

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**İNSAN İNFERTİL ERKEK VAKALARIN SEMEN
ÖRNEKLERİNDE İYON KANAL
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA ÖZAYDIN

2017

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

Yrd. Doç. Dr. Deniz S. ENL



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı: Seda ÖZAYDIN

Tarih: 07.08.2017

İmza

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'S' and 'Ö' followed by a horizontal line.

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

ELAZIĞ

İTHAF SAYFASI

Aileme...

Sevdiklerime...

Sabredenlere...



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim ve tezimin her aşamasındaki yardımlarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a, yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her adımda cesaret veren Sayın Prof. Dr. Halit M. ELYAS'a, tezimin deneysel kısmında bana laboratuvarlarının kapılarını açarak destek olan Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İrfan ORHAN ve Dr. Serkan ÇARKÇI'ya, tez çalışmam boyunca her an yanımda olan ve desteğini esirgemeyen tez projesi yardımcı araştırmacısı çok kıymetli arkadaşım Ahmet TEKTEMUR' a, tezime sağladığı finansmandan dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz ŞEN ve Yrd. Doç. Dr. Aşkın ŞEN'e, yardımlarını esirgemeyen değerli asistan arkadaşlarım İlay BURAN, Betül OZAN ve Nefsun DANIŞ'a, çocukluğumdan bu yana maddi ve manevi her an yanımda olan Derya ÖZTÜRK'e, son olarak eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim ÖZAYDIN aile üyelerimin her birine sonsuz teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. İnfertilite.....	7
4.2. Erkek İnfertilitesinde Etiyoloji.....	8
4.3. Erkek Üreme Sistemi.....	10
4.3.1. Yapısı ve Fonksiyonları.....	10
4.3.1.1. Testisler (Gonadlar).....	11
4.3.1.1.1. Testisin Endokrin Fonksiyonu.....	14
4.3.1.1.2. Testisin Ekzokrin Fonksiyonu.....	15
4.3.1.2. Genital Boşaltma Kanalları.....	22
4.3.1.2.1. Duktus Epididimis.....	22
4.3.1.2.2. Duktus Deferens.....	23
4.3.1.3. Aksesuar Genital Bezler.....	23
4.3.1.3.1. Seminal Veziküller.....	23
4.3.1.3.2. Prostat.....	24
4.3.1.3.3. Bulbo-üretal Bezler (Cowper Bezleri).....	24
4.4. Semen ve Semeni Oluşturan Sekresyonlar.....	25
4.4.1. Semen Genel Özellikleri.....	25
4.4.2. Semeni Oluşturan Sekresyonlar.....	26
4.5. Erkek Kısırlılığının Nedenleri.....	28
4.5.1. Non-Obstrüktif İnfertilite (Yüzde 60).....	28
4.5.1.1. Hormonal Bozukluklar.....	28
4.5.1.2. Genetik Nedenler.....	29

4.5.1.2.1. Sperm Fonsiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar	32
4.5.1.3. Varikosel	32
4.5.1.4. İnmemiş Testisler	32
4.5.1.5. Gonadotoxinlere Maruz Kalmak	33
4.5.1.6. İyatrojenik Nedenler.....	33
4.5.1.7. Orşit.....	33
4.5.1.8. Testis Torsiyonu.....	34
4.5.1.9. Testis Travması	34
4.5.1.10. Testis Tümörleri.....	34
4.5.1.11. Otoimmün İnfertilite	34
4.5.2. Obstrüktif İnfertilite.....	34
4.5.2.1. Vaz Deferens Konjenital Yokluğu	35
4.5.2.2. Vazektomi	35
4.5.2.3. Epididimal Obstrüksiyon	35
4.5.2.4. Ejakülasyon Kanal Obstrüksiyonu	35
4.5.3. Koital İnfertilite	36
4.5.3.1. Ereksiyon Bozukluğu	36
4.5.3.2. Erken Boşalma	36
4.5.3.3. Penis Deformiteleri	36
4.5.3.4. Anejakülasyon.....	36
4.5.3.5. Geri Boşalma.....	37
4.6. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	37
4.6.1. Sperm Analizi.....	38
4.6. İyon Kanalları	41
4.6. 1. Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları.....	43
4.6.1.1. CACNA1B (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, N tipi, alfa-1B alt birimi).....	44
4.6.1.2. CACNA1C (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, L tipi, alfa-1C alt birimi).....	45
4.6.1.3.CACNA1E (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, R tipi, alfa-1E alt birimi).....	45

4.6.1.4. CACNA1G(kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, T tipi, alfa-1G alt birimi).....	46
4.6.1.5. CACNA1H (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, T tipi, alfa-1H alt ünitesi).....	46
4.6.1.6. CACNA1I (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı,T tipi, alfa-1I alt birimi).....	47
4.6.2. TRP (Transient Receptor Potential) Kanalları	48
4.6.2.1. TRPC1 (geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, C altfamilya, 1. üyesi).....	50
4.6.2.2. TRPC3 (geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, C altfamilya, 3. üyesi).....	51
4.6.2.3. TRPC4 (geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, C altfamilya, 4. üyesi).....	51
4.6.2.4. TRPC6 (geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, C altfamilya, 6. üyesi).....	52
4.6.2.5. TRPV6 (geçici reseptör potansiyeli katyon kanalı, V altfamilya, 6. üyesi).....	52
4.6.2.6. IP ₃ R (inositol 1,4,5-trifosfat reseptör,tip 3)	53
4.6.3. GABRA1 (gama-aminobutirik asit (GABA) reseptör A, alfa 1)	55
4.6.4. Nikotinik Asetilkolin Reseptörü(nAChR(α 3, α 4, α 5, α 7, α 9)).....	56
4.6.4.1. CHRNA3 (Kolinerjik reseptör, nikotinik alfa 3)	57
4.6.4.2. CHRNA5 (Kolinerjik reseptör, nikotinik alfa 5)	57
4.6.4.3. CHRNA7 (Kolinerjik reseptör, nikotinik alfa 7)	57
4.6.4.4. CHRNA9 (Kolinerjik reseptör, nikotinik alfa 9)	58
4.6.4.5. CHRNB4 (Kolinerjik reseptör, nikotinik beta 4).....	58
4.6.5. Potasyum Kanalları (KCNE1, KCNA5(K _v 1.5), KCNK5(K _{2p} 5.1)).....	58
4.6.5.1. KCNE1 (potasyum kanalı, voltaj kapılı altfamilya E düzenleyici beta alt birimi 1).....	59
4.6.5.2. KCNA5 (potasyum kanalı, voltaj kapılı shaker ilgili A altfamilya, 5. üyesi).....	59
4.6.5.3. KCNK5 (potasyum kanalı, iki por domainli K alt ailesinin 5. üyesi).....	60

4.6.6. Klorür Kanalları (CLCN3, CLNS1A)	60
4.6.6.1. CLCN3 (voltaja duyarlı klorür kanalı 3).....	61
4.6.6.2. CLNS1A (Nükleotid Duyarlı Klorür Kanalı 1A).....	61
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	65
5.1. Hastaların Seçimi	65
5.2. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Aletler	66
5.3. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Kimyasal Maddeler	66
5.4. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Yöntemler.....	67
5.4.1. Total RNA İzolasyonu.....	67
5.5. Spektrofotometrik RNA Ölçümü.....	68
5.6. Komplementer DNA Sentezi	68
5.6.1. Kullanılan Çözeltiler ve Gereçler	68
5.6.2. Komplementer DNA Sentezi.....	68
5.7. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu	69
5.8. İstatistiksel Değerlendirme	71
6. BULGULAR	72
7. TARTIŞMA	86
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	125

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Standart semen parametrelerinin normal değerleri .	40
Tablo 2. Semen Parametreleri Referans Değerleri .	41
Tablo 3. VGCC alt tiplerinin isimlendirme sistemi, doku lokalizasyonu ve farmakolojik ajanları	48
Tablo 4. cDNA karışım miktarı	69
Tablo 5. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı	69
Tablo 6. RT-PCR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	70
Tablo 7. Uygulanan RT-PCR programı	71
Tablo 8. Lineer korelasyon analizi	73
Tablo 9. Farklı laboratuvar ve biyokimyasal bulgular ile iyon kanalı mRNA ekspresyonları arasındaki ilişki	75

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Erkek genital sistemi oluşturan organların sematik çizimi.	11
Şekil 2. Testisin Yapısı.....	13
Şekil 3. Seminifer tübüllerde spermatogenezis.....	18
Şekil 4. Matür spermin şematik görünümü.....	22
Şekil 5. Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının alt türleri ve alt birim kompleksi	44
Şekil 6. Memeli TRP kanallarının transmembran filogenetik ve topoloji ağacı.	49
Şekil 7. Memeli sperm hiper aktivasyonu ve kapasitasyonu sırasında görev alan iyon akımları	54
Şekil 8. GABAA reseptörü.....	55
Şekil 9. Pentamer ligand kapılı iyon kanallarının yapısı	56
Şekil 10. Potasyum kanal monomerlerinin yanıl görünüşü.....	58
Şekil 11. Klorid iyon kanalı	62
Şekil 12. İnsan ve fare sperminde bulunan iyon kanalların lokalizasyonu	63
Şekil 13. CACNA1B Gen Ekspresyonu	76
Şekil 14. CACNA1E Gen Ekspresyonu	76
Şekil 15. CACNA1G Gen Ekspresyonu.....	77
Şekil 16. CACNA1H Gen Ekspresyonu.....	77
Şekil 17. CACNA1I Gen Ekspresyonu.....	78
Şekil 18. CHRNA3 Gen Ekspresyonu	78
Şekil 19. CHRNA5 Gen Ekspresyonu	79
Şekil 20. CHRNA9 Gen Ekspresyonu	79
Şekil 21. CHRNB4 Gen Ekspresyonu	80
Şekil 22. TRPC1 Gen Ekspresyonu	80
Şekil 23. TRPC3 Gen Ekspresyonu	81
Şekil 24. TRPC6 Gen Ekspresyonu	81
Şekil 25. TRPV6 Gen Ekspresyonu.....	82
Şekil 26. CLNS1A Gen Ekspresyonu	82
Şekil 27. GABA1 α Gen Ekspresyonu.....	83
Şekil 28. KCNA5 Gen Ekspresyonu	83
Şekil 29. KCNE1 Gen Ekspresyonu	84
Şekil 30. KCNK5 Gen Ekspresyonu	84

Şekil 31. CLCN3 Gen Ekspresyonu	85
--	-----------



1. ÖZET

Sperm iyon kanalları fertilizasyon, sperm hareketliliğinin kontrolü, yumurtaya yönelik kemotaksis ve akrozom süreçlerinde önemli rollere sahiptir. Fare ve insanlarda erkek infertilitesi bazı iyon kanallarının yokluğundan veya mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Anormal sperm parametrelerine sahip infertil hastalarda iyon kanal ekspresyonu hakkında çok az çalışma mevcuttur. Mevcut çalışma sperm bozukluklarına sahip hastaların spermatozoaları ve normozoospermik bireylerin spermatozoalarında iyon kanal ekspresyon profillerini kıyaslamayı hedeflemektedir.

Çalışmaya 150 vaka katılmıştır. Normozoospermik, oligozoospermik, astenozoospermik, teratozoospermik ve oligoastenoteratozoospermik olmak üzere sayıca eşit 5 gruptan oluşmaktadır. Kantitatif Real Time-PZR kullanılarak asetilkolin, Ca^{+2} , K^{+} , Cl^{-} ve GABA'da rol alan 19 iyon kanalının mRNA seviyeleri değerlendirilmiştir.

Biz oligozoospermik hastalarda CACNA1B, CACNA1H, TRPC1, TRPC3, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB4 genlerinin, astenozoospermik grupta CACNA1H, TRPC3 and CHRNA5 genlerinin, teratozoospermik grupta TRPC1, CHRNA3, CHRNA5 and CHRNB4 genlerinin ve oligoastenoteratozoospermi grubunda da CACNA1E, CACNA1H, CHRNA3, CHRNA5, CHRNA9, CLCN3, TRPC3 ve TRPC6 genlerinin kontrol örneklerine nazaran önemli ölçüde yüksek ekspresyonunu belirledik. Buna ek olarak bulgularımıza göre astenozoospermik erkeklerde CACNA1B, CACNA1G ve CLCN3 genlerinin ve teratozoospermik erkeklerde CACNA1G, CLNS1A, KCNA5 ve KCNE1 genlerinin

normozoosprmk erkeklere kıyasla belirgin ölçüde daha düşük ekspresyonu mevcuttur.

Bu sonuçlar insan sperm fizyolojinde iyon kanallarının önemli bir rolü olabileceğini açığa çıkarmıştır. İyon kanal ekspresyonlarının upregülasyonunun veya downregülasyonunun neden olduğu iyon akışındaki değişimler; pek çok farklı aşamada sperm fizyolojisinin düzenlenmesinde görev alan hücre sinyallerinde temel geçiş elementelerini etkileyerek erkek infertilitesine katkı sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler; Erkek infertilitesi, iyon kanalı, RT-PCR, akrozom reaksiyonu, spermde hücre hacim düzenlenmesi, motilite

2. ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF ION CHANNEL EXPRESSIONS IN SEMEN SAMPLES OF HUMAN INFERTILE MALE CASES

Background: Sperm ion channels play an important role in the process of fertilization, the control of sperm motility, chemotaxis toward the egg and the acrosome reaction. The male infertility of mice and humans arise from mutation or absence of some ion channels. It is rarely reported the ion channel expression in infertile patients with abnormal sperm parameters. Present study aim to compare the expression profiles of ion channel in the spermatozoa of normozoospermic and the spermatozoa of subjects with sperm disorders.

Methods: Study enrolled hundred fifty subjects. Five numerically equal groups were include the normozoospermic, oligozoospermic, asthenozoospermic, teratozoospermic and oligoasthenoteratozoospermic. We evaluated the mRNA levels of nineteen ion channel genes involved in Ca^{+2} , K^{+} , Cl^{-} , GABA and acetylcholine using quantitative real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Result(s): We have statistically significant the higher expression of CACNA1B, CACNA1H, TRPC1, TRPC3, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB4 genes in oligospermic patients, CACNA1H, TRPC3 and CHRNA5 genes in the asthenozoospermic group, TRPC1, CHRNA3, CHRNA5 and CHRNB4 in the teratospermic group, CACNA1E, CACNA1H, CHRNA3, CHRNA5, CHRNA9, CLCN3, TRPC3 and TRPC6 genes in oligoasthenoteratozoospermic group than control subjects. The statistically significantly lower expression was found CACNA1B, CACNA1G and CLCN3 genes in the astenospermic men and

CACNA1G, CLNS1A, KCNA5 and KCNE1 genes in teratospermic men compared with normozoospermic men.

Conclusion(s): These results unambiguously accomplish an important role of ion channels in human sperm physiology. Changes in ion flux caused by the upregulation or downregulation of ion channel expressions may provide the possible contribution to male infertility by affecting the fundamental transduction elements in cell signaling involving in the regulation of sperm physiology at many different levels.

Key Words: male infertility, ion channel, RT-PCR, acrosome reaction, cell volume regulation in sperm, motility

3. GİRİŞ

Bir yıl süreyle düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamama olarak tanımlanan infertilite, çiftlerin yaklaşık %15'ini etkilemekte olup erkeklerde ejakulasyon bozukluğu ile sperm kalite ve kantite bozukluklarına bağlıdır. Erkek faktörlü infertilite vakalarının hemen hemen yarısı azospermi, oligospermi gibi anormal spermatogenezele ilişkilidir (1). İnfertilitede sperm morfolojisi (ışık ve elektron mikroskopi kullanılarak), sperm fonksiyonu (hareketliliği, akrozom reaksiyonu, sperm zona pellucida etkileşimi, oksidatif stres) ve nükleus değerlendirmesi (kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, anöploidi) gibi anılanlar temel inceleme alanlarıdır (2).

Sperm fertilizasyon sürecinde ilk olarak çeşitli iyon konsantrasyonu, osmotik basınç ve pH ile değişebilen bir mikroçevre olan kadın üreme sistemine girer ve bu süreçte gerçekleşen 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 (3).

Memeli sperm heterojenitesi genel olarak morfoloji, motilite, nükleer farklılaşma, kapasitasyon ve reseptör durumu gibi birçok seviyede tanımlanabilir (4). Spermiyogram testi sonucu spermlerin dölleme sınırının altında olması (sperm konsantrasyonu 20 mil/ml den az) izole oligozoospermi, spermlerin hareket edememesi veya normalden daha düşük hareket etmesi (ileri progresyonu 3. ve 4. derecede olan spermleri %50'den az) izole astenozoospermi, (normal yapıdaki spermleri %50'den az) sperma içerisinde şekil bozukluğu gösteren

spermatozoonların bulunuşu teratozoospermi ve sperma içindeki spermatozoonların miktar, biçim ve hareket bakımından normal oluşu normozoospermi olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca anormal spermatogenez sonucu oluşan oligo-asteno-teratozoospermi (OAT) az sperm sayısı, az hareketlilik ve büyük miktarda anormal sperm olarak tanımlanmaktadır (5).

İnsan erkek infertilitesinin moleküler temeli hakkında hala anlaşılmamış pek çok şey vardır. Literatürde infertil hastalarda iyon kanal ekspresyonlarının araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda oligoastenoteratozoospermi, izole astenozoospermi, izole oligozoospermi ve izole teratozoospermi infertil erkeklerde $Ca_v2.2$ (CACNA1B), $Ca_v1.2$ (CACNA1C), $Ca_v2.3$ (CACNA1E), $Ca_v3.1$ (CACNA1G), $Ca_v3.2$ (CACNA1H), $Ca_v3.3$ (CACNA1I), TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6, TRPV6, IP_3R , $\alpha GABA_A R$, nAChR($\alpha 3$), nAChR($\alpha 5$), nAChR($\alpha 7$), nAChR($\alpha 9$), nAChR($\beta 4$), KCNE1, KCNA5 ($K_v1.5$), KCNK5 ($K_{2p5.1}$), CLCN3, CLNS1A iyon kanal ekspresyonlarının normal sperm sayısına sahip fertil bireylerle karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfertilite

Üreme çağındaki çiftlerin gebelik elde etme kapasitesi fertilité; bu çiftlerin istemelerine ve bir yıl korunmasız cinsel yaşama rağmen çocuk sahibi olamamaları ise infertilite olarak tanımlanmaktadır. Literatürde fertilité; hiç gebelik olmamışsa primer infertilite, canlı doğum gerçekleşsin veya gerçekleşmesin, en az bir gebelik oluşmuşsa sekonder infertilite olarak gruplandırılır (6,7).

Çiftlerin yaklaşık %15'i infertiliteden müzdaripken tüm infertil çiftlerin yaklaşık %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü tespit edilmiştir. Aynı zamanda %20-25 çiftte hem erkek hem de kadından kaynaklanan sorunlar birlikte gözlenmektedir. İnfertil çiftlerin %15'inde ise tüm tanısal tetkiklere rağmen belirgin bir infertilite nedeni tanımlanamamıştır (7).

İnfertilite; kadın, erkek ya da her ikisine ait nedenlerle meydana gelebilirken gebeliğin oluşması ve normal bir şekilde devam edebilmesi için aşağıdaki temel basamakların bir arada ve eksiksiz olması gereklidir.

- a- Normal bir spermatogenez, ejakulasyon ve koital fonksiyon süreci geçirmiş olan fertil spermlerin yeterli miktarda vajinaya bırakılması gerekmektedir.
- b- Bu spermlerin servikal mukusa tutunmasının akabinde servikal kanalı geçmesi gereklidir.
- c- Yumurta ile spermin birleşmesinde mekanik bir engel bulunmamalıdır, yani tuba uterinaların kapalı olmaması gerekmektedir.

a- Spermin yanı sıra yumurta da fertil özellikte olmalıdır; bunun için sağlıklı yapıda yumurta içeren overler ve follikülogenez için normal hormonal düzeye ihtiyaç vardır.

b- Sperm ovumu dölleyebilmelidir. Burada immünolojik mekanizmaların belirleyici olduğu düşünülmektedir.

c- Sağlıklı bir endometrium yapısı, hormonal ve immün denge varlığında döllenmiş yumurta uterusu gelerek implante olur.

d- Embriyonun gebelik süresince gelişimini normal bir şekilde devam ettirebilmesi için uygun bir endometrium ve uterus kavitesi gerekmektedir.

Tüm koşulların normal seyretmesine rağmen, endometriyozis veya henüz açıklanamayan bazı nedenlerden dolayı gebelik gerçekleşmeyebilir (8).

4.2. Erkek İnfertilitesinde Etyoloji

%15 olarak belirlenen infertilite insidansı son yıllarda giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yürütülen ve infertilite nedenlerinin araştırıldığı 7273 evli infertil çifti içeren bir çalışma sonucunda infertilitenin %41 kadın, %24 erkek ve %24 hem kadın hemde erkek kaynaklı olduğu tespit edilirken %11'inde ise herhangi bir neden belirlenememiştir (9).

Bu sonuçlara dayanarak infertil çiftlerin yaklaşık %48'inde erkek faktörünün rol oynadığı söylenebilir. DSÖ tarafından belirlenen erkek faktörlü etyolojik gruplar; seksüel/ejakülatuar disfonksiyon, immünolojik nedenler, aksesuar bezlerin enfeksiyonu, izole seminal plazma anormallikleri, nedeni belirlenememiş grup, iatrojenik nedenler, sistemik nedenler, akkiz testiküler hasar, konjenital anomaliler, varikosel, endokrin nedenler, idiopatik oligozoospermi,

idiopatik teratozoospermi, obstrüktif kriptozoospermi, obstrüktif azoospermi ve idiopatik azoospermi şeklindedir (9,10).

