=0,70	p=0,01	p=0,70		p=0,66
Motilite	p=0,03	p=0,71	p=0,84	p=0,96	p=0,88	p=0,95	p=0,66	

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda CatSper1 gen ekspresyonunun oligospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, astenospermi ve teratospermi gruplarında ise azaldığı tespit edildi.



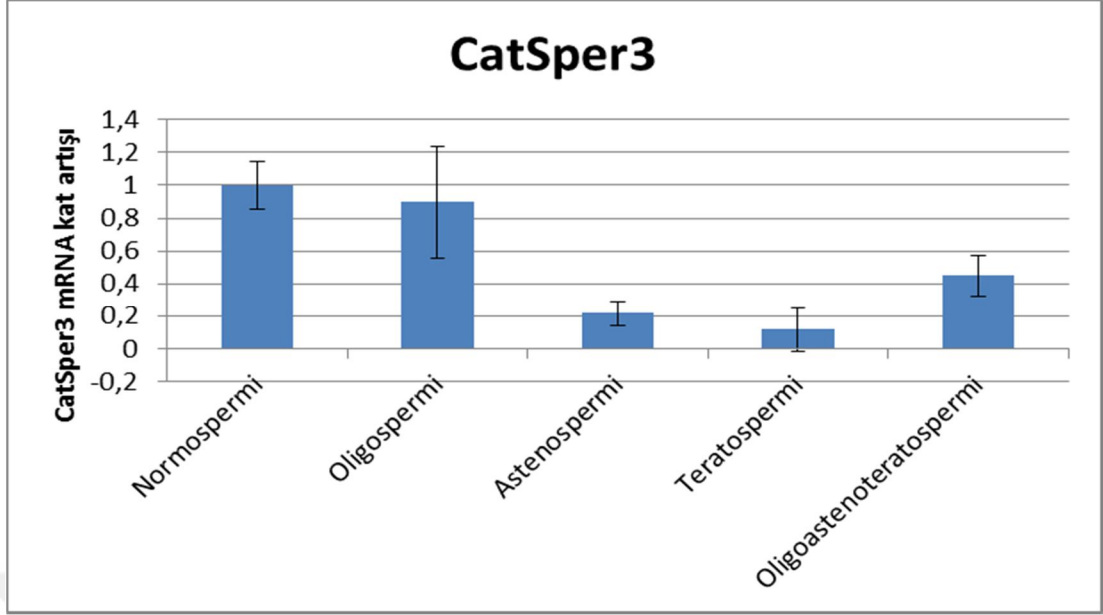
Şekil 10. CatSper1 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda CatSper2 gen ekspresyonunun astenospermi ve teratospermi gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı, oligospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında ise anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.



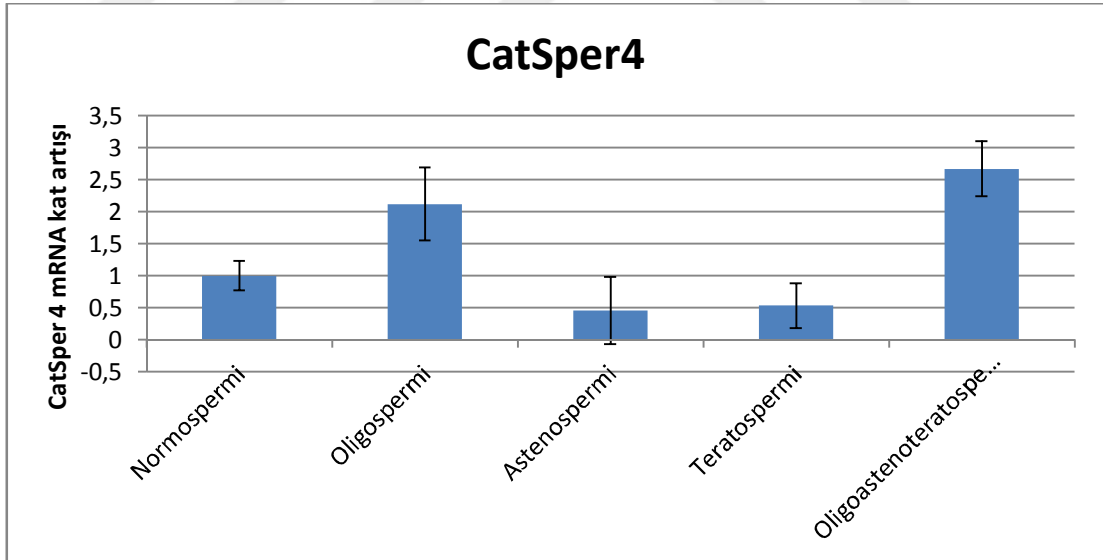
Şekil 11. CatSper2 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda CatSper3 gen ekspresyonunun astenospermi, teratospermi ve oligoastenoteratospermi grublarında kontrol grubuna göre azaldığı ve oligospermi grubunda ise anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.



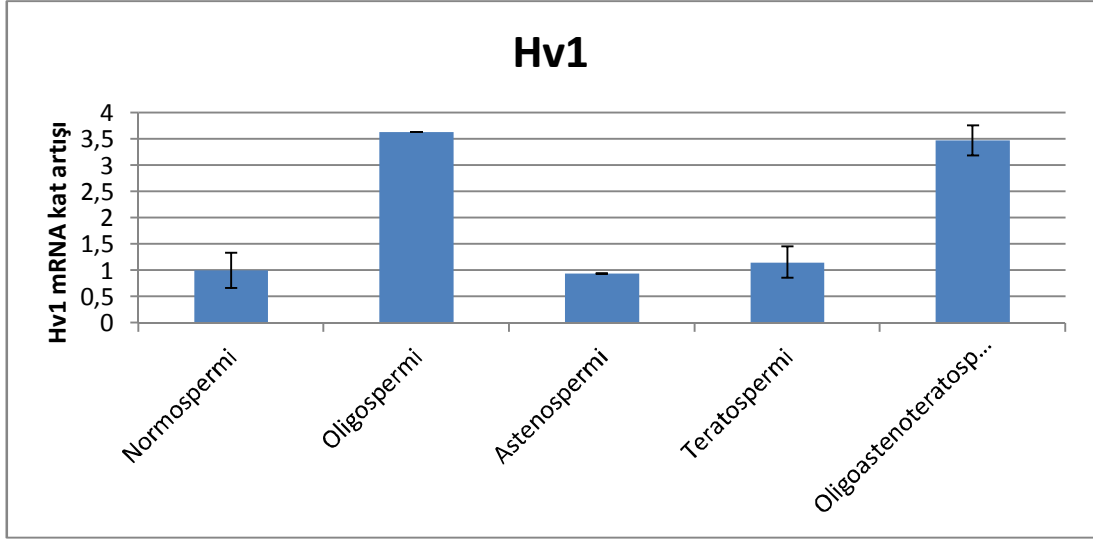
Şekil 12. CatSper3 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda CatSper4 gen ekspresyonunun oligospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, astenospermi ve teratospermi gruplarında ise azaldığı tespit edildi.



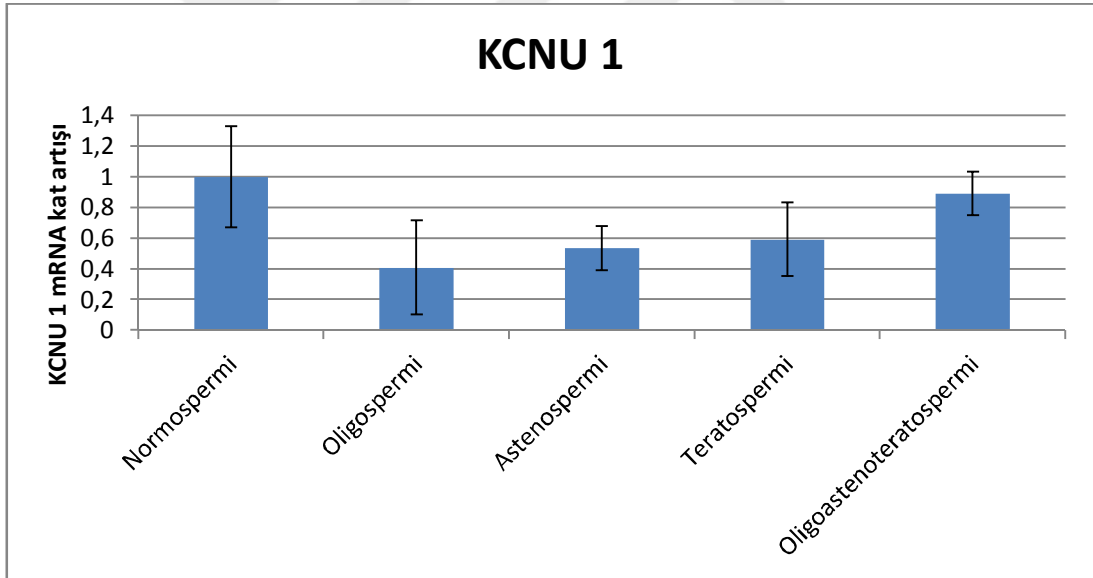
Şekil 13. CatSper4 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda Hv1 gen ekspresyonunun oligospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, astenospermi ve teratospermi gruplarında ise fark olmadığı tespit edildi.