Sperm analizine göre erkek infertilite etyolojisi ise şöyle sınıflandırılmaktadır;

1. **Aspermi;** retrograd ejakulasyon, psikojenik bozukluklar, vasküler nedenler, ereksiyon bozuklukları, hormonal nedenler
2. **Hipospermi;** Travma ve tümörleri, androjen eksikliği, prostat, vas deferensin ve seminal veziküller enfeksiyonu, kanal tıkanıklıkları, retrograd ejakulasyon, emisyon bozukluğu
3. **Hiperspermi;** Koit aralıklarında uzama, seminal veziküller ve prostatın enfeksiyonu
4. **Ejakulat koagülasyon bozukluğu;** Vezikula seminalis patolojileri
5. Ejakulat **likefaksiyon bozukluğu;** Bulboüretal endokrin ve prostat patolojileri
6. **Azoospermi;** Genetik ve hormonal nedenler, germinal aplazi, bilateral vas deferansın yokluğu, vas deferens ve ejakulator kanallarda tıkanıklık
7. **Oligozoospermi;** İdiopatik, sistemik ve genital enfeksiyonlar, kromozomal nedenler, inmemiş testis, sistemik kronik hastalıklar, ilaçlar, koit sıklığı, genital enfeksiyonlar,
8. **Astenozoospermi;** Antisperm antikor varlığı, genital enfeksiyonlar, Kartagener Sendromu, varikosel, ısı, toksik maddelerle temas, genetik nedenler, ilaçlar, epididim fonksiyon bozuklukları, androjen yetersizliği, prostat ve seminal vezikül fonksiyon bozuklukları, koit sıklığında azalma, ejakulat vizkozite bozuklukları,

9. Teratozoospermi; Kromozomal nedenler, seminal kanallarda deformasyon, toksik maddelerle temas, emisyon bozukluğu, epididim enfeksiyonu

10. Nekrozoospermi; İdiopatik, toksik maddelerle temas, koit sıklığında azalma, Kartagener Sendromu (11).

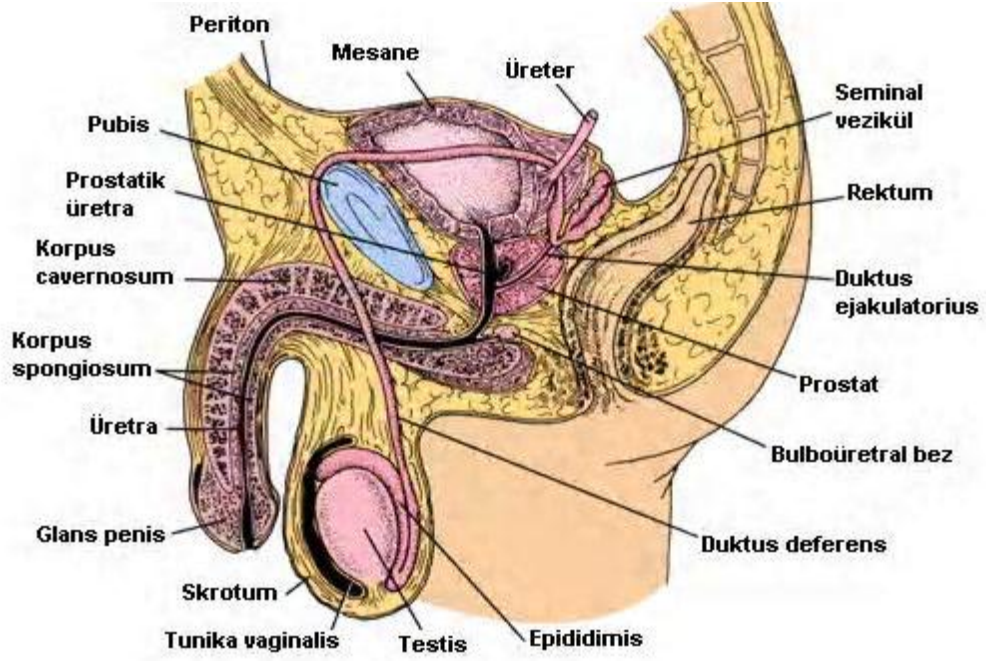
Hem kadınlarda hemde erkeklerde artan yaşın etkisiyle fertilite azalırken, bu etki kadınlarda daha belirgindir. Erkek fertilitesindeki belirgin azalma yaklaşık 50 yaşından önce görülmemesine rağmen semen parametrelerindeki bozulmalar 35 yaşından sonra saptanabilmektedir. Kadınlarda ise fertilite erken 20'li yaşlardan geç 30'lu yaşlara kadar yaklaşık %50 azalmaktadır (12).

4.3. Erkek Üreme Sistemi

Semen analizlerinin değerlendirilebilmesi ve infertilite nedeninin belirlenebilmesi için; semen üretiminin gerçekleştiği erkek üreme sisteminin yapısının ve fonksiyonlarının iyice bilinmesi gerekmektedir.

4.3.1. Yapısı ve Fonksiyonları

Sperm üretimi ve taşınmasından sorumlu olan erkek üreme sistemi dört farklı yapıdan oluşmaktadır. Bunlar ekzokrin ve endokrin salgılama fonksiyonlarından dolayı karışık bez özelliğine sahip olan **gonadlar** (testis), **genital boşaltım kanalları** (duktus efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius, üretra), boşaltım yollarına açılan **aksesuar genital bezler** (veziküla seminalis, prostat, bulbo-üretal bezler ve üretal bezler) ve **penis**'tir (13).



Şekil 1. Erkek genital sistemi oluşturan organların sematik çizimi (14).

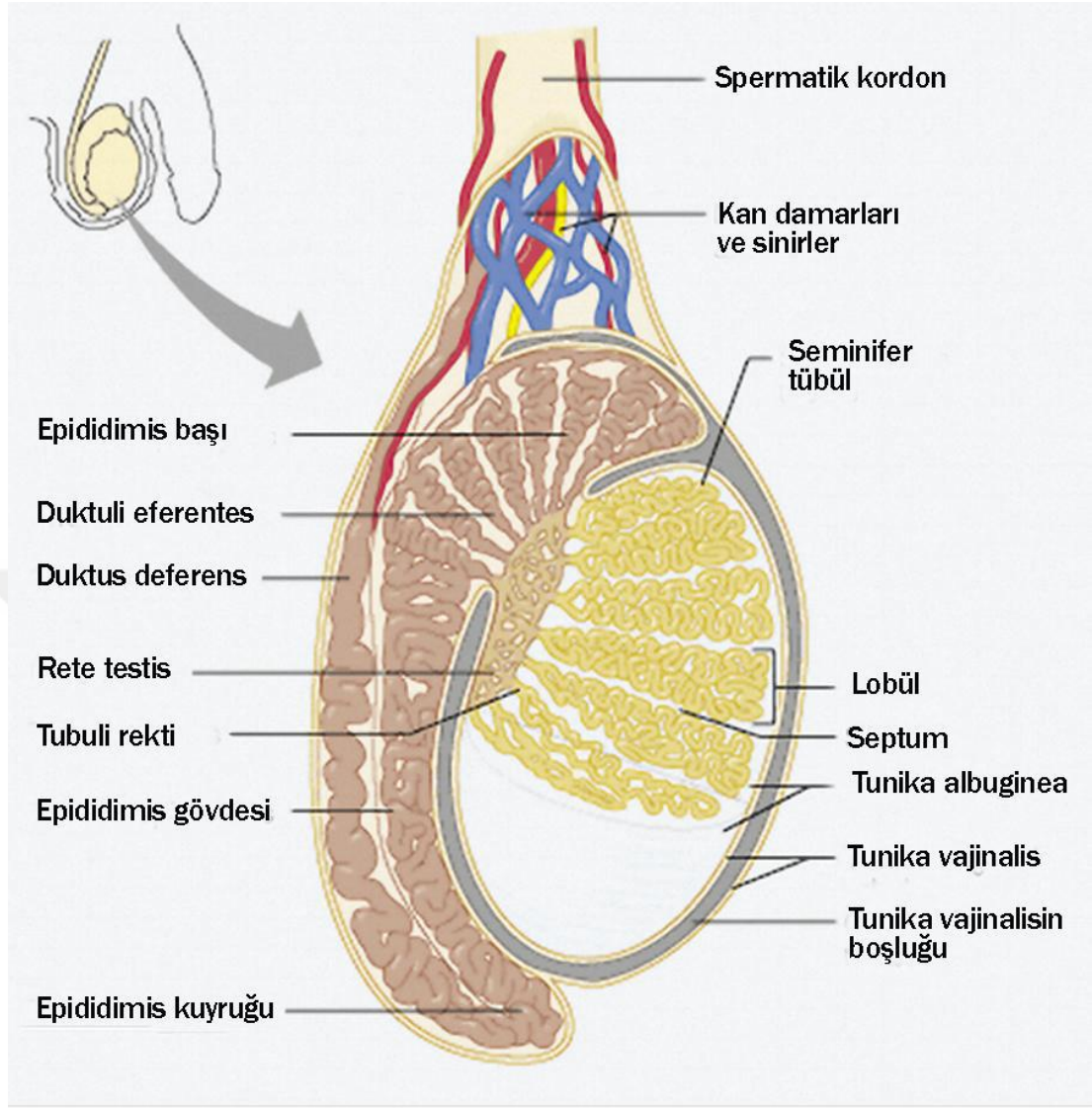
4.3.1.1. Testisler (Gonadlar)

Yan kısımları yassılaştırmış, 2,5 cm genişlikte, 4-5 cm uzunlukta, 3 cm kalınlıkta ve 10-15 gram ağırlığındaki testisler sperm ve testosteron üretimden sorumlu esas erkek üreme organıdır (15). Ortalama 20 ml olan testiküler hacimle luteinizan hormon (LH), folikül stimulan hormon (FSH) ve prolaktin arasında doğrusal bir korelasyon belirlenmiştir (16). Testisin glandüler dokusu seminifer tübüllerden oluşup, bir insana ait testisteki seminifer tübüller toplamda 250 metre uzunluğundadır (17). Seminifer tübüller testisin ekzokrin kısmını meydana getirirler ve salgılama biçimi aktif holokrin olup salgılama materyali canlı hücre spermiumdur. Lobülün tepesine doğru kıvrımlarını kaybeden seminifer tubuller, tubuli rektilerle devam eder. Bunlar ise mediastinumda birbirleriyle anastomozlaşarak **rete testis** denilen bir sistemi oluştururlar. Sonrasında seminifer

tubullerin içeriği rete testis kanallarına aktarılır. Bu nedenle rete testiste oluşabilecek herhangi bir bozukluk infertiliteye neden olabilir (18).

Aorttan çıkan arteria testikularis testisleri besler. Oldukça zengin bir kollateral ağı sahip olan testis ve epididimisin venleri plexus pampiniformis'i oluşturur. Testisin venöz yapısının variköz hal almasına **varikosel** denir. Kansızlığa oldukça duyarlı olan testisler; testiküler arterin kesilmesi, bağlanması veya torsiyone olmasıyla hasara uğrayarak infertiliteye neden olabilir (19).

Testisin innervasyonu için sempatik ve parasempatik lifler plexus cöliakustan arteria testikularis çevresinde bulunan plexus testikularis ile gelirler. Bu sinirler bezlerin çalışmasını düzenler. Ereksiyon parasempatik kaynaklı uyarılarla oluşur (18).



Şekil 2. Testisin Yapısı (14).

-Sertoli Hücreleri: Bazal lamina üzerinde oturan ve seminifer epitelin tüm tabakasında yer alan piramidal hücreler olan sertoli hücreleri; germ hücreleri arasında oldukça düzenli yerleşmişlerdir. Testis sitoplâzmasının üst yüzeyinde spermiumların yerleşmesine imkân sağlayacak girintiler mevcutken, yan uzantılarla spermatogonium ve spermatositler arasına uzantı yapmıştır. Spermatogoniumlar ve sertoli hücreleri bazal laminaya oturmuş vaziyettedir. Aralarında yer alan zonula okludenslerin sayesinde ekstrasübüler boşluktan

lümene makromoleküllerin geçişi engellenir ve bu yolla germ hücrelerin proteinlerine karşı antikor üretilmesi engellenmiş olur. Peritübüler doku ve sertoli hücrelerinin bir araya gelmesiyle oluşan bu yapı **kan-testis bariyeri** olarak isimlendirilmektedir.

Gelişen germ hücrelerine; sertoli hücreleri mekanik destek sağlarlar ve bu hücrelerin otoimmün reaksiyonlardan korunmasına ve beslenmesine yardım ederler. Sertoli hücreleri ısıya, iyonize radyasyona ve toksik ajanlara karşı oldukça yüksek bir dirence sahiptirler.

-İnterstisyum: Areolar bağ dokusu, seminifer tübüllerin arasını doldurmaktadır ve kan damarları etrafında tek tek ya da gruplar şeklinde testise özgü olan 15-20 µm çapında **Leydig hücreleri** yer almaktadır. Plasental kökenli gonadotropinlerin aktivitesiyle, leydig hücreleri fetal yaşamın 4-5. ayında tam anlamıyla gelişmektedir. Doğumun ardından atrofiye olurlar ve pubertede LH indüklemesiyle açığa çıkmaya başlarlar. Sertoli ve Leydig hücreleri radyorezistanken germinal hücreler röntgen ışınlarına karşı aşırı derecede hassastır.

-Spermatogenik Hücreler: Lümen ve bazal lamina arasında yer alan sertoli hücreleri, dört-sekiz katlı şekilde sıralanan hücre serileridir ve bu hücreler çoğalarak ve şekil yönünden farklılaşarak olgun spermiumları meydana getirirler.

4.3.1.1.1.Testisin Endokrin Fonksiyonu

Testislerde seminifer tübülliler arasında lokalize olan leydig hücreleri testosteron üretiminden sorumludur ve testosteron lokal etkide bulunarak seminifer tübüllilerin sperm üretmesini aktive etmektedir. Bu demektir ki, testosteronun yokluğunda spermatogenez meydana gelmez. Ayrıca testosteron

erkeklerde birincil ve ikincil seks karakterlerinin gelişimine de katkı sağlamaktadır. Testislerin endokrin fonksiyonu yaşlılığa kadar devam eder ve hormon sekresyonu sürekli dir. Yaşlanmayla beraber leydig hücre miktarı ve bununla bağlantılı olarak androjenik fonksiyonu yavaş yavaş azalmaktadır.

Hipofiz ön lob hücrelerinin salgıladığı LH tarafından leydig hücrelerinin testosteron salgılaması kontrol edilirken, ön hipofizin salgıladığı diğer bir gonadotropin olan FSH; sertoli hücrelerini etkileyerek spermatogenezi kontrol etmektedir.

Hipotalamohipofizer sistem ile testis arasında etkili olan bir negatif geri besleme kontrol mekanizması bulunmaktadır. Testosteron düzeyindeki artış, hipotalamusun gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH)'unu engellemektedir ve böylece ön hipofizden LH ve FSH sekresyonunu azaltmaktadır. Ayrıca ön hipofizde LH salgılayan hücreler testosteron sayesinde direkt olarak da inhibe edebilmektedir. Bunlara ek olarak, sertoli hücreleri ön hipofizi ve hipotalamusu etkilemek suretiyle, FSH salgılanmasını inhibe edebilen **inhibin** adında bir glikoprotein salgılamaktadır (16).

4.3.1.1.2. Testisin Ekzokrin Fonksiyonu

Temel üreme işlevi olarak erkeklerde testislerden sperm üretilmektedir. Seminifer tübüllerde yer alan germinal hücrelerden spermatozoidler meydana gelmektedir ve bu hücreler pubertede olgunlaşmaktadır.

Testislerin skrotumda bulunmasıyla normal spermatogenez gerçekleşir (20). Yaşlanma spermatogenezin sonlanmasında kaçınılmaz bir faktör değildir, çünkü 80-100 yaşında bireylerde de spermatozoidler bulunabilir (21). Ancak yaşlı

bireylerdeki spermatozoidler gençlerle kıyaslandığında kalite ve kantite bakımından farklıdır.

Spermatogoniumdan spermiumun oluşumuna kadar iki aşama bulunmaktadır:

a- Spermatogoniumdan çoğalma ve farklılaşma sonucu spermatidlerin oluşmasına **spermatositogenezis** denir.

b- Şekil değiştirerek spermatidden spermiumun olduğu evre ise **spermiogenezis** olarak isimlendirilmektedir.

a- Spermatositogenezis

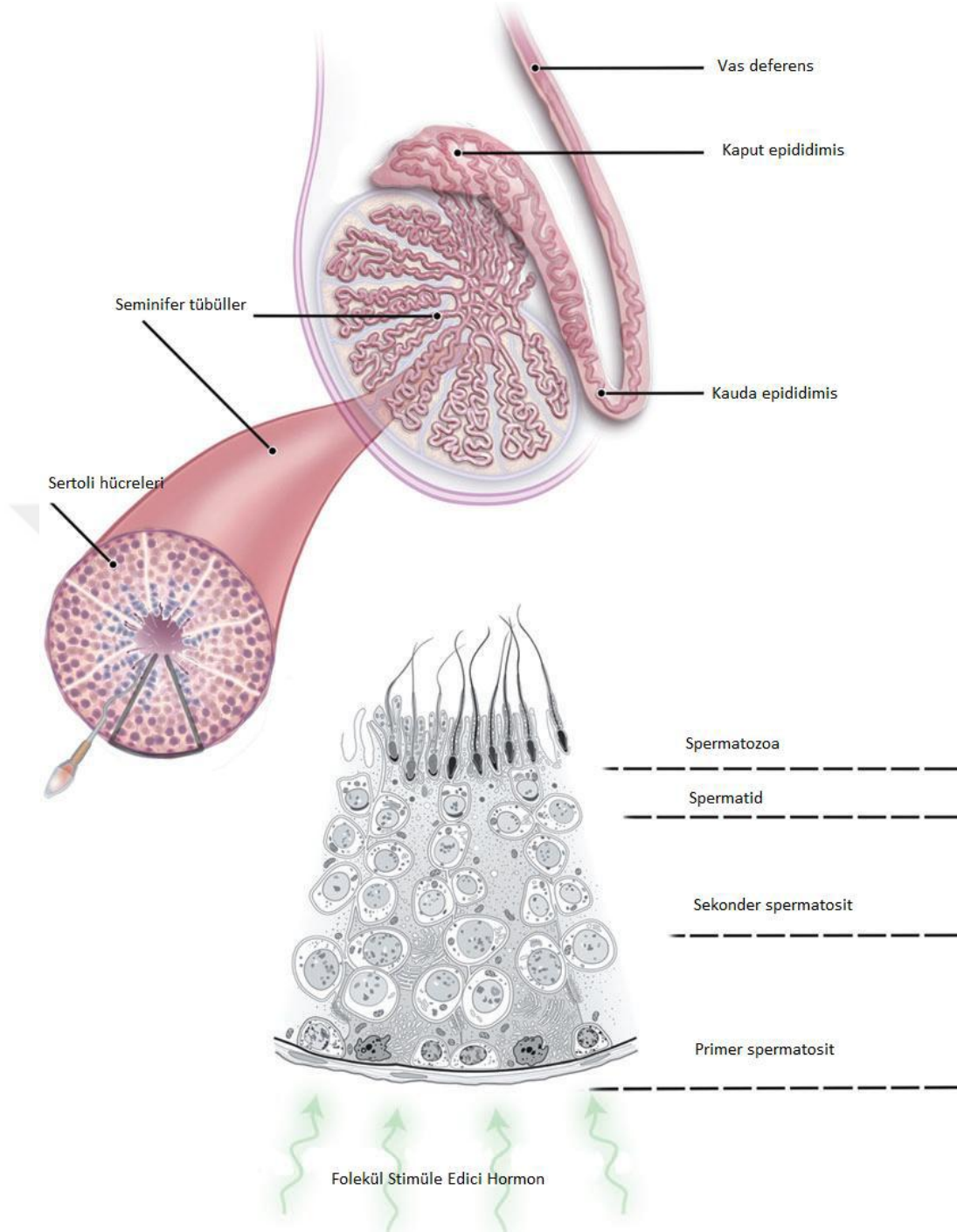
Ergenlikte hipotalamus tarafından salgılanan hormonların etkisiyle, hipofiz ön lobundan gonadotropik hormonlar olan FSH ve LH salgılanmaya başlar. Ergenlikle beraber bu hormonların uyarımıyla, kordların içindeki katı yapı boşalarak seminifer tübülleri oluşturur ve bununla eş zamanlı olarak ergenliğe kadar kendini aynı şekilde muhafaza eden primordial üreme hücreleri de spermatogoniumlara farklılaşırlar (22).

Spermatogoniumlar: spermatogonialar kromatinlerinin koyulu açıkli boyanmasından dolayı koyu tip A, soluk tip A ve tip B olmak üzere gruplandırılmıştır. Kök hücre benzeri bir fonksiyona sahip olan Tip A spermatogonia hücreleri kendilerinden daha büyük olan tip B hücrelerini meydana getirirler. Yani Tip A hücreleri mitozla çoğalmaktadır ve oluşan hücrelerin %50'si tip A olarak sürece devam ederken %50'side Tip B hücrelerine dönüşmektedir. Oluşan Tip B hücrelerinin mitoz bölünme geçirmesiyle de primer spermatositler meydana gelmektedir.

Primer Spermatosit (Spermatosit 1) : Lümeneye daha yakın bir şekilde lokalize olan primer spermatositler, aynı zamanda spermatogoniumlara komşudur.

Bu hücreler meydana gelir gelmez 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve bu evrenin süresi uzun olduğundan dolayı görülen hücrelerin çoğu spermatosit I' dir. Bu evredeki hücreler diploid kromozom taşımaktadır ve uzun süren bir profaz safhasından (22 gün) sonra 1. mayotik bölünmeyi tamamlarlar ve iki adet haploid kromozom sayısına sahip sekonder spermatositi meydana getirirler.