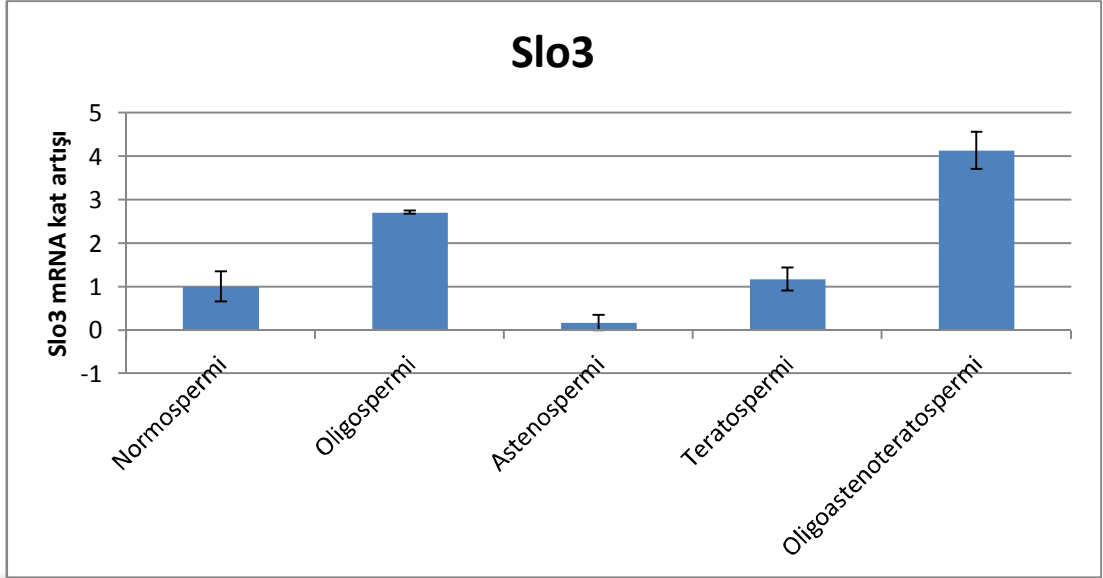
Şekil 14. Hv1 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda KCNU1 gen ekspresyonu oligospermi, astenospermi, teratospermi gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı, oligoastenoteratosp... grubunda ise anlamlı fark olmadığı tespit edildi.



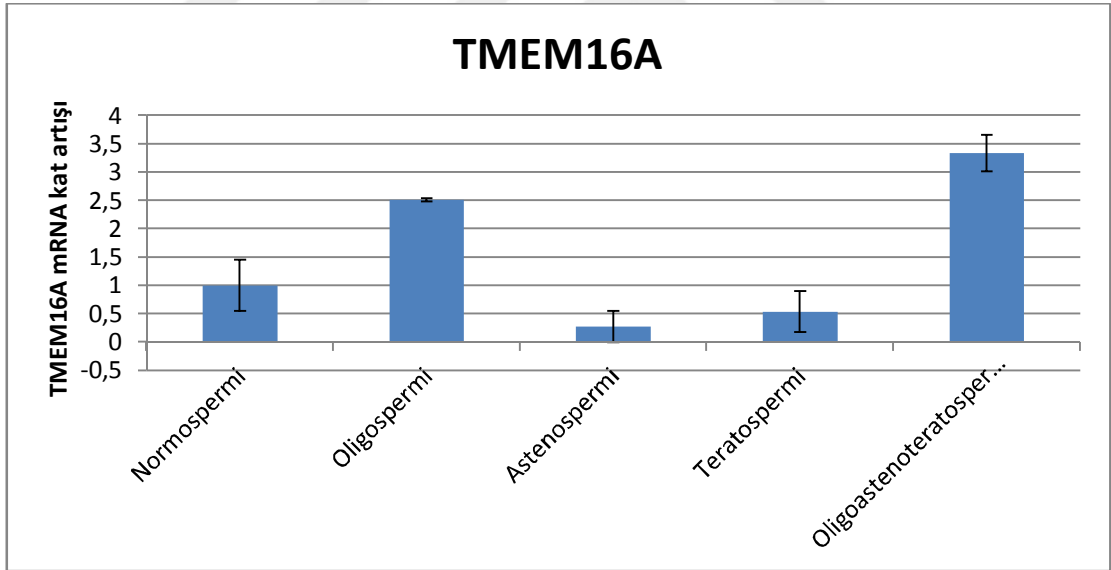
Şekil 15. KCNU 1 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda Slo3 gen ekspresyonunun oligospermi ve oligoastenoteratosp... gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, astenospermi grubunda azaldığı ve teratospermi grubunda ise değişmediği tespit edildi.



Şekil 16. Slo3 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda TMEM16A gen ekspresyonunun oligospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, astenospermi ve teratospermi gruplarında ise azaldığı tespit edildi.



Şekil 17. TMEM16A Gen Ekspresyonu

4. TARTIŞMA

İnfertilite, bir yıl düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamama olarak tanımlanmaktadır (1). Bazı hasta grupları hormon, spermiogram ve genetik verileri normal bile olsa çocuk sahibi olamamadan yakınrlar. Bu çalışmada varikozel öyküsü olmayan, aile öyküsü ve genetik parametreleri normal olan infertil bireyler üzerinde iyon kanallarının etkileri araştırıldı.

Catsper kanalları fare ve insanlarda sperm flagellumunun ana parçasında sınırlıdır (63). CatSper kanalları spermde hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunu yükselterek sperm hareketinin hızlı ve güçlü olmasını sağlamaktadır (65). Ren ve arkadaşları, CatSper'in normal sperm motilitesi ve yumurtaya penetrasyonu için gerekli olduğunu göstermişlerdir (63). CatSper -/- sperm ile normal tip farelerde yapılan çalışmalarda CatSper-/- spermilerin cansız ve ileri hareketinin daha azalmış olduğu izlenilmiştir. En önemlisi CatSper-/- spermde güçlü vurunun kaybolduğu ve kuyruk bölgesinde kıvrılmaların olduğunu izlenilmiş olmasıdır. Bilgisayar destekli sperm analizi ile CatSper-/- spermilerin motilite parametrelerinin, ilerleyici hızının ve rota hızının önemli ölçüde bozulduğu gösterilmiştir (63). Yapılan bir diğer çalışmada CatSper -/- spermilerin fertilizasyon yeteneği in-vitro değerlendirilmiştir. Sonucunda CatSper-/- spermilerin herhangi bir yumurtayı fertilize edemediği, normal tip spermilerin ise %81 oranında başarılı olduğu gösterilmiştir. Ancak bazı CatSper-/- spermiler yumurtalara yapışmış ancak penetrasyonu yapamamışlardır. Zona pellucidası enzimatik olarak kaldırılmış yumurtalarda CatSper+/+ ve CatSper-/- fare spermilerinin her ikisinin fertilize olduğu gösterilmiştir. Bu da CatSper'in penetrasyon için gerekli olduğunu göstermektedir (60).

Ayrıca insan CatSper genlerinin erkek fertilizasyonunda önemli rol oynaması erkek kontrasepsiyonu için ideal bir hedef haline getirmektedir (66). CatSper ailesinin benzersiz yapısı, sınırlı ekspresyon modelleri ve fizyolojik fonksiyonları göz önüne alındığında, ilaçlara spesifik CatSper'ler ve/veya yardımcı alt birimleri motilite ile ilişkili infertilite tedavisinde veya kontraseptif olarak kullanılabilir. HC-056456 gibi CatSper blokörleri, CatSper-/- spermilere benzer hiperaktif motilitenin oluşumunu engeller. Bu CatSper blokörleri, seçici kanal aktivitesini hedefleyen kontraseptiflerin yeni bir sınıfının gelişmesine yol açabilir (67). İmmun kontrasepsiyon olarak anti-CatSper immunglobulin G'nin varlığında spermde

ilerleyici motil hücrelerin ve fertilizasyon oranının anlamlı azaldığı gösterilmiştir (68). CatSper'in testis, epididim ve ejakulat sperminde sınırlı lokalizasyonundan dolayı spesifik bir blokörü diğer dokuları etkilemeyeceği ve bundan dolayı yan etkilerinin minimum veya hiç olmayacağı düşünülmüştür (60).

Marguez ve arkadaşları CatSper1-/- sperm ve CatSper2-/- spermin tamamen infertil olduğunu ve kapasitasyon esnasında hiperaktivasyon yeteneği göstermediğini ifade etmişlerdir (70). Ren ve arkadaşları CatSper1-/- farelerin sperm yüzme hızında bir azalma bulmuşlardır (63). Carlson ve arkadaşları CatSper1-/- spermin en önemli kusurunun hiperaktif motilite eksikliği olduğunu bildirmişlerdir (71). Avenarius ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CatSper1 ve CatSper2 mutasyonlarının astenoteratospermi ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (72). Lara Tamburrino ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CatSper1 ekspresyonunun astenospermi hasta grubunda azaldığını, ilerleyici motilite ve akrozom reaksiyonunda azalma olduğunu ifade etmişlerdir (73). Bhilawadikar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CatSper2 ekspresyonunun da astenospermi hasta grubunda azalmış olduğunu bildirmişlerdir (74). Hildebrand ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CatSper2 ekspresyonunun yokluğunda %88'in üzerinde spermin malforme olduğunu, yaklaşık %30'unda sperm başının kısa olduğunu ve flajellasının sarmal olduğunu ifade etmişlerdir. Bu nedenle CatSper2 'nin delesyonunda sperm hiperaktif motilitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir (75).

Jin ve arkadaşları CatSper3-/- ve CatSper4-/- erkek farelerin normal çiftleşme davranışlarına rağmen fertil olamadığını ifade etmişlerdir. CatSper3-/- ve CatSper4-/- farelerin her ikisi normal sperm sayısı ve ilk hareketliliklerine rağmen tamamen infertil olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı deney de kapasitasyon ortamında normal tip spermatozoa da oda sıcaklığında inkübasyondan 30 dakika sonra hiperaktivasyonun gelişmeye başladığı izlenmiştir. Oysa CatSper3-/- ve CatSper4-/- sperimde inkübasyondan 2 saat sonra ilk motilite görüntülenmiştir. Bu sonuç fonksiyonel CatSper3 ve CatSper4'ün kapasitasyon boyunca sperm hiperaktivasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. Jin ve arkadaşlarının bu çalışması sonrasında infertilite sebebi 3 nedene bağlanmıştır. İlk olarak CatSper3-/- ve CatSper4-/- spermler de motilite anlamlı ölçüde azalır ve böylece sperm fallop tüpünün ampulla bölgesinde ki yumurtalara ulaşamayabileceği, ikinci olarak CatSper3-/- ve CatSper4