Sekonder spermatosit (Spermatosit 2) : Sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı olan bu hücreler, akabinde ikinci mayotik bölünmeye girerler ve haploit (23) kromozom içeren sekonder spermatidleri oluştururlar. Bu süreç spermatositogenez olarak isimlendirilir. İki aşamadan oluşan mayoz bölünme sonucunda, bir primer spermatositten haploid kromozom sayısına sahip ikisi $22+X$ diğer ikisinde $22+Y$ kromozom düzenine sahip olan; dört adet **spermatid** meydana gelir (23).



Şekil 3.Seminifer tübüllerde spermatogenezis (24).

b- Spermiogenezis

Spermatidler; spermiogenezis evresinde sertoli hücrelerinin sitoplâzmasına gömülerek morfolojik olarak değişmeye başlarlar ve bu sürecin sonunda matür erkek germ hücrelerini oluştururlar. Bu farklılaşma süreci (spermiogenezis)

sırasıyla golgi fazı, başlık fazı, akrozom fazı ve olgunlaşma fazı olmak üzere dört evreden oluşmaktadır.

Golgi Fazı: Spermiogeneizde ilk farklılaşma spermatidin golgi kompleksinde meydana gelmektedir. Soluk boyanan sitoplâzması ve çekirdeğe yakın bir golgi kompleksi içeren spermatidlerin, golgi yakınlarında proakrozom granülleri mevcuttur. Bu granüller büyük bir vezikül şeklinde bir araya gelerek; tek bir granül olan akrozomik granülü oluştururlar. Çekirdeğe doğru ilerleyen bu golgi kökenli akrozomal vezikül çekirdek dış zarına tutunur.

Başlık Fazı: Akrozomal başlık; bu akrozomal vezikül zarının yeniden şekillenmesiyle oluşur ve çekirdek yüzeyinde, çekirdeğin 1/2 ya da 2/3'ünü kaplayacak şekilde büyüyerek yayılır. Bunun sonucunda **akrozom (akrozomal kep)** adını alan ve akrozomal yapıları içerisinde barındıran çekirdeğin ön kısmını tamamen kaplayan bir başlık oluşturur.

Akrozom Fazı: Bu fazda spermatid çekirdeğinin ön kutbu seminifer tübüllerin tabanına doğru hareket eder ve çekirdek yoğunlaşır. Akrozom sırasında bir çift sentriol çekirdeğin arka kutbuna doğru yönelir ve proksimal ve distal sentriolleri oluşturur. Bu yapılar oldukça önemlidir; çünkü distal sentriol spermiumun flagellumunun merkezindeki aksonemi meydana getirirken, proksimal sentriol çekirdeğin arka kutbundaki derin bir çukura gömülür ve spermium hücresinin boyun kısmında yer alır. Manşet olarak tanımlanan mikrotübüller çekirdek alt kutbuna tutunurlar ve enerji ihtiyacını sağlayan mitokondriler flagellumun fibrilleri arasından aşağıya doğru ilerler (orta parça).

Olgunlaşma Fazı: Bu fazda artık olan spermatid sitoplâzması, lizozom bakımından zengin sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve spermiogenezis

sonucunda meydana gelen bu matür erkek üreme hücreleri; **spermatozoon** (çoğullu spermatozoa) olarak isimlendirilir. Bu hücreler morfolojik olarak olgunken işlevsellik bakımından immatürdür. Meydana gelen bu spermatozoa, seminifer tübül lümenine girmesinin ardından, epididime doğru ittirilir ve başlangıçta sperm hareketliliği çok düşükken, epididimde motilite maksimuma ulaşır (25). Matür olan spermatidin sertoli hücresinden ayrılıp, tübül lümenine spermatozoon halinde geçişi; **spermiasyon** olarak isimlendirilmektedir. Bir spermatogoniumun olgunlaşması sonucu spermatozoonu meydana getirme süreci; ortalama 70 ± 4 günken, spermiasyon ve ejakülata geçiş için gereken süre 10-14 gündür (26).

Spermatozoa

Spermatozoa iki kısımda incelenmektedir. İlk kısım olan baş bölgesi akrozomal ve postakrozomal olmak üzere iki yapıya ayrılırken, ikinci kısmı olan kuyruk ise boyun, orta kısım, esas kısım ve son kısım olmak üzere dört bölüme ayrılmıştır (27).

Önden bakıldığında oval bir yapıda görünen spermium başı; yandan armut şeklinde görülmektedir ve ortalama 4-5 μm uzunlugunda, 2.5 -3.5 μm genişliğindedir. Spermium çekirdek ve akrozom olmak üzere iki bölümde incelenir. İç ve dış olmak üzere iki membran ile çevrelenmiş olan **akrozom**; kep şeklinde spermium başının ön kısmında yer almaktadır ve aslen modifiye olmuş lizozom şeklinde tanımlanabilir. Döllenme için gereken birçok hidrolazı barındıran akrozomda bulunan en önemli enzimler ise hiyalüronidaz, akrozin, nöraminidaz, asit fosfataz, arilamidaz, fosfolipaz, esteraz, arilsülfataz-B, proakrozin, N-asetil glukozaminidaz, kollajenazdır. Döllenme sürecinde zona

pellusidayı geçmekte önemli role sahip olan akrozin; akrolizin aracılığıyla aktive olan proakrozinin ejakulasyon sonrası halidir ve servikal kanalda bulunan mukus akışkanlığının azalmasında da önemli bir role sahiptir. Çünkü akrozin granüloza hücrelerini çevreleyen proteinlerin ayrıştırılmasında etkili olan; tripsin benzeri bir etkiye sahiptir.

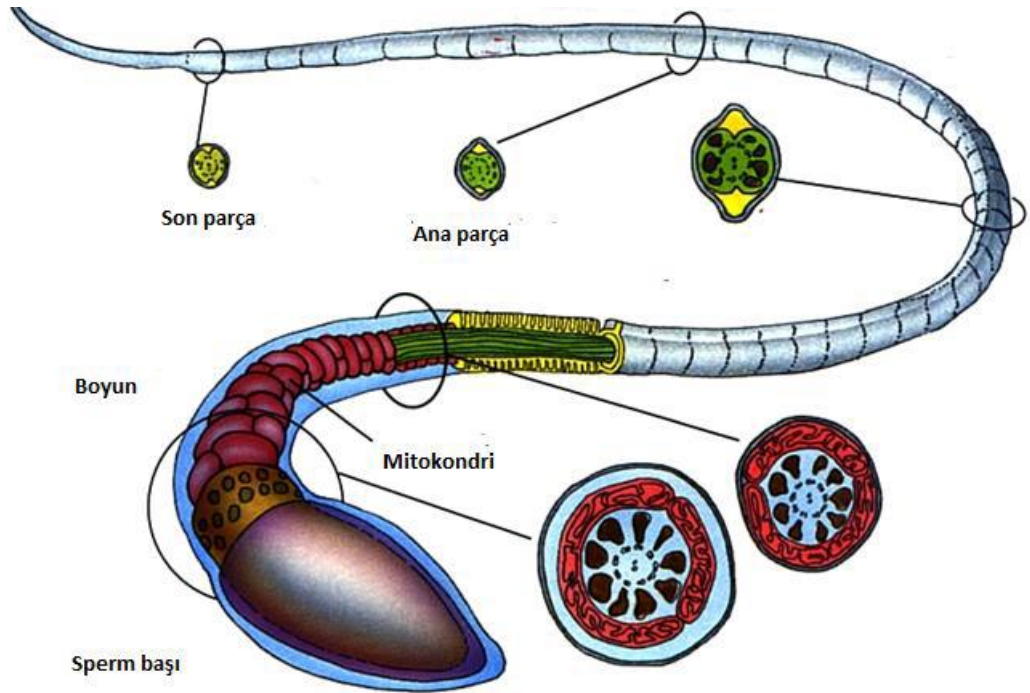
Çekirdek; yoğun ve hacim olarak oldukça küçülmüş yapıdaki kromatin maddesi ve onu çevreleyen bir çekirdek membranından meydana gelmiştir. Hacim olarak küçülmesi sperme hareketlilik sağlar.

Kuyruk; farklı kalınlık ve tabakalara sahip olmasından dolayı yaklaşık 55 µm uzunluğunda olan sperm kuyruğu; boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört kısımdan meydana gelmektedir. Sperm kuyruğu; boyundan başlayıp kuyruğun uç kısmına kadar uzanan, merkezinde bir çift santral mikrotübül ve onu çevreleyen dokuz çift mikrotübülden meydana gelen aksonemi içerir. Aksonem; kuyruğa hareketlilik özelliği kazandırırken, kalın ve koyu yapıdaki dış fibrilleri ise hücreye diklik sağlamaktadır (28). Kuyruğun başa yakın kısmında; aksonemi çevreleyen helikal yapıda sıralanan ve enerji için gerekli olan mitokondriler mevcutken, arka kısımda kuyruğun iskeletini oluşturan fibroz bir kılıfla sarılmış yoğun fibriller bulunmaktadır.

Boyun; proksimal sentriol ve segmentli kolonlardan oluşan bir bağlantı parçasından meydana gelen ve yaklaşık 0,3 µm uzunluğundaki yapıdır.

Orta parça; aksonem, aksonemi çevreleyen fibriller ve bu yapıları saran helikal yapıda sıralanan mitokondrion tabakasından oluşmakta olup, yaklaşık olarak 1 µm çapında ve 7 µm uzunluğundadır. Spermin motilitesi için gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondrial heliks 10-14 defa aksonemi çevreler.

Esas parça; 0,5 μm çapında ve 40 μm uzunluğuyla spermatozoanın en buyk kısmı olup, spermin hareketli olan kısmıdır. Bu parça; aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibril yapı, bunu saran fibröz katman ve en dıştaki plazma membranından meydana gelmektedir. Kuyruğun sonlanmasına 5-7 μm kala fibröz katman ve fibriller yapı sona erer ve tipik bir flagellum yapısı gösteren bu kısım, son parça (end piece) olarak isimlendirilir.



şekil 4. Matür spermin şematik görünümü (29).

4.3.1.2.Genital Boşaltma Kanalları

Tbll rekti (düz tübüller), duktuli efferentesler ve rete testis; testis içi boşaltım kanallarıdır. Testislerden penise kadar uzanan aksesuar kanallar içinde; duktus epididimis, duktus ejaklatorius, duktus deferens ve üretra bulunur.

4.3.1.2.1.Duktus Epididimis

Tek bir kanal halinde görünen duktus epididimis; 8-15 adet efferent duktusun birleşimiyle oluşur. 4 cm görünen fakat açılıp düz hale getirildiğinde; 6

m uzunluğuna erişen epididimisler, testisin üst kutbunda ve arka kenarında kendi üzerine yumaklar yapmaktadır. Spermatozoanın taşınması, depolanması ve maturasyonu gibi fonksiyonlara sahiptir.

4.3.1.2.2.Duktus Deferens

Lümen çapı 0,3-0,5 mm olup, 2-3 mm kalınlığında ve yaklaşık 35 cm uzunluğunda; kalın musküler duvara sahip tübüller bir yapıdadır. Mesane ile rektum arasındadır ve prostat yakınlarında genişleyerek, ampulla denen kısmı oluşturur. Veziküla seminalisten gelen her biri yaklaşık 2 cm uzunlukta olan, ejakülatör kanal çiftleri birleşerek; ejakülatör duktus adını alır ve bu kanal prostata penetre olarak prostatik üretraya açılır. Fonksiyonları emilim, sekresyon ve sperm taşınmasıdır, mukozal hücreleri glikoprotein sentezleme ve salgılama özelliğine sahipken, bu alan ejakülasyon öncesinde spermin biriktirildiği yerdir.

4.3.1.3.Aksesuar Genital Bezler

4.3.1.3.1. Seminal Veziküller

Duktus ejakulatorius ile prostata penetre olup prostat ve mesanenin arka yüzeyinde yer alan ve rektuma komşu olan seminal veziküller; ortalama 10-15 cm uzunlukta, 5 cm boyunda ve 2-2.5 cm eninde cep şeklinde keselerdir. Sekresyonda ve sperm motilitesinde etkin rol oynar. Temel fonksiyonu salgı yapmaktır ve salgısı; yüksek miktarda su, spermatozoidler için enerji kaynağı olan fruktoz, vitamin C ve prostaglandinler bulduran bazik bir sıvıdır. Bu salgının temel işlevi; sperm hareketliliğini direkt uyarmaktır. Spermatozoidler bu salgıyla ve fruktozla karşılaşınca daha da aktifleşirler.

2.3.1.3.2. Prostat

Mesane boynundan başlayarak, arka üretrayı çevreleyen prostat; fibromüsküler kapsül ve tubulo-alveoler özellik sergileyen, glandüler bir yapıdan oluşmuştur. 4x3x2cm boyutlarındadır ve kestane şeklinde bir genital bezdir. Seminal vezikül içeriğinin salgılanmasından önce; androjenik aktivite ile ilgili sekret prostatta salgılanır ve 25 ana kanal ile üretraya dökülür. Bu arada parasempatik uyarım; sekresyonu artırır. Prostatik salgılar; spermin motilitesine yardımcı olur ve vajinal asiditeyi nötralize eder. **Asit fosfataz**, prostatın karakteristik sekresyonudur ve prostat sekreti içinde; prostatik antibakteriyel faktör, çinko, sitrik asit, spermin, fruktoz, lipid, semin, likefikasyonda ve koagülasyonda etkili olan proteolitik enzimler, sodyum, immünglobulinler, klor ve bikarbonat bulunmaktadır. Ejakülat volumünün % 15-30'nu oluşturan ve alkali özellikte olan prostat sekresyonu; sürekli olmakla beraber, kısa aralıklarla üretraya dökülür. Sperm motilitesi ile ilgili değerlendirecek olursak; prostat sekreti sperm volumü ve akışkanlığını kolaylaştırdığından dolayı, fertilite üzerinde de önemli etkilere sahiptir (30).

4.3.1.3.3. Bulbo-üretal Bezler (Cowper Bezleri)

Bulbusa girmiş, her iki tarafta da bulunan bezelye büyüklüğündeki bu yuvarlak bezler; sadece ejakülasyon sırasında üretraya salgı verirler. Bulboüretal bezler; erotik uyarılma ile üretra içerisine berrak, mukus benzeri, yoğun, alkali bir sıvı salgılamaya başlar ve bu sayede idrarın asiditesi etkisizleştirilmiş olur.

4.4.Semen ve Semen Olusturan Sekresyonlar

4.4.1.Semenin Genel Özellikleri

Semen (ejakulat) sıvısı; seminal keseler, epididim, prostat, vas deferens, Cowper bezleri ve üretral bezlerden salgılanan çeşitli moleküllerin bir karışımıdır. Normal semende ana hücre tipi; spermatozoalardır ve bu hücreler ejakülasyona kadar vas deferensin ampullasında, epididimin kaudasında ve vas deferenste bulunurlar. Seminal kese salgıları (% 46-80); semen hacminin % 60 kadarını oluştur ve seminal sıvı yoğun, nötral veya hafif alkali yapıda olup genellikle içeriğindeki flavinden dolayı sarı renktedir. İçeriğindeki flavin maddesi sayesinde semen UV ışığında floresans özelliğe sahiptir (31). Prostat salgısı semen hacminin % 20'sini oluşturur (% 13-33). Süt benzeri bir sıvı olup; sitrik asit, asit fosfataz ve proteolitik enzimler bakımından zengindir. Proteolitik enzimler; koagüle semenin sıvılaşmasını sağlarlar. Prostat sıvısındaki pıhtılaşma enzimi; vezikula seminalis sıvısındaki fibrinojenin, düşük miktarda pıhtılaşmasına sebep olurken bu pıhtılaşma; prostat salgısında bulunan fibrinolizinin etkisiyle 15-20 dakika içerisinde çözülür. Ejakülasyonu izleyen ilk dakikalarda sperm; muhtemelen koagülümün viskozitesi nedeniyle nispeten hareketsiz kalır, fakat bu pıhtının çözülmesinden sonra spermin hareket yeteneği hemen artar. Prostat salgısı; semene süte benzer bir görünüm kazandırırken, vezikula seminalislerden ve mukoz bezlerden gelen sıvılar ise semene mukoid kıvamını sağlar. Geriye kalan sekresyonlar semenin ancak % 10-15 kadar bir kısmını oluşturur. Ayrıca epididim sekresyonunda fertilizasyon basamaklarında önemli rol oynayan proteinler bulunmaktadır (32).

Spermatozoaları çıkardığımızda; semende geriye kalan kısım **seminal plazma** olarak isimlendirilir ve spermatozoa'nın beslenmesi için gerekli olan besin maddelerini içermektedir. Seminal plazma; değişik lipidler, küçük moleküllü organik elementler (askorbik asit, ATP, sitrik asit, fruktoz vb.), azottan zengin küçük moleküller (amonyak, kreatin, histamin, flavin, üre, vb.) ve inorganik elementler (Ca, Cl, Fe, Mg, P, Na, K, SO₂, Zn, vb.) 'in yanı sıra, değişik aminositler ve Ig A, E, G ve M, FSH, LH, antitripsin, glikoprotein, insulin, inhibin, kininojen, prolaktin, steroid bağlayıcı proteinler, relaksin ve kan grubu antijenlerini de ihtiva etmektedir (33).

4.4.2.Semeni Oluşturan Sekresyonlar

Seksüel uyarım sırasında semeni meydana getiren sekresyonların her biri, birbirinden bağımsız bir şekilde üretraya akıtılır.

1-Testis Sekresyonları: Rete testis sıvısı, androjen bağlayan protein ve androjenler yönünden zengin olan testis sekresyonu; semenin çok az bir miktarını oluşturmaya rağmen, spermatozoonları barındırması nedeniyle son derece önemlidir.

2-Epididim Sekresyonları: epididimden semene, spermatozoonun fonksiyonu üzerinde oldukça büyük etkilere sahip olan kimyasal maddeler eklenir ve bu maddelerin en önemlileri inositol, karnitin, lipidler ve fosfolipidlerdir. Yapılan çalışmalarda karnitin düzeyi ile sperm sayısı ve motilitesi arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir ve aynı zamanda semendeki karnitin miktarı; spermlerin fertilizasyon yeteneğini değerlendirmede baz alınan parametrelerden biridir. Yapılan deneylerde; epididim başından alınan spermler, ovumu dölleyebilecek yetenekte değilken, epididim kuyruğundan alınan spermlerin yumurtayı

dölleyebilmesi; spermilerin dölleme yeteneğini epididimde kazandıkları fikrini doğrulamaktadır. Spermatozoa epididimde önemli ölçüde farklılaşmaya uğradığından, epididime ait patolojiler; spermilerin karakter ve fonksiyonlarında büyük değişikliklere neden olmaktadır (34).

3-Seminal Vezikül Sekresyonları: Testosteronun uyardığı seminal vezikül sekresyonları; sperm motilitesi üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahiptir. Bezin fonksiyonu bakteriyel ve benzeri enfeksiyonlar sonucu azalır ve astenozoospermi ile bu azalma arasında güçlü bir ilişki tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucu; bikarbonat, prolaktin veya prostaglandinler gibi maddelerin semene eklenmesi ile motilitenin arttığı belirlenmiştir (35). Bu maddelerden seminal vezikül kaynaklı olan prostaglandinlerin (PG); semende 15 ayrı tipi belirlenmiştir ve bunlar A, B, E ve F olmak üzere dört farklı grupta sınıflandırılmıştır. Prostaglandinler infertil bireylerle kıyaslandığında; fertil kişilerin seminal sıvısında daha yüksek miktarda (toplam 1 mg) bulunmaktadır. Vezikula seminalisden salgılanan vezikülaz; fibrinojene benzer bir maddedir ve semenin yoğunlaşmasını sağlamaktadır.

4-Prostat Sekresyonları: Prostat sekresyonun içerdiği çok sayıda enzim; semenin pıhtılaşması ve likefaksiyonunda rol oynamaktadır. Prostat sekresyonlarındaki spermin; bakteriyostatik bir âmindir ve spermatozoanın fosfat kristallerini meydana getirir (36). Ayrıca prostat sıvısında; yüksek oranda kalsiyum sitrat, asit fosfataz ve çinko bulunmaktadır (37).

5-Bulboüretal ve Üretal Bez Sekresyonları: Bulboüretal bez sekresyonları, üretal bez sekresyonlarıyla benzerlik göstermektedir ve mukoproteinlerden zengin salgılar üretranın ıslanmasını sağlamaktadır. Patolojik koşullarda görülen; eritrosit, makrofaj, lökosit, epitel hücreler, sertoli ve prostatik hücreler semendeki

spermatozoa dışındaki hücresel elemanlardır (38). Semen fizikokimyasal özelliklerine ek olarak seminal sıvı; içerikleri spermatozoonların dölleme yeteneğini ve aktivitesini de belirgin olarak değiştirebilir. Bu nedenle infertil bireylerde semen analiziyle beraber tüm bezlerin sekresyonları da incelenmelidir (39).

4.5. Erkek Kısırlığının Nedenleri

Erkek infertilitesi üç ana gruba ayrılabilir:

4.5.1. Non-Obstrüktif İnfertilite (Yüzde 60)

Testisler tarafından yetersiz sperm üretimi gerçekleşir.

4.5.1.1. Hormonal Bozukluklar

İdiopatik hipogonadotropik hipogonadizme; folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormonun (LH) eksikliği neden olur. Başlıca konjenital tipi erkek doğumların her 10 000'inin birinde görülen ve gonadotropin salgılatıcı hormonda eksikliğe neden olan Kallmann sendromudur. Beyin tümörleri, baş yaralanmaları ve ışın tedavisi de infertiliteye yol açan hormon anormalliklerine neden olabilir. Tiroid bezi bozuklukları gibi, diğer hormonal anormalliklerinde de yüksek prolaktin seviyesi ve düşük testosteron seviyesi sperm üretimini bozar.