-/- sperm visköz ortama penetre olur ancak dışı üreme sisteminin mukozasında ilerleyemez ve bu nedenle yumurtaya ulaşan sperm sayısının azalmış olabileceği ve son olarakta hiperaktivasyon eksikliği fertilizasyon esnasında kumulus hücrelerine ve zona pellucidaya penetrasyon için yeterli gücü oluşturamayabileceği şeklinde ifade edilmiştir (76).

İnsanlar da mutasyon çalışmaları nadirdir ve CatSper2-/- geninde ki mutasyonlar nonsendromik insan erkek infertilitesi ile ilişkili bulunmuştur; diğer insan CatSper mutasyonlarının bulunabilir olması da muhtemeldir (77). İnsanlarda tasarlanmış çalışmalar infertil bireylerde mutasyonların ya da diğer CatSper genlerinin tanımlanmasına neden olabilecektir. CatSper'lar sadece sperm motilitesi ve hiperaktivasyonu için gerekli değildir, aynı zamanda yumurtaya penetrasyon içinde gereklidir. Bu nedenle astenospermik ve normospermik infertil bireylerin her ikisi insanlarda mutasyon çalışmaları için ideal grupları oluşturmaktadır. Çünkü CatSper progesteron ile tetiklenen üç Ca^{++} bağlı reaksiyona neden olabilmektedir (hiperaktivasyon, kemotaksis ve akrozom reaksiyonu). CatSper kanal blokörlerinin tanımlanması spermde Ca^{++} sinyalinin çalışmasını kolaylaştırarak, progesteron ve CatSper'in fizyolojik rolünü daha fazla tanımlamaya yardımcı olabilecektir (78). İnfertil insanlarda CatSper genlerinde ki mutasyonların tanımlanması bu inhibitörlerin geliştirilmesini arttırabilecektir.

Çalışmamızda CatSper1 gen ekspresyonunun astenospermi ve teratospermi gruplarında azaldığı, oligospermi ve oligoastenospermi gruplarında ise arttığı belirlendi. Ayrıca çalışmamızda da CatSper1'in hiperaktif motilite ve morfoloji ile ilişkili olduğu saptandı. Bunun yanında CatSper2 gen ekspresyonunun astenospermi ve teratospermi gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı, oligospermi ve oligoastenospermi gruplarında ise anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Çalışmamızda da CatSper2'nin hiperaktif motilite ve morfoloji ile ilişkili olduğu da saptandı. CatSper3 gen ekspresyonunun astenospermi, teratospermi ve oligoastenospermi grubunlarında kontrol grubuna göre azaldığı ve oligospermi grubunda ise anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Bu sonuç, CatSper3'ün hiperaktif motilite ve morfoloji ile ilişkili olduğu saptandı. CatSper4 gen ekspresyonunun astenospermi ve teratospermi gruplarında azaldığı, oligospermi ve oligoastenospermi gruplarında ise arttığı belirlendi. Çalışmamızda da CatSper4'in hiperaktif motilite ve morfoloji ile ilişkili

olduğu saptandı. Bütün bu sonuçlar neticesinde CatSper iyon kanallarının sperm fizyolojisinde önemli bir rol oynayacağı ortaya konmuş olmaktadır.

İnsan spermatozoası erkek üreme sisteminde hareketsizdir ve dışı üreme sistemine girer girmez aktivasyona uğrar. Bu süreç için sperm sitoplazmasının alkalinize olması gerekmektedir. Hv1 protonların sadece dışa taşınmasına izin verir ve intrasellüler alkalinizasyonu uyarır, böylece spermatozoanın aktivasyonunda rol alır. Hv1, CatSper iyon kanallarını aktif hale getirebilir. Böylece hücre içi Ca^{++} düzeyi artarak sperm hiperaktivasyona uğrar. Farelerde Hv1 akımı olmadığı için çalışmalar kısıtlı ilerlemektedir (79). İnsanlardaki mutasyonların sperm aktivasyonunda ve akrozom reaksiyonunda bu proton kanalının önemli rolünden dolayı infertilite ile sonuçlanması muhtemeldir.

Çalışmamızda Hv1 gen ekspresyonunun oligospermi ve oligoastenoterato spermi gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, astenospermi ve teratospermi gruplarında ise fark olmadığı tespit edildi.

Santi ve arkadaşları Slo3 kanallarının sadece memelilerde ve testise özgü olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca pH duyarlı K^+ akımının moleküler tanımlanması ve fizyolojik rolü hakkında ilk kanıtlar elde edilmiştir. Bu çalışmada KCNU1/Slo3 knock-out fareler kullanarak testiküler spermde pH duyarlı K^+ akımının eksikliği gösterilmiştir ve normal tip dışı fare ile çiftleştirilen homozigot mutant erkeklerin infertil olduğu ifade edilmiştir (80). Zeng ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Slo3 knock-out farede korpus epididim spermde IKSper akımının yokluğunda KCNU1 geninin son kodlama eksonunun (27. ekson) yokluğunu ifade etmişlerdir (81). Bu yapılan deneylerde Slo3 kanallarının kapasitasyon esnasında oluşan hiperpolarizasyon için esas sorumlu kanal olduğunu ve hiç bir kanalın Slo3'ün kaybını telafi edemeyeceğini ve mutant spermde kapasitasyondan sonra depolarizasyon gösterdiğini ifade etmişlerdir (82).

Slo3 mutant spermde hiperpolarizasyon ortadan kalktığı için bir dereceye kadar akrozom reaksiyonuna uğrar ancak zona pellucidayı penetrasyonda başarılı olamaz. Spermilerin yumurtaya ulaşmasında osmotik ortamda etkilidir. Ayrıca K^+ iyonu bu hacim düzenlenmesinde etkili olup Slo3 kanallarının volüm kontrolüne katıldığı ifade edilmiştir. Volüm düzenlenmesi bozulduğu zaman sperm şişer ve

morfolojik değişikliklere uğrar. Morfolojik değişikliklere uğrayan sperm yumurtaya ulaşmada başarısız olur ve infertilite ile sonuçlanır (82).

Çalışmamızda Slo3 gen ekspresyonunun oligospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, astenospermi grubunda azaldığı ve teratospermi grubunda ise anlamlı değişmediği; KCNU1 gen ekspresyonunun ise oligospermi, astenospermi, teratospermi gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı, oligoastenoteratospermi grubunda ise anlamlı fark olmadığı belirlendi. Verilerin sonucunda Slo3/KCNU1 genlerinin sperm ileri hareketinde ve sperm morfolojisinde etkili olduğu saptandı.

TMEM16A yumurta ve ductus epididimis gibi reproduktif traktta belirlenmiştir (83). Orta ve arkadaşları TMEM16A'nın sperm kapasitasyonu ve zona pellucida ile uyarılan akrozom reaksiyonunda rol aldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada TMEM16A'nın insan sperminin baş kısmında bulunduğunu ifade etmişlerdir (84). Zanetti ve Mayorga'nın TMEM16A inhibitörü kullanarak yapmış olduğu çalışmada TMEM16A'nın hücre volümünün düzenlenmesinde rol aldığı ve dış akrozomal membran ile plazma membranı arasındaki mesafeyi etkileyerek akrozom ekzositozu için esas olduğu fikrine varmışlardır (85).

Çalışmamızda TMEM16A gen ekspresyonunun oligospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, astenospermi ve teratospermi gruplarında ise azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak özellikle oligospermi ve oligoastenospemde bazı iyon kanallarındaki gen ekspresyonu artışını açıklamak için daha fazla sayıda olgunun olduğu detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu iyon kanallarının fonksiyonları net aydınlatıldığı zaman, aktivatör ve inhibitörlerinin geliştirilmesi ile çok sayıda idiyoPATİK infertil hastalara tedavi olanağı sunabiliriz. Ayrıca bu aktivatörler/inhibitörler sayesinde sadece sperm üzerine etkili olabilecek ve böylece yan etkileri az veya hiç olmayacak erkek kontrasepsiyonu için ilaç gelişiminin önü açılmış olabilir.

5. KAYNAKLAR

1. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2005; 48: 703-711.
2. Coutton C, Satre V, Arnoult C, Ray P. Genetics of male infertility: the new players. *Médecine sciences* 2012; 28: 497-502.
3. Howards SS. Treatment of Male Infertility. *New England J Med* 1995; 332: 312-317.
4. Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, et al. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Human Reproduction* 2011; 26: 47-58.
5. Li-Ping Z, Hua-Feng W, Bao-Ming L, Xu-Hui Z. Sperm-Specific Ion Channels: Targets holding the Most Potential for Male Contraceptives in Development. *Contraception* 2013; 88: 485-491.
6. Bedford JM, Bent MJ, Calvin H. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1973; 33: 19-29.
7. EAU Guidelines, Male Infertility, 2015.
8. W.B. Saunders Company ve Schoenwolf, GC. *Human Embryology*. 4th ed. 2008; Churchill Livingstone. 479-536.
9. Carlson, B.M, *Human Embryology and Developmental Biology*. 4th ed. 2009: Mosby-Elsevier. 421-428.
10. Murashima A, Kishigami S, Thomson A, Yamada G. Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochim Biophys Acta* 2014; 163-170.
11. Williams PL. *Reproductive Organs of the Male*. Gray's Anatomy 38th ed. 1995, New York: Churchill Livingstone.
12. Yanan H, Jingmei H, Yun L, Yang L, Hao Y, Zheng L, Zuping H. The roles and regulation of sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29: 66-75.