Konjenital idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm; seksüel infantilizm, önikoidizm ve bazende anozmiye neden olan; izole gonadotropin eksikliği ile karakterize klinik durumdur. İlave olarak, çoğu hastada; orta hat yüz defektleri, renk körlüğü, işitme problemleri, renal malformasyonlar ve kriptorşidizm bulunur. Hipogonadizmin altında yatan neden GnRH salınımındaki defektir (40). Bazı erkeklerde; gonadotropin alt ünitesinde mutasyon sonucu hipogonadotropik hipogonadizm görülür. Yapılan bir çalışmada FSH beta geni; promoter bölgesinde

meydana gelen tek nükleotid polimorfizmi, serum FSH konsantrasyonu ve reproduktif parametrelerle ilişkili bulunmuştur. Bu erkeklerde daha küçük testis volumü, daha düşük sperm konsantrasyonu ve FSH düzeyi saptanmıştır (41,42).

Gonadotropin sekresyonunda anormalliğe yol açan diğer genetik nedenler; Laurence-Moon-Biedl sendromu, Prader-Willi sendromu, Lowe (Oküloserebral distrofi) sendromu ve Familial Serebellar Ataksi sendromunu içeren multiorgan genetik sendromlardır (43).

Fonksiyonel hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite hiperprolaktinemi; androjen artışı, östrojen artışı ve kortizol artışından kaynaklanabilir. Östrojen artışı; östrojen tedavisinden veya östrojen salgılayan bir testiküler tümörden kaynaklanabilir (44). Androjen artışı; testosteron veya diğer anabolik steroidlerin kullanımına veya konjenital adrenal hiperplazi, testis veya adrenal bezdeki tümöre bağlı, aşırı androjen üretimine bağlı olabilir (45,46).

Obezite; erkeklerde düşük serum gonadotropin, total testosteron, serbest testosteron düzeyleri ve hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkilidir. Obezite, serum SHBG (Sex hormone-binding globulin) düzeyinde azalma ile ilişkili olarak serum total testosteron konsantrasyonunun da azalmaya neden olur. (47). Sperm kalitesi de vücut kitle indeksi ile ters ilişkili olabilir (48).

4.5.1.2. Genetik Nedenler

Yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri, infertil erkeklerin yaklaşık yüzde 5'inde bulunmaktadır ve tamamen sperm yokluğu olan erkeklerde prevalansı artabilir. Genetik anormallikler; Y kromozomu mikrolelesyonları, anöploidi ve kromozomal translokasyonları içermektedir. Sayısal anormalliğin en yaygın örneği, primer hipogonadizmin ve erkek infertilitesinin en sık

nedenlerinden biri olan Klinefelter sendromu (47 XXY); 600 canlı erkek doğumun 1'inde ve non-obstrüktif azospermi olan erkeklerin yüzde 10'unda meydana gelmektedir.

Y kromozomu mikrolelesyonları; azospermi ve ciddi oligosperminin genetik nedenlerindendir (49). İnfertil erkeklerin %20'si kadarında Y kromozomu uzun kolunda mikrolelesyon vardır ve bunların çoğu azospermik faktör (AZF) olarak isimlendirilen Yq11 bölgesindedir. AZF bölgesi 3 bölümden oluşur: AZFa, AZFb ve AZFc. AZFa ve AZFb bölgelerinin delesyonu; ciddi spermatogenezis defekti ve azospermiye neden olur. AZFc bölgesinin delesyonu ise oligospermiden azospermiye değişen fenotipe neden olarak infertiliteye neden olur (50,51). Y kromozomu delesyonları sadece idiopatik oligospermi veya azospermide değil kriptoorşidizm, varikosel, vas deferensin obstrüktif lezyonları gibi testiküler disfonksiyonun belirlenebilir diğer nedenleri olan hastalarda da saptanabilir (52).

Androjen reseptör veya postreseptör anormalilere bağlı konjenital androjen insensitivitesi olan erkekler; nerdeyse her zaman infertildir. Parsiyel androjen insensitivitesi (Reifenstein Sendromu) olan erkeklerde; ambigus eksternal genitalya, hipogonadizm ve infertilite gibi değişik derecelerde klinik durum ortaya çıkabilir (53).

Androjen reseptör geni ekzon 1'de; CAG trinükleotid tekrar sayısı androjen hedef gen transkripsiyonel aktivitesi ile ters ilişkilidir. Normal fertil erkeklerde; kısa CAG tekrarı yüksek sperm üretimi ile ilişkilidir (54).

Alfa redüktaz eksikliğine sahip erkeklerde psödohermafroditizm görülür. Bu hastalarda infertilite; küçük fallus, ciddi hipospadias, kriptorşidizm ve zayıf prostatik sekresyon gibi mekanik problemler bağlı olabilir (55).

Östrojenin alfa reseptöründe inaktivasyona neden olan mutasyonu olan erkeklerde; sperm sayısı normaldir ancak sperm motilitesi düşüktür (56).

Erkek infertilitesinin nadir görülen nedenlerinden biri FSH reseptör gen mutasyonlarıdır. Bu hastalarda düşük sperm sayısı ve serum inhibin B konsantrasyonu ve yüksek serum FSH konsantrasyonu vardır (57).

İnfertilite tanısı konmuş erkeklerde görülen genetik bozukluklar, sperm yapısında defektlere neden olarak ya da spermin taşınmasını engelleyerek infertiliteye yol açmaktadır. Bu hastalarda ya azospermi ya da şiddetli oligospermi mevcuttur. Erkek infertilitesi ile ilişkili olan dört genetik faktör belirlenmiştir:

1. **Y-kromozom mikrolelesyonları;** izole spermatogenez defekti meydana getirir.
2. **Kistik fibrozis gen mutasyonları;** konjenital vaz deferens agenezine (yokluğu) sahiptir.
3. Bazı **kromozom anormallikleri;** testis fonksiyonlarını bozmaktadır.
4. Bazı **genetik sendromlar;** sperm fonksiyonlarını direkt olarak etkilemektedir.

4.5.1.2.1. Sperm Fonsiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar

Primer Silier Diskinezi (PCD), Noonan Sendromu, Miyotonik Distrofi ve Orak Hücre Anemisi'dir (58-60).

4.5.1.3. Varikosel

Varikosel; skrotumda panpiniform pleksus venlerindeki dilatasyon olarak tanımlanır. Varikosel; sol spermatik venlerde daha düşük kan akımına bağlı olarak, sol tarafta sağa göre 10 kat daha sık görülür (61). Normal erkeklerin % 10-15'inde varikosel bulunur ve bu oran infertil erkeklerde daha yüksektir (62). Öne sürülen bir hipoteze göre; bozulmuş venöz drenaj, spermatik kordun ısı mekanizmasının ters akımlı değişiminin bozulmasına yol açar ve skrotal sıcaklığını yükselterek spermatogenezi bozar. Diğer öne sürülen mekanizmalar ise; testis ve hipoksi gonadotoxinsinin drenajının bozulmasını içerir (63).

4.5.1.4. İnmemiş Testisler

Testislerin yüksek karın içi sıcaklıklara maruz kalması, spermatogenezi bozar; bu nedenle inmemiş testisi olan bebeklerde iki yaşına kadar orşidopeksi gerçekleştirmek daha iyidir. Kriptoorşidizm; fetal gelişim sürecinde testislerin skrotuma inmesinde başarısızlık olarak tanımlanır. Bunun sonucunda testis abdomende, inguinal kanalda veya diğer ektopik lokasyonlarda olabilir. Bilateral veya unilateral kriptorşidizm; spermatogenezde bozulma ve testiküler tümör riskinde artış ile ilişkilidir. Kriptoorşidizmde görülen spermatogenez defekti büyük olasılıkla gelişimsel anormalilere bağlıdır (64). Testiküler inme süreci androjen bağımlıdır ve kriptoorşidizm; testosteron sekresyonu veya aktivitesindeki konjenital bozukluklarda daha sık görülür.

4.5.1.5. Gonadotoxinlere Maruz Kalmak

Gonadotoxinler; kimyasallar, uyuşturucu maddeler, tütün, alkol, böcek ilaçları, pestisitler ve ağır metalleri içerir. Birçok ilaç; spermatogenezde bozulma veya leydig hücre disfonksiyonuna neden olarak infertiliteye neden olabilir. Bunlar arasında en önemlisi siklofosfamid ve klorambusil gibi alkilleyici ilaçlardır. Antiandrojenler de testiküler androjen üretimi veya aktivitesini bozarak testiküler disfonksiyona neden olabilir (65).

4.5.1.6. İyatrojenik Nedenler

Bunlar antiandrojenler, steroidler, ışın tedavisi ve kimyasal tedavi ve özellikle hematolojik hastalık için alkilleyici ajanları içerir. İyonize radyasyon spermatogenezi bozar. Doz 0.015 Gy (15rad) gibi düşük olduğunda spermatogenezde geçici bir supresyona neden olurken, doz 6 Gy (600 rad)'ın üzerinde, genellikle geri dönüşümsüz azospermi ve infertiliteye neden olur (66).

4.5.1.7. Orşit

Testislerin iltihaplanmasıdır. Viral orşit, özellikle kabakulak, infertilitenin iyi tanımlanmış nedenlerindendir. Kabakulak orşiti prepubertal erkeklerde nadir görülürken, yetişkin erkeklerin %15-20'sinde görülür. Bu erkeklerin bazılarında; germinal hücre hasarı, iskemi veya enfeksiyona immün cevaba bağlı olarak infertilite görülür (67). Gonore ve klamidy gibi seksüel geçişli hastalıklar da orşite neden olabilir. HIV (insan immün yetmezlik virüsü) ile enfekte erkeklerde normal sperm parametreleri olabildiği gibi, düşük sperm motilitesi ve infertilite de olabilir (68). Orşit aynı zamanda post-gonokokal ve chlamydial enfeksiyonu gibi artan bir ürogenital sistem enfeksiyonunun nedeni olabilir (65).

4.5.1.8. Testis Torsiyonu

Testiküler torsiyon altı saat içinde düzeltilmezse, bu iskemik nekrozun bir sonucu olarak testislerde kalıcı hasar ve küçülmeye yol açar. Ayrıca, bu durumun akabinde diğer sağlıklı testisi etkileyen antisperm antikorların üretimi gerçekleşebilir (65).

4.5.1.9. Testis Travması

Skrotumda gerçekleşen künt travma; intratestiküler hematom veya testisin yırtılmasına yol açabilir; bu antisperm antikorların üretimine neden olur, kan germinal epitel bariyerini geçer ve testiküler dokunun hasarına yol açar (65).

4.5.1.10. Testis Tümörleri

Testis tümörleri; sağlıklı testis dokusunu tahrip ederek ve sıkıştırarak kısırlığa yol açar. Testis kanseri tedavisi, orşiektomi, kimyasal tedavi veya ışıın tedavisi yoluyla olur fakat fertilitiyi bozar. Infertil erkeklerde testiküler kanser görülme oranı genel nüfusun yüzde 0.001-0.01'ine kıyasla yüzde 0,5-1'dir. Genetik faktörler çok etkilidir (65).

4.5.1.11. Otoimmün İnfertilite

Antisperm antikorları; otoimmün infertilitede üretilmektedir. Germ hücreleri normalde sertoli hücreleri tarafından oluşturulan kan-testis bariyeri tarafından bağışıklık sisteminden salınır. Travma, testiküler ameliyat, varikosel ve orşit gibi bu bariyerin bozulmasına neden olan koşullar, antisperm antikorların üretimi ve bağışıklık sisteminde germ hücrelerinin maruziyetine yol açar (65).

4.5.2. Obstrüktif İnfertilite

Normal sperm üretimi mevcuttur, ancak genital sistemde bir tıkanıklık vardır.

4.5.2.1. Vaz Deferens Konjenital Yokluğu

Kistik fibrozis otozomal resesif geçişli konjenital bir hastalıktır ve kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) genindeki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkar (69). CFTR genindeki mutasyon vaz deferens agenezisi ile sonuçlanır. Azoospermik olguların %1,4'ünü oluşturan konjenital vaz deferens agenezili hastaların %85'inde kistik fibrozis (CF) gen mutasyonu tanımlanmıştır (70). Bazı CFTR mutasyonları da konjenital unilateral vas deferens yokluğu ile ilişkilidir (71).

4.5.2.2. Vazektomi

İzole vazal obstrüksiyonunun en sık rastlanan nedeni, fıtık onarımı ve orşidopeksi gibi inguinal kanal veya pelvis bölgesindeki ameliyatlardan sonrası postoperatif etkilerdir. Bakteriyel infeksiyonlarda etkilidir (65).

4.5.2.3. Epididimal Obstrüksiyon

Vazal obstrüksiyon, klamidy ve gonore gibi cinsel yolla bulaşan infeksiyonlardaki gibi ya da obstrüksiyon ardından epididimisin iltihaplanmasına neden olan, mikropların üretradan geriye doğru göç ettiği idrar yolu enfeksiyonları sonrası, postinflamatuar olabilir (65).

4.5.2.4. Ejakülasyon Kanal Obstrüksiyonu

Obstrüksiyon konjenital prostat kistlerden veya taşlardan ya da prostatitten kaynaklanıyor olabilir. Infertiliteye ek olarak, hastalarda ağrılı ejakülasyon, azalmış güç ve ejakülat hacmi, hemospermi, ağrılı işeme, pelvik ağrı ve skrotal ağrı gibi çeşitli belirtiler olabilir (62).

4.5.3. Koital İnfertilite

Normal sperm üretimi ve açık genital sistem olmasının yanı sıra; infertilite intramisyon veya ejakulasyon bozukluğu olan cinsel fonksiyon bozukluğuna göre ikincildir.

4.5.3.1. Ereksiyon Bozukluğu

Şiddetli erektil disfonksiyonu olan hastalar vajinaya girmekte ve sperm boşaltılmasında zorlanırlar (65).

4.5.3.2. Erken Boşalma

Ağır vakalarda ejakulasyon vajina dışında penetrasyon öncesinde meydana gelir (65).

4.5.3.3. Penis Deformiteleri

Peyroni hastalığı veya konjenital penis eğriliği gibi penis eğriliği olan hastalar ve hipospadias veya epispadias gibi üretral meatusun anormal pozisyonu olan hastalar vajinal penetrasyon ve sperm birikiminde problem yaşayabilir (65).

4.5.3.4. Anejakülasyon

Primary anejakülasyon (anorgazmi) psikoseksüel faktörler veya genital organların azalmış duyarlılığı veya boşalma refleksinin yüksek eşiği gibi nörolojik nedenler sonucu ortaya çıkabilir. Sekonder anejakülasyon; retroperitoneal lenf nodu diseksiyonu ve panproctocolectomi gibi sempatik zincirin yaralanmasına neden olabilen, pelvis veya karın ameliyatları ardından oluşabilir. Aynı zamanda diyabetik otonom nöropatide oluşabilir. Antidepresanlar ve alfa-bloker gibi bazı ilaçlar da anejakülasyona yol açabilir (65).

4.5.3.5. Geri Boşalma

Geriye boşalma nedenleri, anejakülasyon yaşayan kişilerle benzerdir. Benign prostat hiperplazisinin ameliyat sonrasında ve alfa-bloker alan erkeklerde sıkça görülür (65).

4.6. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Erkek infertilitesinin araştırılması nispeten daha kolay olup fiziki muayene ve semen analiziyle belirlenir. Erkeklerde infertilite yaşın ilerlemesiyle beraber fekonditenin azalması, çevresel toksinlere maruziyet sonucu kümülatif birikim ve cinsel ilişki sıklığındaki azalma ile ilişkilidir. Hikâye de testiküler infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, travmalar, kullanılan ilaçlar ve alışkanlıklar sorgulanır ve fiziki muayenede; genital muayenenin yanı sıra tiroid bezi ve jinekomasti şüphesiyle meme muayenesi de yapılmalıdır. Semen analizi ise ejakulatın değerlendirilmesidir ki fertilite potansiyeline tek bir sperm analizi ile karar verilmemelidir, çünkü spermatogenez 70 günlük bir süreçte meydana gelmektedir. Bu süre epididimisteki sperm olgunlaşması ve taşınması için gereken 12-21 günlük süreyi de içermektedir. Ayrıca yakın geçmişte oluşan ateşli bir hastalık, semen kalitesinde 3 ay sürebilecek bozukluğa neden olabilir, bu nedenle 6-8 haftalık süre içerisinde iki ya da üç semen analizi ile değerlendirme yapılmalıdır. Klasik semen analizi için incelenecek ejakulat 3 ila 8 günlük cinsel perhiz ardından yapılmalıdır (72,73).

Ejakulatın makroskopik muayenesinde görüntüsü, likefaksiyon zamanı, miktarı, viskozitesi ve pH'sı değerlendirilmektedir ve semen analizinin en önemli kısmını mikroskopik inceleme oluşturmaktadır. Bu incelemede kullanılacak teknik ve aletler doğru seçilmelidir. Mikroskopik incelemede sperm sayısı,

motilitesi, yuvarlak hücre sayısı, varsa aglütinasyonun derecelendirilmesi, morfolojisi ve yuvarlak hücrelerin gruplanması incelenir.

4.6.1. Sperm Analizi

Sayı: Kullanılan alete bağlı olarak tek karedeki ortalama sperm sayısı baz alınarak sayım x milyon/ml olarak ifade edilir.

Hareketlilik: Hareketlilik Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün belirlediği 4 grupta incelenir:

- a) Hızlı çizgisel progresif hareket
- b) Yavaş çizgisel ya da çizgisel olmayan hareket
- c) Progresif olmayan hareketlilik
- d) Hareketsiz

Morfoloji: Spermin fertilite kapasitesinin morfolojik incelenmesi ile etkin bir şekilde değerlendirilmesi 1951 yıllarına dayanmaktadır. Kruger ve arkadaşları tarafından 'Strict' kriterler ile morfoloji değerlendirilmesinin tanımlanmasıyla, bu parametre giderek artan bir önem kazanmıştır.

Likefaksiyon: Genellikle ilk 15 dakikada görülmesine karşın, normal semen örneğinin likefaksiyonu oda sıcaklığında 60 dakika kadar sürebilir.

Görünüm: Semen örneği 1 saat içinde görünüm bakımından değerlendirilmelidir ve normalde gri-opalesan görünümündedir.

Hacim: Ortalama 2-6 ml kadar olup, tabanı konik derecelendirilmiş silindir ile ölçülmelidir.

Viskozite: Sperm örneğinin akışkanlığı olarak da ifade edilir ve likefaksiyon sonrası bakılmaktadır. Normal bir örnek pipetten küçük ayrı damlalar halinde düşerken, anormal viskoziteye sahip semen örneğinde bu uzunluk 2

cm'den daha fazladır. Örneğin içine pastör pipeti daldırarak çekildiğinde meydana gelen iplikçiğin uzunluğunun, 2cm'i geçmemesi gerekir.

pH: Ejakulasyonun ardından 1 saat içinde ölçülmelidir ve pH metre kullanılır. Ejakulatın normal pH'ı 7,2' nin üzerindedir.

Sperm konsantrasyonu: 20×10^6 spermatozoa/ ml ve daha fazlasıdır.

Spermatozoa dışında diğer hücresel elemanlar: Bu hücrelerin tamamı yuvarlak hücreler olarak isimlendirilir. Bunlar genitoüriner sistemin epitel hücreleri, prostat hücreleri, spermatojenik hücreler ve lökositlerdir. Normal bir ejakulatta yuvarlak hücre sayısı 5×10^6 /ml ve lökosit sayısı 1×10^6 /ml' yi geçmemelidir.

Vitalite: Sperm vitalitesi, boya eksklüzyonu ya da hipoozmotik şişme ile canlı olarak tanımlanan spermatozoa oranı ile yansıtılır. İmmotil spermatozoa sayısı %50'yi geçerse eğer bu saptama yapılmalıdır. Normalde spermlerin %75 ve daha fazlası canlı olmalıdır, bunlar boyayı almayan gruptur.

Bu testlerin yanında immünolojik testlerden anti-sperm antikorlarının (ASA) değerlendirilmesi, sperm servikal mukus etkileşimi, bioassaylerde kreatin kinaz değerlendirmesi, akrozomal enzim aktivitesi tayini, fonksiyon testlerinden; hipoozmotik şişme testi, sperm penetrasyon testi, hemizona testi (HZT) de diğer sperm değerlendirme yöntemleridir (73).

Tablo 1. Standart semen parametrelerinin normal değerleri (73).

Klasik semen analizi	
Volüm	> 2 ml
pH	7.2 – 8.0
Sperm sayısı	>20 x 10 ⁶ spermatozoa / ml
Total sperm sayısı	>40 x 10 ⁶ spermatozoa / ml
Hareketlilik	>%50
Progresif hareket	>%50
Progresif hareketli sperm sayısı (PHSS)	>3 x 10 ⁶ spermatozoa / ml
Morfoloji (WHO)	>%50 normal
Vitalite	>%75
Beyaz küre	<1 x 10 ⁶ ml
İmmünobead test	<%20 partikülle kaplı sperm
MAR testi	<%10 partikülle kaplı sperm
Bio-assayler	
Hemizona indeks	>%35
HOS test	>%60
Sperm penetrasyon assay	>%10 penetrasyon
Diğer testler	
A-glukozidaz (nötral)	>20 M _μ
Çinko (total)	>2.4 mmol
Sitrik asit (total)	>52 mmol
Asit fosfotaz (total)	>200 U
Fruktoz (total)	>13 mmol

İnfertil erkeklerde oligozoospermia, azoospermia, teratozoospermia, asthenozoospermia veya bunların kombinasyonu mevcuttur. Normal koşullarda fertilizasyonun oluşması için spermatozoa motilitesi en önemli parametrelerden biridir (74).

Semen Sınıflaması Terminolojisi

Tablo 2. Semen Parametreleri Referans Değerleri (75).