13. Dacheux JL, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 2014; 147: 27-42.
14. Famiglietti G. Normal ultrasonographic anatomy and measurement of the scrotum. *Arch Ital Urol Androl* 2000; 72: 345-349.
15. Wosnitzer MS, Goldstein M. Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am* 2014; 41: 83-95.
16. Nguyen HT, Etzell J, Turek PJ. Normal human ejaculatory duct anatomy: a study of cadaveric and surgical specimens. *J Urol* 1996; 155: 1639-1642.
17. Smith JF, Walsh TJ, Turek PJ. Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North Am* 2008; 35: 221-227.
18. Phillips E, Carpenter C, Oates RD. Ejaculatory dysfunction. *Urol Clin North Am* 2014; 41: 115-128.
19. Comhaire FH, Mahmoud AMA, Depuydt CE, Zalata AA, Cristophe AB. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 393-398.
20. McLachlan R.I, The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; 14(3): 345-362.
21. Liu PY, Handelsman DJ. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 9-23.
22. Akbal C. Sperm Oluşumu ve Fizyolojisi. Türkeri L, Özer A, Narter F (editörler). İstanbul: Üroonkoloji Derneği Moleküler Üroloji Kitabı. 2012: 653-659.
23. Bibbins PE, Ward JB, Lipshultz LI, Hokanson JA, Legator MS. Incidence of sperm with Two Fluorescent bodies in men with impaired fertility. *Fertil Steril* 1992; 57: 402-408.
24. Strasinger SK, Lorenzo MS. *Urinalysis and Body Fluid*. 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2001.
25. Brass M, Lens JW, Piederiet MH. *Laboratory aspects of in vitro fertilization*. Organon Pres, 1996.

26. Knobil E, Neill JD. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Pres. Ltd., 1994: 1063-1175.
27. Gonzales FG, Kortebani G, Mazzolli AB. Leukocyto-spermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. Fertil Steril 1992; 57: 1058-1065.
28. Jequier AM, Crich JP. Semen analysis. Blackwell scientific publications USA. 1986; 1-14.
29. Alexander NJ. Male evaluation and semen analysis in gynecology and obstetrics. Saunders Michigan. 1983; 460-482.
30. Fuse H, Okumura M, Sakamoto M, Kazama T, Katayama T. Acrosome-reacted sperm in infertile and fertile men using the triple-stain technique. Archs Androl 1993; 30: 41-45.
31. World Health Organization. Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge: The Pres Syndicate of the University of Cambridge. 1987.
32. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. Eur Urol 2012; 62: 324-332.
33. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010; 16: 231-245.
34. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Nat Rev Endocrinol 2009; 5: 569-576.
35. Ghervan C, Young J. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome in males. Presse Med 2014; 43: 152-161.
36. Emil A. Tanagho, Jack W. McAninch. Smith Genel Üroloji. Kazancı G. (Çeviren) s.699-707, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009.
37. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. Lancet 2004; 364: 273-283.

38. Cianci V, Ferlazzo E, De Martino G, Vinci A, Gasparini S, Tripodi GG, Aguglia U. Continuous spikes and waves during slow sleep in a child with karyotype 47, XYY. *Epileptic Disord* 2014; 16: 223-226.
39. Gao X, Chen G, Huang J, Bai Q, Zhao N, Shao M, et al. Clinical, cytogenetic, and molecular analysis with 46, XX male sex reversal syndrome: case reports. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 431-435.
40. Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon CJ, et al. The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 690-695.
41. Chandley AC. The chromosomal basis of human infertility. *Br Med Bull* 1979; 35: 181-186.
42. Poongothai J, T.S. Gopenath, S. Manonayaki. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 2009; 50(4): 336-347.
43. Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology* 2014; 2: 339-350.
44. Simoni M, Tüttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Munster experience. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 289-303.
45. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10: 383-393.
46. Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl* 2012; 14: 40-48.
47. Zaimy MA, Kalantar SM, Sheikhha MH, Jahaninejad T, Pashaiefar H, Ghasemzadeh J, Zahraei M. The frequency of Yq microdeletion in azoospermic and oligospermic Iranian infertile men. *Iran J Reprod Med* 2013; 11: 453-458.
48. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1998; 13: 3332-3327.

49. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod* 2003; 18: 1660-1665.
50. Brandell RA, Mielnik A, Liotta D, Ye Z, Veeck LL, Palermo GD, Schlegel PN. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 1998; 13: 2812-2815.
51. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods. *Hum Reprod* 2001; 16: 1543-1547.
52. Kent-First MG, Kol S, Muallem A, Blazer S, Itskovitz-Eldor J. Infertility in intracytoplasmic-sperm-injection-derived sons. *Lancet* 1996; 348: 332.
53. Arnedo N, Nogués C, Bosch M, Templado C. Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation. *Hum Reprod* 2005; 20: 462-468.
54. Walsh TJ, Pera RR, Turek PJ. The genetics of male infertility. *Semin Reprod Med* 2009; 27: 124-136.
55. Donat R, McNeill AS, Fitzpatrick DR, Hargreave TB. The incidence of cystic fibrosis gene mutations in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens in Scotland. *Br J Urol* 1997; 79: 74-77.
56. Liu LJ, Li HG, Gu X, Zhu JW, Zhao K, Tang YP, Xiong CL. Association of CFTR gene polymorphism with congenital bilateral absence of vas deferens in ethnic Han Chinese patients. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2013; 30: 729-732.
57. Drake MJ, Quinn FM. Absent vas deferens and ipsilateral multicystic dysplastic kidney in a child. *Br J Urol* 1996; 77: 756-757.
58. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012; 62: 324-332.
59. Akbal C. Fertilizasyonun Moleküler Temeli. Türkeri L, Özer A, Narter F (editörler). İstanbul: Üroonkoloji Derneği Moleküler Üroloji Kitabı, 2012: 663-667.

60. Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. *Journal of Urology* 2012; 33: 777-788.
61. Singh AP, Rajender S. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive Biomedicine* 2015; 30: 28-38.
62. www.ensembl.org
63. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson A.C, Hsu S, Shi Q, Tilly J.L, Clapham D.E. A. Sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001; 413: 603–609.
64. Santi CM, Orta G, Salkoff L, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL. K⁺ and Cl⁻ Channels and Transporters in Sperm Function. *Curr Top Dev Biol* 2013; 102: 385-421.
65. Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *PNAS* 2007; 104: 1219–1223.
66. Garside DA, Gebril A, Alsaadi M, Nimmo N, Mullen AB, Ferro VA. An update on the potential for male contraception: emerging options. *Open Access J. Contracept.* 2013; 4: 1–11.
67. Carlson AE, Burnett LA, Camino D, Quill TA, Hille B, Chong JA, et al. Pharmacological targeting of native CatSper channels reveals a required role in maintenance of sperm hyperactivation. *PLoS ONE* 2009; 4: 6844.
68. Li H, Ding X, Guan H, Xiong C. Inhibition of human sperm function and mouse fertilization in vitro by an antibody against cation channel of sperm 1: the contraceptive potential of its transmembrane domains and pore region. *Fertil Steril* 2009; 92: 1141–1146
69. Smith JF, Syrityna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y, Lishko PV. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca⁺² channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *PNAS* 2013; 110: 6823–6828.

70. Marquez B, Ignatz G, Suarez SS. Contributions of extracellular and intracellular Ca^{+2} to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Dev Biol* 2007; 303: 214–221.
71. Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Babcock DF. CatSper1 required for evoked Ca^{+2} entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14864–14868.
72. Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LL, Kahrizi K, et al. Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 505–510.
73. Tamburrino L, Marchiani S, Minetti F, Forti G, Muratori M, Baldi E. The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrozone reaction. *Human Reproduction* 2014; 29: 418-428.
74. Bhilawadikar R, Zaveri K, Mukadam L, Naik S, Kamble K, Modi D, Hinduja I. Levels of Tektin 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* 2013; 30: 513-523.
75. Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, et al. Genetic male infertility and mutation of CatSper ion channels. *European Journal of Human Genetics* 2010; 18: 1178–1184.
76. Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 2007; 77: 37–44.
77. Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattani D, Ariento A, Thulliez M, et al. CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11: 497–502.
78. Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone induced Ca^{+2} influx in human sperm. *Nature* 2011; 471: 382–386.

79. Smith JF, Syritsyna O, Fellous M, Serres C, Mannowetz N, Kirichok Y, Lishko PV. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca^{+2} channel in a CatSper2-deficient infertile patient. PNAS 2013; 110: 6823–6828.
80. Lishko PV, Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. J Physiol 2010; 588: 4667–4672.
81. Zeng XH, Yang C, Kim ST, Lingle CJ, Xia XM. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K^{+} current in mouse spermatozoa. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 5879–5884.
82. Santi CM, Martinez-Lopez P, de la Vega-Beltran JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, et al. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. FEBS Letters 2010; 584: 1041–1046.
83. Huang F, Rock JR, Harfe BD, Cheng T, Huang X, Jan YN, Jan LY. Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 21413-21418.
84. Orta G, Ferreira G, Jose O, Trevino CL. Carmen Beltran and Alberto Darszon. Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. J Physiol 2012; 590: 2659-2675.
85. Zanetti N, Mayorga LS. Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. Biol Reprod 2009; 81: 396–405.

6. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Ordu'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Ordu'da tamamladım. 1997 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yüksek öğrenimime başladım ve 2003 yılında bu fakülteden mezun oldum. Daha sonra Ordu'nun Çatalpınar ve Fatsa ilçesinde 7 yıl pratisyen hekimlik yaptım. 2010 yılı Eylül ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve iki çocuk babasıyım.