Normozoospermia	Referans değerleriyle tanımlanmış normal ejakulat
Oligozoospermia	Referans değerinden daha az sperm konsantrasyonu
Astenozoospermia	Referans değerinden daha az sperm motilitesi
Teratozoospermia	Referans değerinden daha az sperm normal morfolojisi
Oligoastenoteratozoospermia	Her üç değişkenin bozukluğunu gösterir
Kriptoospermia	Ejakulatın bazal değerlendirmesinde hiç sperm yokken, santrifüjasyon sonrası birkaç sperm elde edilmesi
Azoospermia	Santrifüjasyon sonrası hiç sperm bulunmaması
Aspermia	Seminal plazma volümü=0 ml
Polizoospermia	Yüksek sperm konsantrasyonu (>250 milyon/ml)

4.6. İyon Kanalları

İyon kanalları; membrana ait çift lipid tabakasını kesen ve bu katman boyunca iyonların geçişini kolaylaştıran makromoleküler protein kompleksleridir.

İyon kanalları, membranda 3-5Å çapta delikler oluşturmak suretiyle iyonların hareketini mümkün kılar ve bu kanallar boyunca oluşan iyon akımı, membran potansiyelinin kaynağını oluşturur ki; bu hücrenin elektriksel uyarılabilirliği için olmazsa olmazdır (76).

İyon kanalları hemen hemen her dokuda eksprese olmaktadır ve sinyal iletiminde önemli anahtar moleküllerdir. Ayrıca dokularda proliferasyon, transport, volum kontrolü, enzim aktivitesi, sekresyon, invazyon, gen ekspresyonu, uyarılma ve kasılma ve hücre içi iletişim gibi hücresel fonksiyonun belirlenmesinde önemli rollere sahiptir (77).

İyon kanal ailesini dört ana gruba ayırmak mümkündür;

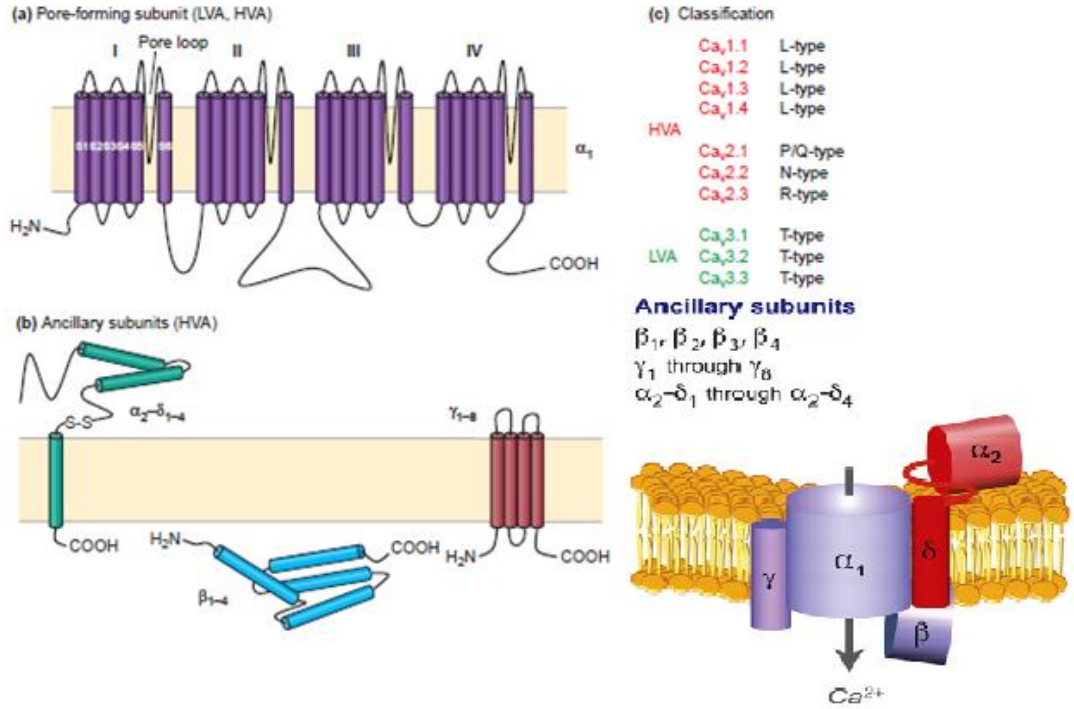
1. **Ligand kapılı iyon kanalları;** belli bir kimyasal molekül varlığında açılan iyon kanallardır.
2. **Voltaj kapılı iyon kanalları;** iyon kanalının açılıp kapanması membran potansiyeline bağlı olarak gerçekleşir.
3. **Mekanik uyarıyla çalışan iyon kanalları;** iyon kanalları mekanik olarak gerilip/büzüldüğünde açılır.
4. **Enzime bağlı iyon kanalları;** kanalın kapanması belli bir enzim aktivitesi sonucunda; kanal proteinin fosforile veya defosforile olması ile kontrol edilir.

Hücre membranı; periferik ve integral olmak üzere iki tip fonksiyonel protein içermektedir. İntegral membran protein kanalları; taşıyıcıları, reseptörleri, ekstrasellüler ve intrasellüler ortamlar arasında bilgi ve malzeme akışına aracılık eden, enzimlerden oluşmaktadır. Bu taşıyıcılar iyon kanalları gibi, biyolojik hücre membranlarında transmembran gözenekleri oluşturan

proteinlerdir. İyon kanal ailesi, sinyal iletimiyle ilişkili protein aileleri içinde G-proteinleri ve protein kinazlardan sonra üçüncü en büyük aileyi oluştururlar. İyon kanalları çok farklı uyarılara cevap olarak açılıp kapanırlar.

4.6.1. Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları

Kalsiyum; kas kasılması için gerekli olan nörotransmitter salınımında ve bir dizi fizyolojik fonksiyonları düzenleyen önemli bir sinyal molekülüdür. Voltaj kapılı kalsiyum kanalı (VKKK), özellikle uyarılabilen hücrelerde hücre içi Ca^{+2} girişi için önemli bir görev üstlenmiştir. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları; impuls oluşumu, duyuşal işlemler, kas kasılması, hormonların ve nörotransmitterlerin salgılanması, hücre farklılaşması ve gen ekspresyonu gibi çeşitli fizyolojik olaylarda anahtar rol oynamaktadır (78,79). Ayrıca kalsiyum iyonları ikincil haberci olduklarından dolayı, membran potansiyelini etkileyebilecek başka hücre içi kontrol mekanizmalarını da kontrol etme özelliğine sahiptirler. Kalsiyum kanalları çeşitlilik gösterir. VKKK'nın moleküler olarak on üyesi vardır ama kabaca iki gruba ayrılır; yüksek voltaj ile aktive olan VKKK ve düşük voltaj ile aktive olan VKKK. Düşük voltaj ile aktive VKKK üç α -üniteden oluşan T-tipi kanallardır (CACNA1G, CACNA1H ve CACNA1I). Diğer yedi VKKK üyesi ise yüksek voltaj ile aktive olan kanallardır. Bunlar L-tipi ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ ve $Ca_v1.4$), P/Q-tipi ($Ca_v2.1$), N-tipi ($Ca_v2.2$), ve R-tipi (CACNA1E) kanallardır. Yüksek voltaj ile aktive VKKK'nın; hetero-oligomerik kompleksleri vardır. Kanal açıklığını oluşturan α_1 -alt biriminin yanı sıra, yardımcı β , α_2 - δ , ve γ alt birimlerine de fonksiyonel bir kanal oluşturmak için ihtiyaç vardır (79,80).



Şekil 5. Voltaj kapılı kalsiyum kanallarının alt türleri ve alt birim kompleksi (81).

4.6.1.1. CACNA1B (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, N tipi, alfa-1B alt birimi)

CACNA1B (Ca_v2.2) iyon kanalı; kalsiyuma geçirgen bir kanaldır. İnsanlarda 9q34 lokalizedir. Bu gen tarafından kodlanan protein; nöronlardan nörotransmitter salımını kontrol eden, bir N-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalının por-oluşturucu alt birimidir. Kodlanan protein, yüksek voltajla etkinleşen bir kanal oluşturacak şekilde; alfa-2, beta, ve delta alt birimlerinin bir kompleks formudur. Bu kanal, omega-konotoksin-GVIA ve omega-agatoxin-IIIA duyarlıdır fakat dihidropiridinler için duyarsızdır. Bu gen için farklı izoform kodlayan iki transkript varyantı tespit edilmiştir (82,83).

4.6.1.2. CACNA1C (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, L tipi, alfa-1C alt-birimi)

CACNA1C ($Ca_v1.2$), yüksek voltaj ile aktive olan bir kalsiyum kanalıdır. İnsanlarda 12p13.3 lokalizedir. Bu gen, gerilime-bağılı kalsiyum kanalı alfa-1C alt birimini kodlar (84). Kalsiyum kanalları; membran polarizasyonu sırasında hücre içine kalsiyum iyonlarının akışını sağlar. Alfa-1 alt birimi 24 transmembran segmentten meydana gelir ve iyonların hücre içine geçtikleri gözenekleri oluşturur. Kalsiyum kanalı; 1: 1: 1:1 oranında alfa-1, alfa-2 / delta, beta, ve gama alt birimden oluşan bir kompleksi içermektedir. Genin kalpte ryanodin reseptörleri aracılığıyla, endoplazmik retikulum kaynaklarından kalsiyum salınmasına neden olan L-tipi akım aracılı ifadesi tanımlanmıştır. Bu gen tarafından kodlanan protein dihidropiridin tarafından inhibe olmaktadır (85,86). Beyin arterlerinde, mitokondride yüksek kalsiyum düzeyi Nükleer Faktör kappa B NF-KB aktivitesini yükseltir ve CACNA1C transkripsiyonunu ve fonksiyonel CACNA1C ekspresyonunu artırır (87).

4.6.1.3.CACNA1E (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, R tipi, alfa-1E alt birimi)

CACNA1E ($Ca_v2.3$); yüksek voltajla aktive olan kalsiyum iyon kanalıdır. İnsanlarda 1q25.3 yer alan bu gen; R-tipi kalsiyum kanallarının alfa-1E alt birimini kodlar. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları, 1: 1: 1: 1 oranında alfa-1, alfa-2, beta ve delta alt biriminden meydana gelen multisubunit kompleksleridir. Bu kanallar, uyarılabilir hücrelerde kalsiyum iyonlarının girişine aracılık eder ve aynı zamanda kas kasılması, hormon ya da nörotransmitter salınımı, gen ekspresyonu, hücre hareketliliği, hücre bölünmesi ve hücre ölümünde dâhil olmak üzere çok

çeşitli kalsiyum bağlantılı süreçlere katılmaktadır. Bu gen için farklı izoform kodlayan alternatif transkript varyantlar tespit edilmiştir (88).

4.6.1.4. CACNA1G (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, T tipi, alfa-1G alt birimi)

CACNA1G (Ca_v3.1) düşük voltajla aktive olan bir kalsiyum kanalıdır. İnsanlarda 17q22 yer almaktadır. T tipi alfa 1G alt birimine sahip, voltaj bağımlı kalsiyum kanalı; insanlarda CACNA1G geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu gen için farklı izoform kodlayan pek çok alternatif transkript varyantları tespit edilmiştir (89).

T türü kanallar hem hızlı inaktivasyon nedeniyle geçici, hemde küçük iletkenlik nedeniyle küçük akımları oluşturur. T türü kanalların pacemaker aktivitesinin, düşük eşikli kalsiyumun ani artışları, nöronal salınımlar ve rezonansa dâhil olduğu düşünülmektedir.

Jagannathan ve ark. (2002) tam hücre patch-clamp çalışmalarına göre izole yuvarlak spermatidlerde T-tipi voltaj kaynaklı Ca⁺² kanal akımı saptamışlardır. Akımlar CACNA1H ya CACNA1G kanalları tarafından üretilenle uyumlu olarak değerlendirilmiştir (90).

4.6.1.5. CACNA1H (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, T tipi, alfa-1H alt ünitesi)

CACNA1H (Ca_v3.2) düşük voltajla aktive olan bir kalsiyum kanalıdır. İnsanlarda 16. kromozomda (16p13.3) yer almaktadır. CACNA1H gibi Ca (2+) kanallarının alfa-1 alt birimleri 4 homolog tekrar domaini içermektedir, bunların her biri 6 transmembran segmentine, yüksek oranda korunmuş bir gözenek loop ve ayırt edici bir voltaj sensörüne sahiptir. Jagannathan ve arkadaşları. (2002)

CACNA1H geninin, en az 27 ekson ihtiva ettiğini tespit etmiştir (90). Yine aynı çalışmada testiste birden fazla izoformu tespit edilmiştir. Ayrıca hem germ hücrelerinde, hem de diğer testis hücrelerinde transkriptlerinin varlığı insitu hibridizasyon yöntemiyle doğrulanmıştır (90).

4.6.1.6. CACNA1I (kalsiyum kanalı, voltaj-bağımlı, T tipi, alfa-1I alt birimi)

CACNA1I ($Ca_v3.3$), düşük voltajla aktive olan T tipi voltaja bağımlı bir kalsiyum kanalıdır. İnsanlarda 22. kromozomda (22q13.1) lokalizedir. 2016 aminoasitten oluşan protein; her biri 6 membran geçişli segmentten oluşan 4 domain, bir gözenek boşluğu ve sitoplazmik ve ekstrasellüler loop bağlantıları içerir. N ve C uçları sitoplazmiktir. CACNA1I'nın membrana-yayılan segmentleri CACNA1G ve CACNA1H'in membrana-yayılan segmentleri ile % 84 özdeşir (91). Yapılan çalışmalarda beyin, adrenal bez ve tiroit bezinde ekspresyonu saptanmıştır (92).

Kapasitasyon sırasında gelişen en önemli biyokimyasal olay Ca^{+2} salınımıdır. Birçok önemli kanıt, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu indüksiyonu için Ca^{+2} gerekliliğini desteklemektedir (93). İnsan sperm fonksiyonlarından; kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve zona pellusidaya in-vitro olarak bağlanma, bölgesel olarak Ca^{+2} gerektirmektedir. Hücre dışındaki Ca^{+2} , spermelerde tirozin fosforilasyonu üzerinde etkilidir. İnsanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda; hücre dışı Ca^{+2} miktarındaki artışın tirozin fosforilasyonunu arttırdığı, bazı çalışmalarda da sperm kapasitasyonu sırasında tirozin fosforilasyonunu negatif etkilediği görülmüştür (94). Hücre içi ATP sentezlenmesindeki azalmanın Ca^{+2} 'a bağlı tirozin fosforilasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (95). Birçok memeli türünde sperm kapasitasyonu sırasında hücre içi

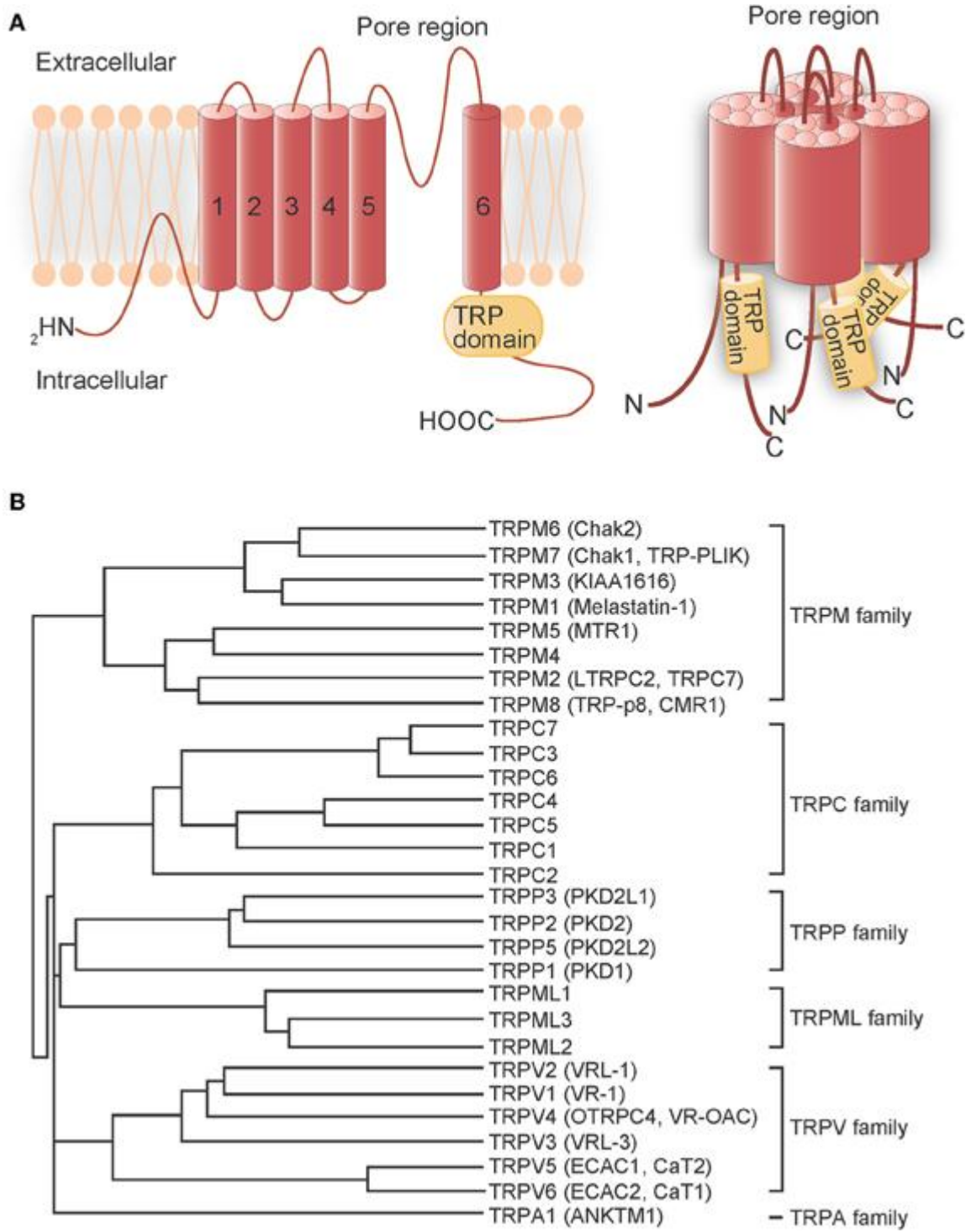
Ca²⁺ konsantrasyonu artar (96). Memelilerde, spermde voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonunun zona pelucida tarafından indüklenen akrozomal ekzositoz için gerekli olduğu belirlenmiştir (97).

Tablo 3. VGCC alt tiplerinin isimlendirme sistemi, doku lokalizasyonu ve farmakolojik ajanları (98).

Alt tipi	Kalsiyum akımı	α subunit	Ekspresyon Pattern	Farmakolojik inhibitörler
Cav1.1	L-tipi	$\alpha 1S$	İskelet kası	Dihidropiridinler (DHPs)
Cav1.2	L- tipi	$\alpha 1C$	Kalp, düz kas, beyin, hipofiz, böbrek üstü bezi	DHPs
Cav1.3	L- tipi	$\alpha 1D$	Beyin, pankreas, böbrek, yumurtalık, koklea	DHPs
Cav1.4	L- tipi	$\alpha 1F$	Retina	DHPs
Cav2.1	P/Q- tipi	$\alpha 1A$	Merkezi ve periferel sinir sistemi	ω -agatoksin-IVA/IIIA, ω -grammotoksin SIVA, ω -conotoksin MVIIC
Cav2.2	N- tipi	$\alpha 1B$	Merkezi ve periferel sinir sistemi	ω -conotoksin MVIIC/GVIA/CVID, ω -grammotoksin SIVA, farnesol, peptidil aminler
CACNA1E	R- tipi	$\alpha 1E$	Beyin, koklea, hipofiz, retina, kalp	Tarantula toksininden türetilmiş peptit SNX-482
CACNA1G	T- tipi	$\alpha 1G$	Merkezi ve periferel sinir sistemi	Kurtoksin, etosuksimid, nikel
CACNA1H	T- tipi	$\alpha 1H$	Beyin, kalp, böbrek, karaciğer	Kurtoksin, etosuksimid, nikel
CACNA1I	T- tipi	$\alpha 1I$	Beyin	Kurtoksin, nikel

4.6.2. TRP (Transient Receptor Potential) Kanalları

TRP “Transient Receptor Potential” geninin; ilk defa *Drosophila melanogaster* (meyve sineği) fotoreseptörlerinde ışıqla aktive olan Ca²⁺ kanalının önemli bir bileşeni olduğunun keşfedilmesiyle birlikte, günümüze kadar TRP iyon kanalı süper ailesinin memelilerde yaklaşık 30 kadar üyesi belirlenmiştir. Amino asid benzerliğine göre TRP kanalları 7 alt aileye ayrılmıştır: TRPC (Canonical), TRPM (Melastatin), TRPV (Vanilloid), TRPA (Ankyrin), TRPP (Polycystin) ve TRPML (Mucolipin), TRPN (NO mechano potential).



Şekil 6. Memeli TRP kanallarının transmembran filogenetik ve topoloji ağacı (99).

TRP kanallarının; tat, sıcaklık ve koku algılama ile ilgili duyuşal nöronlarda ince ayar işlevine katılmaları ile birlikte vasküler bariyer, oksidatif stres aktivasyonu, vazokonstriksiyon /vazodilatasyon, vasküler proliferasyon, vasküler yeniden modelleme “vascular remodelling” ve anjiyogenez gibi birçok süreçte işlevsel oldukları bilinmektedir. TRP kanalları fizyolojik önemlerinin yanında; kanser (akciğer, prostat, meme kanseri gibi), nörodejeneratif (Alzheimer, epilepsi) ve kardiyovasküler hastalıklar (pulmoner hipertansiyon, kardiyak hipertrofi) gibi birçok patolojik durumla da ilişkilendirilmiştir (100-102).

TRP ve siklik nükleotid-kapılı (CNG) kanallarının ekspresyonu; hem spermatojenik hücreler hem de olgun sperm hücrelerinde tespit edilmiştir (103).

Spermde heterojen bir şekilde dağılmıştır ki özellikle spermin farklı bölgelerinde bulunmasından dolayı farklı fonksiyonlara katılacağı düşünülmektedir. Sperm, yumurtayı ararken; ortam bileşimi, viskozite ve sıcaklık gibi kompleks değişikliklerle karşılaşır. TRP ailesinin üyeleri; fertilizasyon için gerekli sinyal çeşitleri ile mücadele edebilmek için spermde mevcut olabilir (104). TRPC kanalları; sperm aktivasyonunda fonksiyonel olarak önemlidir (105). TRPC1, 2, (Sadece farede) 3, 4 ve 6 ve TRPP2 memeli spermde eksprese olmaktadır. TRPC5 ve TRPC1 sperm başında; akromozal bölgede lokalize olup Ca^{+2} sinyal iletiminde görevlidirler (100).

4.6.2.1. TRPC1 (Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı, C altfamilya, 1. üyesi)

TRPC1 katyon kanalı geçici reseptör potansiyel (TRP) süper ailesine aittir ve Geçici Reseptör Potansiyel Kanal 1 (TRPC1) insanlarda 3. kromozomda (3q23) yer alan TRPC1 geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen tarafından kodlanan

protein; kalsiyum ve diğer katyonları geçiren, seçici olmayan kanalı oluşturan bir membran proteinidir. Kodlanan proteinin, hem reseptör tirozin kinaz aktiveli fosfatidilinositol ikinci haberci sistemi tarafından hemde hücre içi kalsiyum depolarının düzeyinde azalma ile indüklediği bilinmektedir. Bu gen için farklı izoform kodlayan iki transkript varyant tespit edilmiştir (106).

TRPC1 insan ve hayvan hücre tiplerinin pek çoğunda, plazma membranında yer alan bir iyon kanalıdır. Yapılan çalışmalar insan fetus ve erişkin beyinde, yetişkin kalp, testis ve overde yüksek miktarda ve fetal karaciğer ve böbrekte daha düşük seviyelerde genin transkriptinin bulunduğunu göstermektedir (107).

4.6.2.2. TRPC3 (Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı, C altfamilya, 3. üyesi)

Geçici reseptör potansiyeli katyon kanalı (TRPC) C altfamilya üyesidir. İnsanlarda 4. kromozomda (4q27) yer alan TRPC3 geni tarafından kodlanmaktadır. TRPC3 geni; metabotropik glutamat reseptör bağımlı sinaptik iletim de dâhil olmak üzere hücre içi sinyal yolları ile bağlantılı, kalsiyum ve diğer katyonları geçiren non selektif bir katyon kanalını kodlar. Bu gen için farklı izoform kodlayan iki transkript varyant tespit edilmiştir (108).

4.6.2.3. TRPC4 (Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı, C altfamilya, 4. üyesi)

Geçici Reseptör Potansiyel Kanal 4 (TRPC4) geni, geçici reseptör potansiyel katyon kanallarının kanonik alt ailesinin bir üyesini kodlar. İnsanlarda 13. kromozomda (13q13.3) yer almaktadır. Kodlanan protein, Gq-bağılı reseptörler ve tirozin kinazlar tarafından aktive olan ve endotel geçirgenliği, damar genişlemesi,

nörotransmitterlerin serbest bırakılması ve hücre çoğalması da dâhil olmak üzere pek çok süreçte rol oynayan, seçici olmayan bir kalsiyum geçirgen iyon kanalını oluşturur. TRPC4; 6 transmembran bölge, bir por bölgesi, bir kaveolin-bağlama alanı ve C terminalinde bir PDZ domaini bağlanma bölgesi içerir (109).

Schaefer ve ark. (2002) insan testisinin total RNA'sında TRPC4'ün bir splice varyantını belirlemişlerdir. TRPC4-alfa ve TRPC4-beta varyantları mevcuttur (110).

4.6.2.4. TRPC6 (Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı, C altfamilya, 6. üyesi)

TRPC6; Geçici Reseptör Potansiyeli Katyon Kanalı (TRPC) C altfamilyasının 6. üyesidir. İnsanlarda 11. (11q22.1) kromozomda yer alan, aynı adı taşıyan gen tarafından kodlanan bir proteindir. Bu gen tarafından kodlanan protein, hücre zarında bir reseptör-bağımlı kalsiyum kanalını oluşturur. Kanal diaçilgliserol tarafından aktive edilmekte ve kanalın fosfatidil inositol ikinci mesajcı sisteminin kontrolü altında olduğu düşünülmektedir. Bu kanalın aktivasyonu protein kinaz C'den bağımsız olarak meydana gelir ve düşük hücre içi kalsiyum seviyesi ile tetiklenmez (111).

4.6.2.5. TRPV6 (Geçici Reseptör Potansiyeli Katyon Kanalı, V altfamilya, 6. üyesi)

TRPV6; Geçici Reseptör Potansiyeli Katyon Kanalı (TRPC) Vanilloid altfamilyasının 6. üyesidir. İnsanlarda kromozom 7 (7q34)' de bulunan 15 ekzondan oluşan gen tarafından kodlanan bir proteindir. Bu gen, kalsiyum kanalı olarak işlev gören çok geçişli zar proteinleri ailesinin bir üyesini kodlar. Kodlanan protein, kanalın montajı ve düzenlenmesi için gerekli olan N-terminali ankirin

tekrarı içerir. Bu protein için translasyonun başlaması; metiyonin olarak kodlanan AUG olmayan başlangıç kodonunda meydana gelir.

TRPV6; özellikle bağırsakta kalsiyum absorpsiyonunun ilk aşamasında rol alan bir membran kalsiyum kanalıdır. Pek çok TRP kanalının aksine, TRPV6 Ca^{+2} iyonları için seçici özelliktedir, özellikle böbrekte eksprese olup renal Ca^{+2} geri emiliminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (112). TRPV6 ekspresyonu insan da dâhil olmak üzere pek çok türde; barsakta tespit edilmiştir. TRPV6 kalsiyum taşıyıcısı, aynı zamanda insan plasenta, pankreas, testis ve bazı türlerde böbrekte bulunmaktadır.

Epididim içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunun yüksekliği, sperm hücre zarındaki kalsiyum kanallarını (TRPV6 kanalı) deaktif hale getirir. TRPV6 kanalının, fazla kalsiyumdan dolayı bozulan açılıp-kapanma düzeni, hücre içerisine gereğinden fazla kalsiyum girmesine ve böylece spermin fonksiyonunun bozulmasına sebep olur. Farelerle yapılan deneylerde, kalsiyum miktarının normal seviyeye düşürülmesi durumunda, TRPV6 kanallarının tekrar düzenli çalışmaya başladığı ve buna bağlı olarak da hücre içerisine kontrollü kalsiyum iyonu alındığı görülmüştür (113).

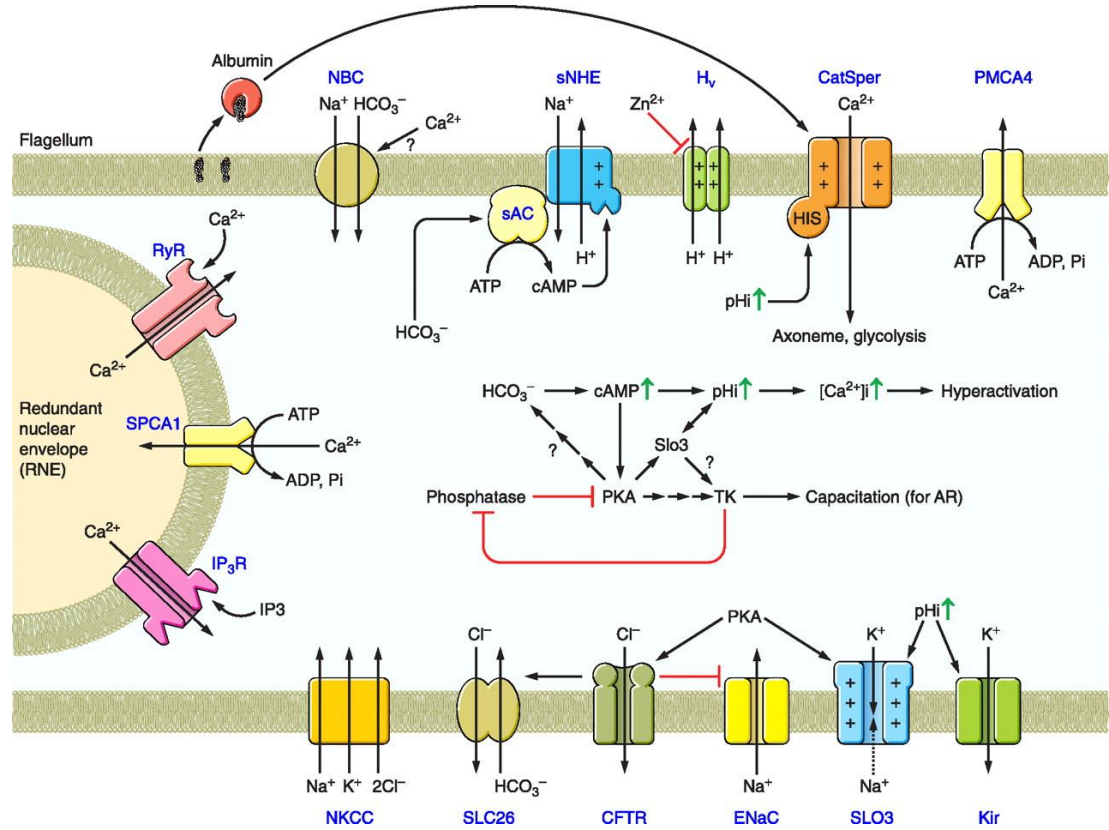
4.6.2.6. IP₃R (İnositol 1,4,5-Trifosfat Reseptör, Tip 3)

Bu gen, hücre içi kalsiyumun serbestlenmesine aracılık eden ikinci bir haberci olan; inositol 1,4,5-trifosfat için bir reseptör kodlar. Reseptör; C-terminalinde bir kalsiyum kanalı ve N-terminalinde ligand-bağlayıcı bölge içerir. İnsanlarda 6.kromozomda (6p21) yer alan ITPR3 geni tarafından kodlanır (114).

IP₃R; organizmalar arasında oldukça çeşitlidir ve hücre bölünmesi, hücre proliferasyonu, apoptoz, döllenme, gelişim, davranış, öğrenme ve bellek gibi

hücresel ve fizyolojik süreçlerin kontrolü için gereklidir. (115). Inositol trifosfat reseptör hücre içi depolama bölgelerinden Ca^{2+} 'un serbest bırakılmasına yol açan dominant bir ikincil haberciyi temsil eder.

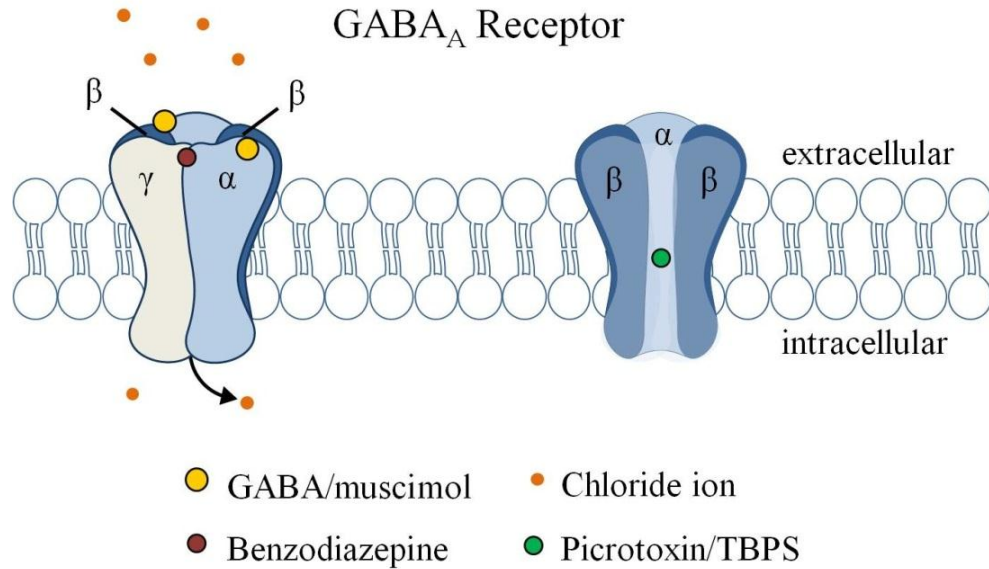
Farelerde yapılan nakavt çalışmalarda; tip 2 ve tip 3 inositol 1,4,5-trifosfat reseptörlerinin, enerji metabolizması ve büyümenin altındaki ekzokrin salgısında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (116). Genin birçok dokuda dağılımı vardır, ancak özellikle beyincikte bol miktarda bulunur. IP3R çoğunlukla endoplazmik retikuluma bütünleşmiş hücrelerde bulunur (117). Ayrıca gen sperm kapasitasyonunda etkilidir (118).



Şekil 7. Memeli sperm hiper aktivasyonu ve kapasitasyonu sırasında görev alan iyon akımları (119).

4.6.3. GABRA1 (Gama-Aminobutirik Asit (GABA) Reseptör A, alfa 1)

Bu gen, Gama-Aminobutirik Asit (GABA) Reseptörünü kodlar. Gamma-aminobütirik asit reseptör alt-birimi; alfa-1, insanda kromozom 5 (5q34)'te lokalize olan GABRA1 geni tarafından kodlanan bir proteindir (120). GABA ligand-kapılı klorür kanalı olan, GABA-A reseptörlerine etki eden, memeli beynindeki temel inhibe edici bir nörotransmitördür. Bu kanalların klorür iletimi GABA-A reseptörüne bağlanan benzodiazepin gibi ajanlar tarafından modüle edilebilir. GABA-A reseptörleri alfa, beta, gama, delta ve rho gibi çeşitli subünit sınıflarından proteinlerin oluşturduğu, pentamerlerdir. Bu genin aynı proteini kodlayan birden fazla transkript varyantı tespit edilmiştir. GABA-A reseptörünün en az 16 farklı alt birimi tanımlanmıştır (121).



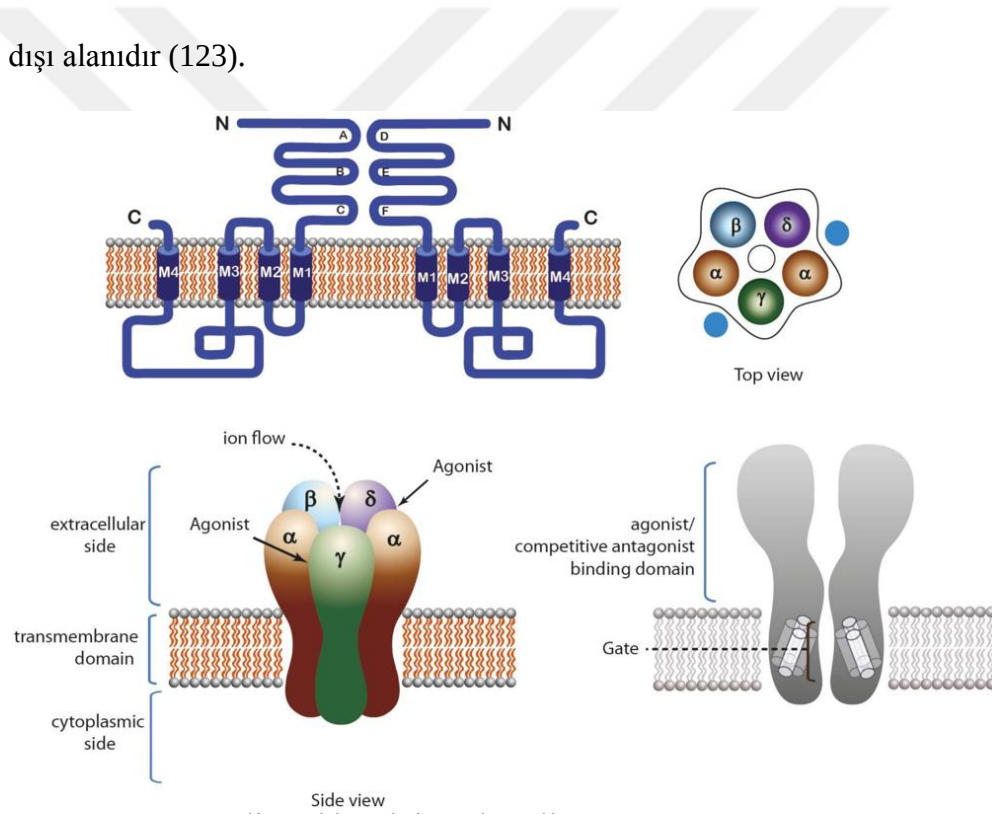
Şekil 8. GABAA reseptörü (98).

Progesteron (4-Pregnen-3-20-dion) in vitro olarak insan sperm akrozom reaksiyonunu (AR) başlatır. GABAA receptor/Cl⁻ channel complexes (GBRCs),

progestinlerle etkileşimi sonucu kısmen de olsa, sperm üstünde etkiye neden olur ve bu etkileşim sonucu oluşan Cl-akımı AR'nin başlamasıyla sonuçlanır (122).

4.6.4. Nikotinik Asetilkolin Reseptörü(nAChR($\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9$))

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR'ler); sinapslarda hızlı sinyal iletimine aracılık eden ligand-kapılı iyon kanallarının bir süper ailesinin üyeleridir. Her bir alt ünitesi için önerilen yapı; üç korunmuş transmembran bölge, değişken bir sitoplazmik loop, dördüncü korunmuş bir transmembran alanı ve kısa bir C-terminal hücre dışı bölgesi ardından, korunmuş bir N-terminal hücre dışı alanıdır (123).



Şekil 9. Pentamer ligand kapılı iyon kanallarının yapısı (124)

Memeli fertilizasyonunda bahsedildiği gibi önemli adımlardan biri akrozom reaksiyonudur (AR), oositi çevreleyen zona pellucida (ZP) ve glikoprotein matrisi ile sperm başı temas ettiğinde gerçekleşen ekzositotik olaydır. AR başlatmak için asetilkolin basamağını nAChR sağlar (125,126).

4.6.4.1. CHRNA3 (Kolinergik Reseptör Nikotinik Alfa 3)

Bu gen, nikotinik asetilkolin reseptör ailesinin bir üyesini kodlar. Nikotinik asetilkolin reseptör alfa-3 alt-birimi; insanlarda kromozom 15'te (15q24) yer alan, CHRNA3 geni tarafından kodlanan bir proteindir (127). Nikotinik asetilkolin ailesinin üyelerini, hem alfa hemde beta alt birimlerinden oluşan, pentamerik kompleksler oluşturur. Bu lokus, karakteristik bitişik sistein rezidüsü içeren bir alfa-tipi alt birimini kodlar. Genin alternatif kırılmış transkript varyantları belirlenmiştir. Nikotinik asetilkolin reseptörleri (NACHR'lerin) sinapslarda hızlı sinyal iletimine aracılık eden ligand-kapılı iyon kanallarının süper ailesinin üyeleridir (128).

4.6.4.2. CHRNA5 (Kolinergik Reseptör Nikotinik Alfa 5)

Bu gen tarafından kodlanan protein, bir nikotinik asetilkolin reseptörü alt birimidir ve sinapslarda hızlı sinyal iletimini sağlayan ligand kapılı iyon kanalları süper ailesinin de bir üyesidir. Nöronal asetilkolin reseptör alfa-5 alt-birimi, insanlarda CHRNA5 geni tarafından kodlanır ve gen kromozom 15'te (15q24) yer almaktadır. Bu reseptörlerin ayrı, fakat benzer alt-birimlerden oluşan heteropentamerler olduğu düşünülmektedir (127).

4.6.4.3. CHRNA7 (Kolinergik Reseptör Nikotinik Alfa 7)

Nöronal asetilkolin reseptör alfa-7 alt-birimi; insanlarda kromozom 15'te yer alan, CHRNA7 geni tarafından kodlanan bir proteindir (129). Bu gen tarafından kodlanan protein, bir homo-oligomerik kanal oluşturur ve kalsiyum iyonlarına geçirgendir. Bu reseptöre asetilkolin bağlanmasıyla tüm alt birimler etkilenir ve plazma zarı boyunca iyon geçirgen kanalın açılmasını sağlayacak

şekilde yapısında kapsamlı bir değişiklik meydana gelir. Ayrıca alternatif kırılma sonucunda oluşan çok sayıda transkript varyantı tespit edilmiştir (130).

4.6.4.4. CHRNA9 (Kolinergik reseptör, nikotinik alfa 9)

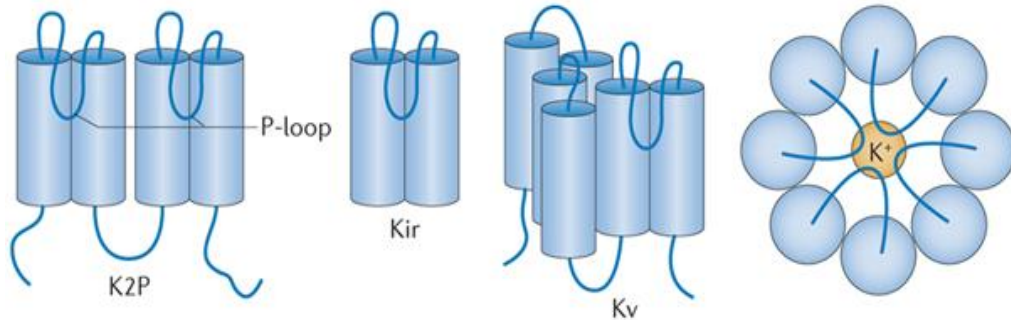
CHRNA9 geni; ligand-kapılı iyon kanalıdır ve nikotinik asetilkolin reseptörü gen süper ailesinin bir üyesidir. Gen, homo veya hetero-oligomerik iki değerlikli katyon kanallarını oluşturacak şekilde plazma membran proteinini kodlar. Nöronal asetilkolin reseptör alfa-9 alt-birimi, insanlarda kromozom 4 (4p14.)’te loalize olan CHRNA9 geni tarafından kodlanan bir proteindir (131, 132).

4.6.4.5. CHRNB4 (Kolinergik reseptör, nikotinik beta 4)

Nöronal asetilkolin reseptör beta-4 alt-birimi insanlarda 15. (15q24) kromozomda bulunan CHRNB4 geni tarafından kodlanan bir proteindir (127).

4.6.5. Potasyum Kanalları (KCNE1, KCNA5 (K_v1.5), KCNK5 (K_{2p}5.1))

KCNE1, KCNA5 (K_v1.5), KCNK5 (K_{2p}5.1); K⁺ kanalları ve CLNS1A ve CLCN3 (H⁺/Cl⁻ alışverişi transporter 3); Cl⁻ kanalları fizyolojik koşullar altında sperm kalitesi ve sperm hacminin düzenlenmesinde etkili olan iyon kanallarıdır (133,134).



Şekil 10. Potasyum kanal monomerlerinin yanıl görünüşü (135)

4.6.5.1. KCNE1 (Potasyum Kanalı, Voltaj Kapılı Altfamilya E, Düzenleyici Beta Alt Birimi 1)

Bu gen ürünü potasyum kanalı KCNE ailesine aittir. Potasyum voltaj kapılı kanal E alt familyasının 1.üyesi, insanlarda 21. kromozomda (21q22.12) bulunan KCNE1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. KCNE1; Kv kanal bağımlı veya β alt ünitelerinin KCNE ailesine ait beş üyesinden biridir. Ayrıca minK (minimal potasyum kanal alt birimi) olarak da bilinir. Aynı proteini kodlayan alternatif kırılmış transkript varyantları tanımlanmıştır. Voltaj-kapılı potasyum kanalları (Kv); hem işlevsel hem de yapısal olarak voltaj kapılı iyon kanallarının en karmaşık sınıfını temsil etmektedir. Potasyum iyon kanallarının elektrofizyolojik ve farmakolojik özellikleri, yüksek derecede bir çeşitlilik göstermektedir. Nörotransmitter salınımını, kalp hızını, insülin salgısını, nöronal uyarılabilirliği, epitel elektrolit taşıma, düz kas kasılması ve hücre hacmini düzenleme gibi fonksiyonları mevcuttur (136).

4.6.5.2. KCNA5 (Potasyum Kanalı, Voltaj Kapılı Kanal, Altfamilya A, 5. Üyesi)

Potasyum kanalları; hem yapısal hemde işlevsel açıdan voltaj bağımlı kanalların en karmaşık sınıfını temsil etmektedir. KCNA5 (Kv1.5); potasyum voltaj-kapılı kanalı A alt ailesinin 5. üyesidir ve insanlarda 12. Kromozomda (12p13) yer alan KCNA5 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu gen intronsuzdur ve gen kromozom 12'de KCNA1 ve KCNA6 genleri ile kümelenmiştir. Bu üye, dördüncü segmentte bir shaker-tipi tekrarı ile altı membran geçişli alan içermektedir. Protein gecikmeli rektifayer sınıfına aittir, depolarizasyon sonrası beta hücrelerinin istirahat membran potansiyeline geri dönmesinde etkili olur, dolayısıyla da insülin sekresyonunun düzenlenmesine

katkıda bulunmaktadır (137). Potasyum kanalları, sülfonilüre oral hipoglisemik ajanlar ve glikoza tepki olarak pankreatik beta hücrelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (138).

4.6.5.3. KCNK5 (Potasyum Kanalı, İki Por Domainli K Alt Ailesinin 5. Üyesi)

Bu gen, iki gözenek oluşturuca P alanlarını içeren potasyum kanal proteinlerinin, süper ailesinin üyelerinden birini kodlar. Potasyum kanalı K alt familyasının 5. üyesi, insanlarda 6. Kromozomda (6p21) yer alan KCNK5 geni tarafından kodlanan bir proteindir.

Potasyum kanalları hemen hemen tüm canlı hücre membranlarında yer alırken, potasyum iyon akımı nöronal uyarılma, kas kasılması, hacim düzenlenmesi ve hormon sekresyonu gibi birçok hücrel fonksiyonun kontrolünde yer alır. Bu genin transkripti kortikal distal tübüller ve böbrek toplama kanallarında baskın bir şekilde eksprese olmaktadır. Protein, dışsal pH değerine son derece duyarlıdır ve bu durum böbrekte potasyum taşınmasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (139-141).

4.6.6. Klorür Kanalları (CLCN3, CLNS1A)

Klorür kanalları; iyon kanallarının tam olarak anlaşılamamış bir süper ailesidir. Voltaj bağımlı ve ligand-kapılı kanalların çeşitli aileleri insanlarda karakterize edilmiştir. Voltaj-kapılı klorür kanallarının; pH regülasyonu, hacim homeostazisi, organik çözünmüş madde taşınması, hücre göçü, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını içeren çeşitli fizyolojik ve hücrel rolleri belirlenmiştir (142).

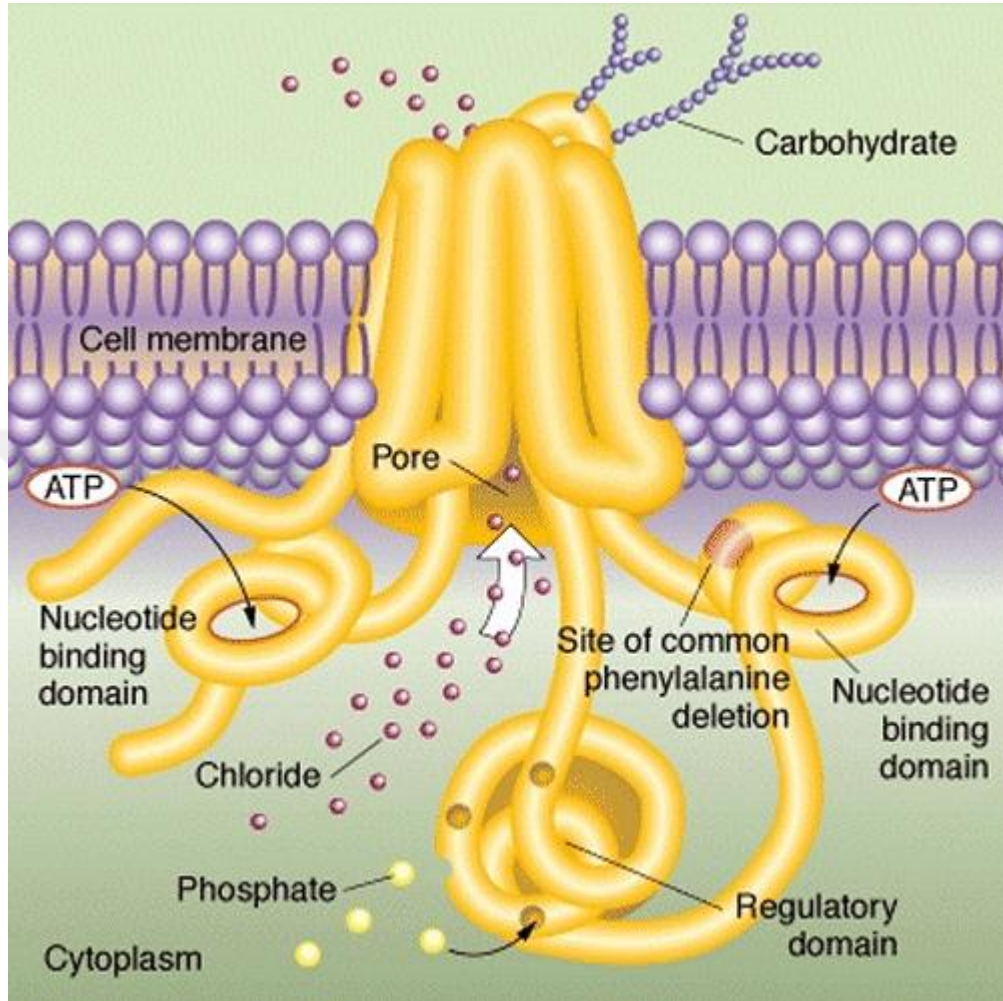
4.6.6.1. CLCN3 (Voltaja Duyarlı Klorür Kanalı 3)

CLCN3 geni; voltaj bağımlı klorür kanalı (CIC) ailesinin bir üyesini kodlar. Voltaja duyarlı klorür kanalı 3, insanlarda 4. kromozomda (4q33) yer alan CLCN3 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Kodlanan protein tüm hücre tiplerinde mevcuttur ve plazma zarlarında ve hücre içi veziküllerde lokalizedir. Protein bir CIC domaini ve iki ek C-terminali CBS (sistatinyonin beta-sintaz) domaini içeren çok-geçişli bir membran proteindir. CIC domaini; hücre zarları arasında Cl⁻ iyonlarının seçici geçişini kataliz eder ve CBS domaini bir regülatör fonksiyonuna sahip olabilir. Bu protein, hem asidifikasyon ve GABA benzeri sinaptik veziküllerin transmitter yüklenmesinde hem de düz kas hücre aktivasyonu ve neointima oluşumunda rol oynar. Bu protein, lizofosfatidik asit (LPA)- aktiviteli Cl akımı aktivitesi ve fibroblasttan miyofibroblast farklılaşması için gereklidir. Protein aktivitesi, glioma hücrelerinde Ca⁺² / kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) tarafından düzenlenir. Farklı izoformlarını kodlayan birden fazla alternatif kırılmış transkript varyantları tanımlanmıştır (143,144).

4.6.6.2. CLNS1A (Nükleotid Duyarlı Klorür Kanalı 1A)

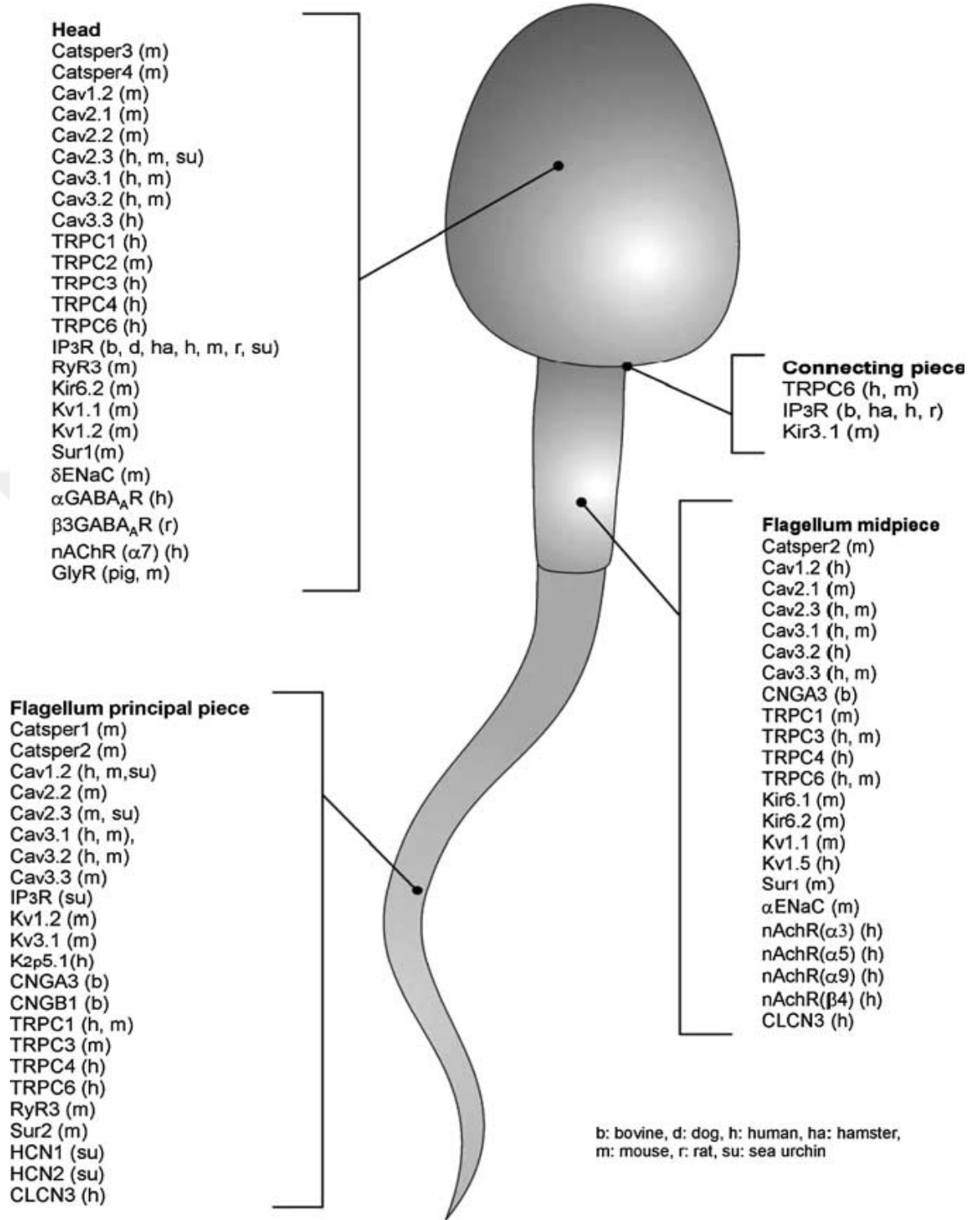
Metilozom alt birimi pICln; insanlarda 11. kromozomda (11q13.5-q14) yer alan CLNS1A geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu gen, çeşitli düzenleyici yollarda fonksiyon gören bir proteini kodlar. Kodlanan protein pek çok sitosolik protein ile kompleks oluşturur ve küçük nükleer ribonükleoprotein biyosentezi, trombosit aktivasyonu ve hücre iskeleti organizasyonun düzenlenmesi de dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonları yerine getirir. Proteinin aynı zamanda bir klorür akım regülatörü gibi fonksiyon gören plazma membranı ile ilişkili olduğu

bulunmuştur. Farklı izoformlarını kodlayan çeşitli transkript varyantları, bu gen için tespit edilmiştir (145).



Şekil 11. Klorid iyon kanalı (146).

Anguita ve diğ. (1995) bir insan oküler siliyer epitel hücre cDNA kütüphanesinden klorür kanalı I (Cln) kodlayan yeni bir gen klonladılar. Tahmin edilen protein 4 farazi transmembran domain içermektedir (145). Northern blot analizi ile Nagl ve diğ. (1996) genin çeşitli insan dokularında yaklaşık olarak 1,7 kb ileti olarak eksprese olduğunu belirlemişlerdir ve CLNS1A geninin genomik DNA'sını klonlayıp genin genomunun 19 kb kapsayan çok sayıda ekson içerdiğini gösterdiler (147).



Şekil 12. İnsan ve fare sperminde bulunan iyon kanallarının lokalizasyonu (148).

Farklı iyon kanallarının özeti ve iyon kanallarının spermde alansal dağılımı, belirtilen bölgelerde immünolokelize olan kanalları içerir. Bu kanalların birçoğunun varlığına dair kanıtlar RT-PCR, in situ hibridizasyon ve western blot teknikleriyle elde edilmiştir.

Şu ana kadar yapılan pek çok çalışmada iyon kanallarının, insan sperm hücrelerinde varlığı gösterilmiş ve bu kanal inhibitörlerinin spermin fizyolojik aktiviterleri üzerine çeşitli olumlu ya da olumsuz etkilerinin olduğu belirlenmiştir (148). Ancak şu ana kadar sperm anormalilerine sahip erkeklerden elde edilen semen örneklerinde; iyon kanal mRNA ifadelerinin araştırıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Çalışmamızda sperm anormalisi gösteren infertil erkek bireylerin semen örneklerinde; yukarıda detaylı bir şekilde açıklanan kalsiyum, potasyum, klor ve GABA iyon kanal mRNA ifadelerinin, sağlıklı normozoospermik kontrolle karşılaştırılarak araştırılması ve iyon kanal mRNA ifadelerinin; sperm anormalilerinin oluşum süreçlerinde meydana gelen anormalilerin oluşuma muhtemel katkısının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca onaylanan çalışmada, Haziran 2014-Haziran 2015 arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji AD, Androloji ABD'na infertilite nedeni ile başvuran hastalar çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya aile öyküsü ve genetik profili normal olan ve varikoseli olmayan hastalar dâhil 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. Fiziki 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 dâhil edilen 120 hasta Avrupa Üroloji Derneği 2015 yılı erkek infertilitesi guideline'na uygun olarak birbirine sayıca eşdeğer 5 gruba ayrıldı.

- 1) Normozoospermi (kontrol grubu) (n=30)
- 2) Oligozoospermi (n=30)
- 3) Astenozoospermi (n=30)
- 4) Teratozoospermi (n=30)
- 5) Oligoastenoteratozoospermi (n=30)

5.2. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Aletler

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, 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 Fluorometer: 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

5.3. 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

- 5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX): Solis Biodyne, Riia 185a, 51014 Tartu, Estonia
- Temizleme Solüsyonu: Bioshop, Nuclease Removal Reagent (500 mL), Kanada
- Tri Reagent, Molecular Research Center, Cat No: TR 118, Montgomery Road Cincinnati, OH, USA

5.4. İyon Kanallarını Tespit Etmede Kullanılan Yöntemler

5.4.1. 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 çözöldü. 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 yıkandı. Örnekler 10⁸ hücreye 1 ml olacak şekilde Trizol'de çözöldü. 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 çözöldü ve 15 dakika 58 °C'de ısı uygulandı.

5.5. Spektrofotometrik RNA Ölçümü

RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen/Molecular Probes) kullanıldı. . İşleme geçmeden önce DNAaz-RNAaz içermeyen steril su ile kör ölçüm yapıldı. BioSpec-nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 1 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Bu işlem her bir örnek için tekrarlandı. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart olarak alındı.

5.6. Komplementer DNA Sentezi

5.6.1. Kullanılan Çözeltiler ve Gereçler

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

PCR Cihazı

500/1500 µl Ependorf Tüp

Nükleaz İçermeyen Steril Su

5.6.2. Komplementer DNA Sentezi

cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 µl kullanılarak cDNA sentezi toplam 20µl hacim üzerinden gerçekleştirildi. Sentez için 10µl RNA örneği, 2 µl 10XRT buffer, 2 µl 10XRT random primer, 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 -80°C’de saklandı.

Tablo 4. 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 H ₂ O	4.2	
Reaksiyon toplamı	10.0	

Tablo 5. 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	∞

5.7. 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. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH (Qiagen (Kat. No: OT00079247))), Realtimeprimers Gen Panelinde yer alan CACNA1C, CACNA1B, CACNA1E, CACNA1G, CACNA1H, CACNA1I, TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6, TRPV6, α GABA_AR, IP₃R, CHRNA3 CHRNA5, CHRNA7, CHRNA9, CHRNB4, CLNS1A, KCNE1, KCNA5, KCNK5, CLCN3 genlerinin ekspresyonları belirlendi. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

Real Time PCR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PCR Plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 1µl kondu. Her bir örnek için 2 µl qPCR mix, 1 µl primer ve 6 µl DNAaz ve RNAaz içermeyen steril su olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara kondu ve vortekslendi. Plate'deki cDNA örneklerinin üzerine 9 µl 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	1.0
Primer	1.5
qPCR Mix	2.0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	6.0
Toplam	10.0

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 1 kez 95 °C'de, 15 dk ve 40 kez 95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 7. Uygulanan RT-PCR programı

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç aktivasyonu	95°C	15 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	
Annealing	60°C	30 sn	40
Uzama	72°C	30 dk	

5.8. 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.

6. 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 ($p<0,05$).

İyon Kanal Gen İfadeleri, Biyokimyasal Ve Spermigram Verilerinin

Korelasyon Analizi

Tablo 8. Lineer korelasyon analizi

Gene Name	FSH	LH	Prolactin	Testosterone	Sperm Count (x106 /ml)	Progresive Motility (%)	Kruger
CACNA1B	0,123 p=0,288	-0,004 p=0,973	0,077 p=0,513	0,077 p=0,514	-0,287** p=0,001	-0,521 p=0,001	-0,273** p=0,003
CACNA1E	0,094 p=0,417	0,042 p=0,723	-0,21 p=0,072	-0,119 p=0,314	-0,14 p=0,119	-0,339** p=0,000	0,11 p=0,236
CACNA1G	0,265* p=0,021	0,108 p=0,359	-0,074 p=0,533	-0,134 p=0,256	-0,327** p=0,000	-0,41** p=0,000	-0,212* p=0,021
CACNA1H	0,076 p=0,514	-0,073 p=0,536	0,004 p=0,973	-0,005 p=0,964	-0,037 p=0,678	0,223 p=0,015	0,116 p=0,210
CACNA1I	0,198 p=0,087	-0,095 p=0,419	-0,139 p=0,239	0,023 p=0,848	-0,136 p=0,13	-0,085 p=0,356	0,088 p=0,342
TRPC1	0,243* p=0,034	-0,029 p=0,804	-0,002 p=0,988	0,098 p=0,407	0,0320** p=0,000	0,507** p=0,000	0,033 p=0,724
TRPC3	0,018 p=0,878	-0,113 p=0,340	-0,082 p=0,485	0,087 p=0,461	0,000 p=0,997	0,111 p=0,229	0,267** p=0,003
TRPC6	0,061 p=0,602	-0,033 p=0,781	-0,251* p=0,031	-0,076 p=0,522	-0,091 p=0,312	-0,289 p=0,001	0,074 p=0,426
TRPV6	0,194 p=0,094	0,056 p=0,638	-0,12 p=0,31	-0,205 p=0,079	-0,288 p=0,001	-0,156 p=0,091	-0,03 p=0,745
CHRNA3	0,016 P=0,891	-0,082 P= 0,486	0,115 P=0,329	0,054 P=0,650	-0,001 P= 0,992	0,578** P=0,000	0,335** P=0,000
CHRNA5	-0,020 p=0,865	-0,122 p=0,299	-0,048 p=0,687	0,177 p=0,132	-0,079 p=0,380	0,304* p=0,01	0,077 p=0,406
CHRNA9	0,085 p=0,466	-0,177 p=0,131	-0,19 p=0,106	-0,17 p=0,555	-0,129 p=0,151	-0,091 p=0,324	0,249** p=0,007
CHRNA4	0,054 p=0,642	0,077 p=0,517	0,131 p=0,267	-0,110 p=0,349	-0,124 p=0,166	0,465 p=0,000	0,076 p=0,415
KCNA5	0,183 p=0,114	0,122 p=0,3	-0,112 p=0,341	-0,043 p=0,715	-0,226* p=0,011	-0,360** p=0,000	-0,390** p=0,000
KCNE1	0,108 p=0,352	0,227 p=0,052	-0,184 p=0,117	-0,153 p=0,193	-0,223* p=0,012	-0,324** p=0,000	0,004 p=0,964
KCNK5	0,078 p=0,504	0,088 p=0,458	-0,194 p=0,098	-0,043 p=0,719	-0,163 p=0,068	-0,229* p=0,012	-0,144 p=0,12
CLNS1A	0,134 p=0,25	0,046 p=0,699	-0,169 p=0,151	-0,095 p=0,42	-0,266* p=0,003	-0,22* p=0,016	-0,237* p=0,01
CLCN3	0,098 p=0,397	0,031 p=0,795	0,055 p=0,640	0,020 p=0,863	-0,165 p=0,066	0,492 p=0,000	0,056 p=0,55
GABA1α	0,247* p=0,032	0,028 p=0,815	-0,116 p=0,325	0,123 p=0,297	-0,247** p=0,005	-0,309** p=0,001	-0,201** p=0,029

Tablo 8’te alt gruplara bölünmeden tüm katılımcılarda lineer korelasyon analizi sonuçlarını vermiştir. Analiz edilen tüm hasta gruplarında FSH düzeyleri ile CACNA1G, TRPC1, GABA1 α arasında yüksek korelasyon belirlendi ($p < 0,05$). TRPC6 mRNA düzeyleri ve prolaktin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyona sahiptir ($p < 0,05$). Özellikle CACNA1B, CACNA1G, TRPV6, KCNA5, KCNE1, GABA1 α ifade seviyeleri ve sperm sayısı arasında anlamlı bir negatif korelasyon bulundu ($p < 0,05$). Bununla birlikte, TRPC1 mRNA düzeyleri ve sperm sayısı pozitif korelasyona sahiptir ($p < 0,05$). CACNA1B, E, G ve progresif motilite ekspresyon seviyeleri arasında da ters bir ilişki bulundu ($p < 0,05$). CACNA1H, TRPC1, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB4, CLCN3 ve progresif motilite arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi ($p < 0,05$). Kruger ile CACNA1B, CACNA1G, CLNS1A, GABA1 α arasında pozitif bir korelasyon tespit edilirken TRPC3, CHRA9 negatif korelasyon tespit edildi ($p < 0,05$).

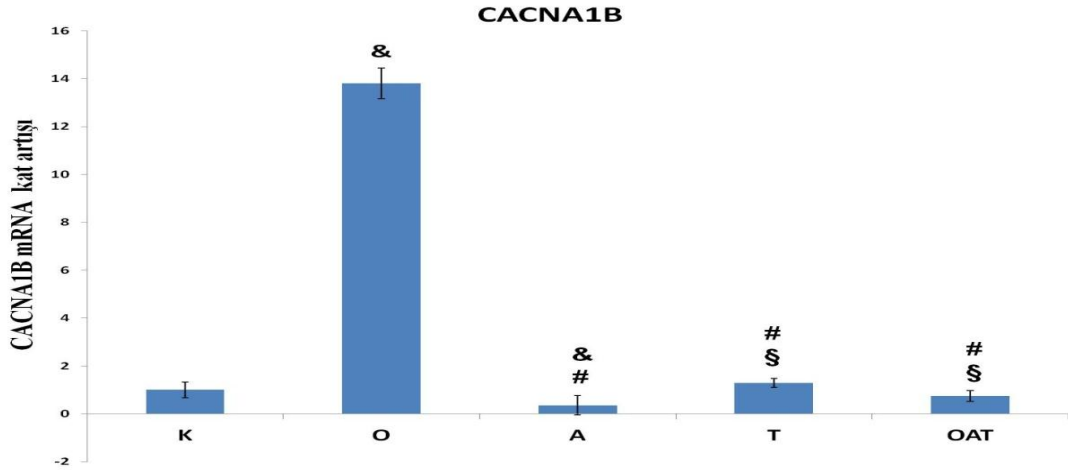
Tablo 9’da lineer korelasyon istatistikleri için alt grup analizleri yaptığımızda, alt gruplara ayrılmaksızın tüm katılımcılarda belirgin bir istatistik bulunamadı. Ancak, alt grupların korelasyon sonuçlarına göre farklı laboratuvar ve biyokimyasal bulgular ile iyon kanalı mRNA ekspresyonları arasındaki ilişki gösterildi. Sonuçlar Tablo 9’da gösterildi.

Tablo 9. Farklı laboratuvar ve biyokimyasal bulgular ile iyon kanalı mRNA ekspresyonları arasındaki ilişki

GRUPLAR	Gen / Parametre	r / p değeri
Kontrol	Cacna1h / sperm sayısı	r: 0,427 p: 0,015
	Chrna5/ LH	r: -0,577 p: 0,019
	TRPC3/LH	r: -0,559 p: 0,024
	TRPV6/TT	r: -0,613 p: 0,012
	Chrna9/Motilite	r: 0,427 p: 0,017
	Clns1a/Kruger	r: -0,391 p: 0,027
	CLCN3 / Sperm sayısı	r: 0,411 p: 0,03
	Chrna9 / LH	r: 458 p: 0,049
Oligozoospermi	Chrna5/TT	r: 0,595 p: 0,032
	TRPV6 / Motilite	r: -0,452 p: 0,046
	Kcna5 / Motilite	r: -0,442 p: 0,050
	Kcna5 / Prolaktin	r: -0,630 p: 0,021
Astenozoospermi	Cacna1h / Motilite	r: 0,573 p: 0,032
	TRPC1 / FSH	r: 0,586 p: 0,036
	TRPV6 / Motilite	r: -0,488 p: 0,072
	CLCN3 / Kruger	r: -0,406 p: 0,023
Teratozoospermi	TRPC3 / Kruger	r: -0,498 p: 0,004
Oligoastenoteratozoospermi		

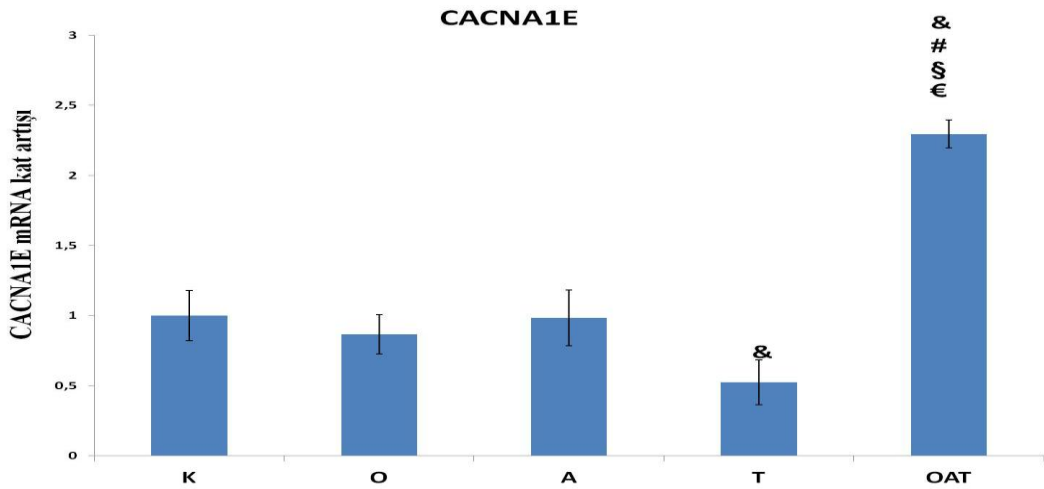
& diğer gruplarla kontrol grubunun anlamlılığını, # diğer grupların oligozoospermi grubuyla anlamlılığını, § diğer gruplarla astenospermi grubunun anlamlılığını ve € teratozoospermi grubuyla oligoastenoteratozoospermi grubu arasındaki anlamlılığı göstermektedir.

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CACNA1B gen ekspresyonu oligospermi grubunda kontrole gre belirgin dzeyde artarken astenospermi grubunda azalmıştır ve diğer gruplarda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



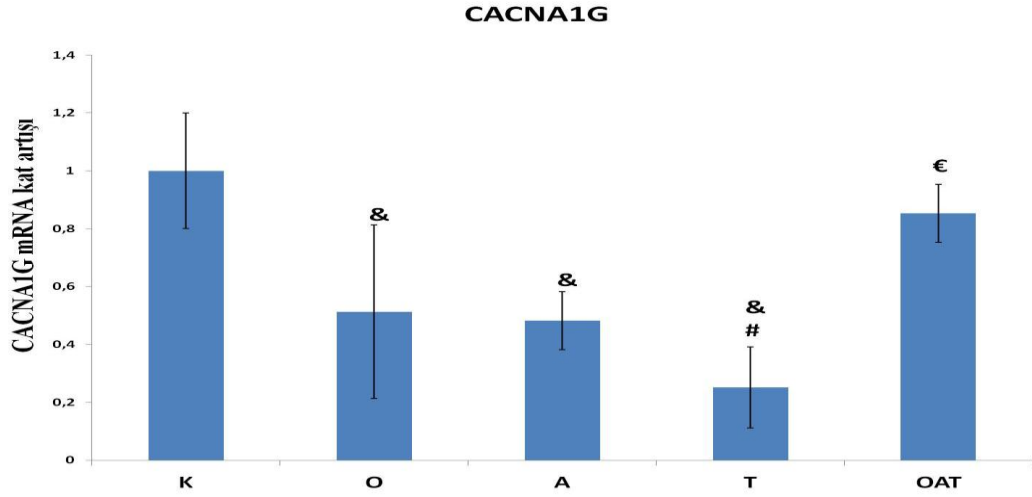
şekil 13. CACNA1B Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CACNA1E gen ekspresyonunun kontrol grubuna gre oligoastenoteratospermi grubunda arttığı, teratospermi grubunda azaldığı ve diğer gruplarda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



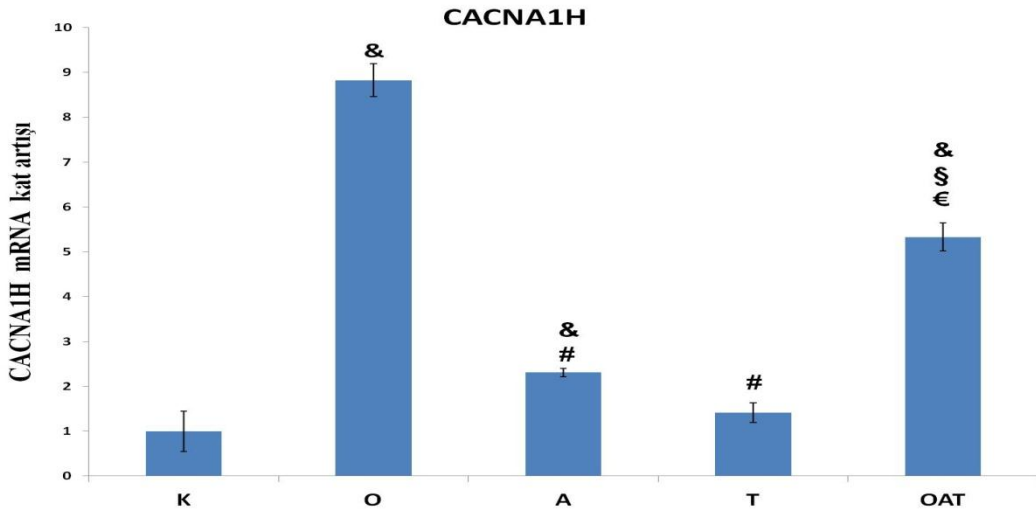
şekil 14. CACNA1E Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CACNA1G gen ekspresyonunun oligospermi, astenospermi ve teratospermi gruplarında kontrol grubuna gre azaldığı, oligoastenoteratospermi grubunda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



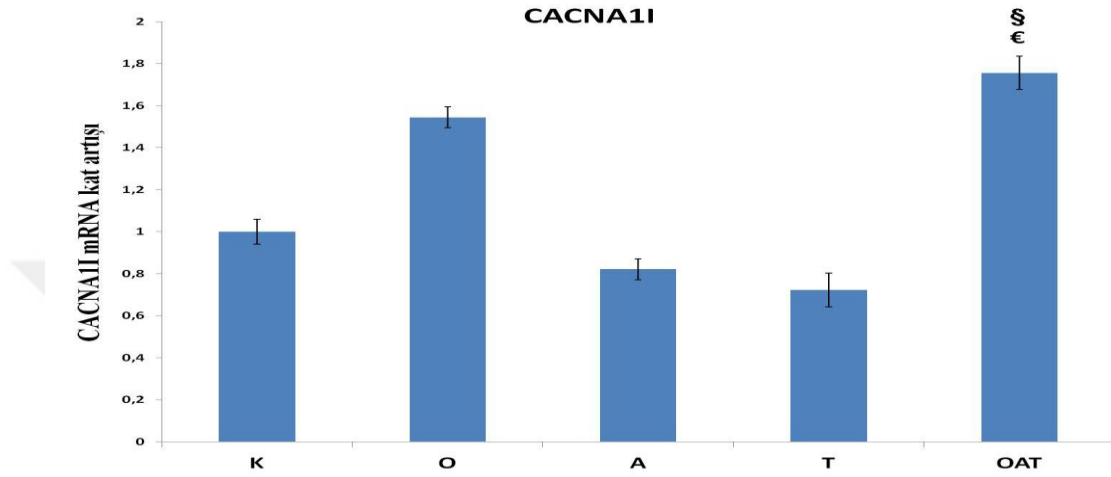
şekil 15. CACNA1G Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CACNA1H gen ekspresyonunun kontrol grubuna gre oligospermi, astenospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında arttığı ve teratospermi grubunda ise anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.



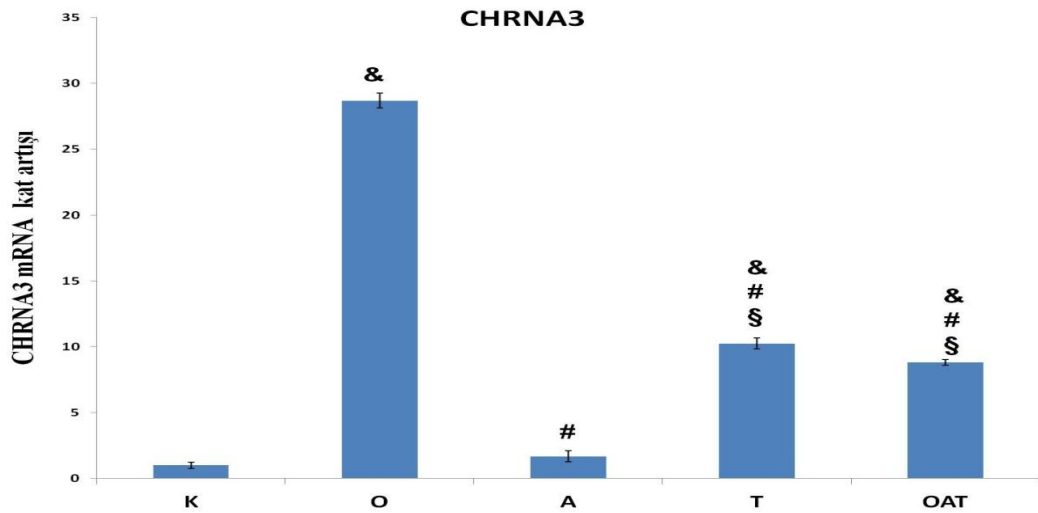
şekil 16. CACNA1H Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda CACNA1I gen ekspresyonunun oligoastenoteratospermi grubunda kontrol grubuna göre arttığı, oligospermi, astenospermi ve teratospermi gruplarında ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



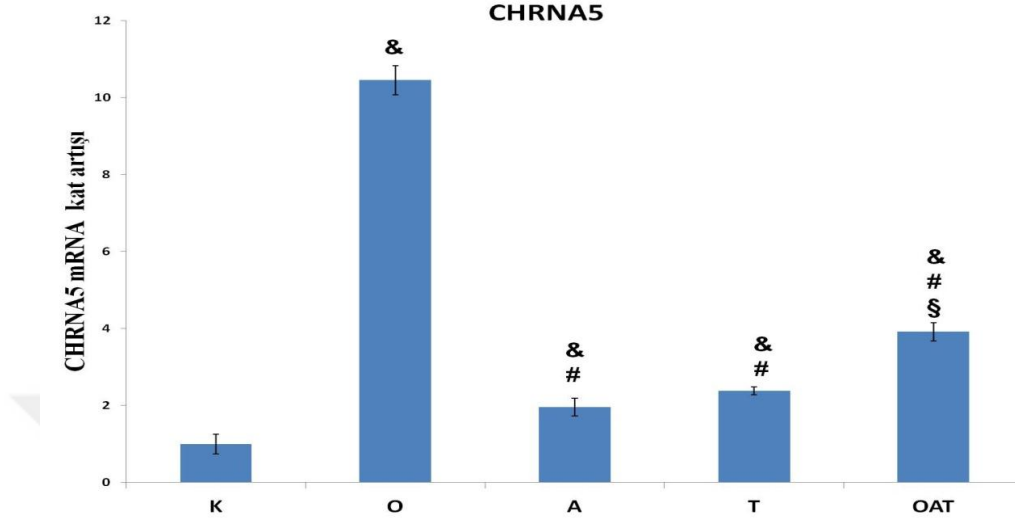
Şekil 17. CACNA1I Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda CHRNA3 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre oligospermi, teratospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında arttığı, astenospermi grubunda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



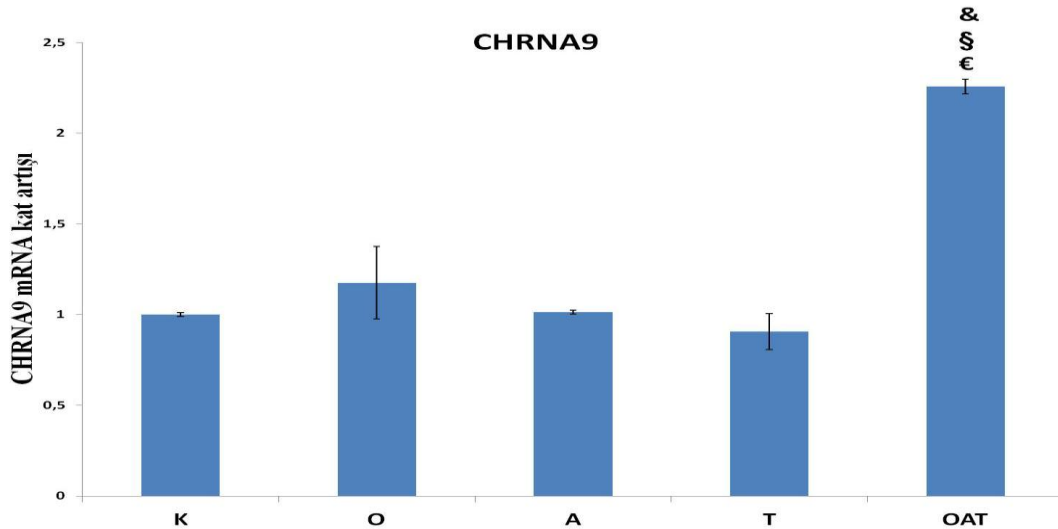
Şekil 18. CHRNA3 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CHRNA5 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre tüm gruplarda arttığı tespit edildi.



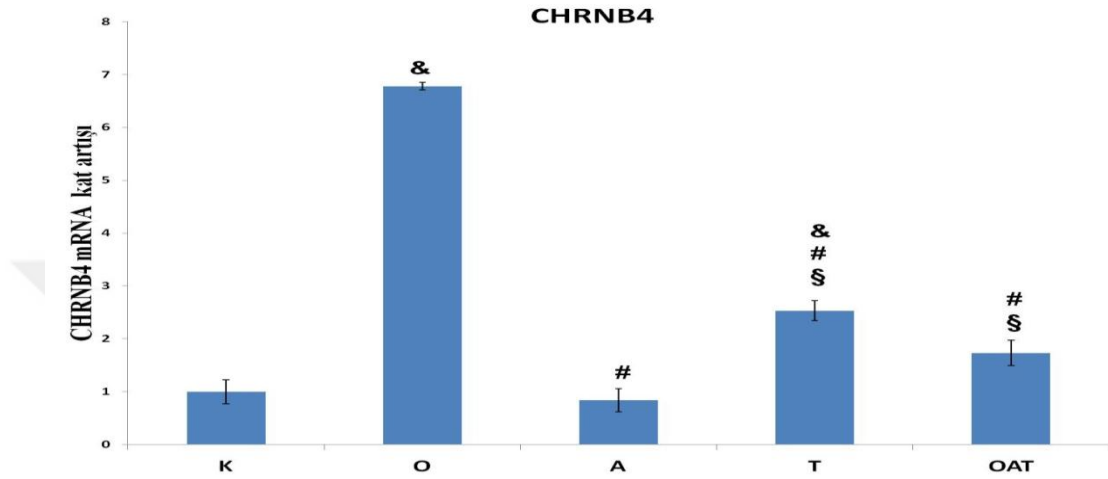
şekil 19. CHRNA5 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CHRNA9 gen ekspresyonunun oligoastenoteratospermi grubunda kontrol grubuna göre arttığı, oligospermi, astenospermi ve teratospermi gruplarında ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



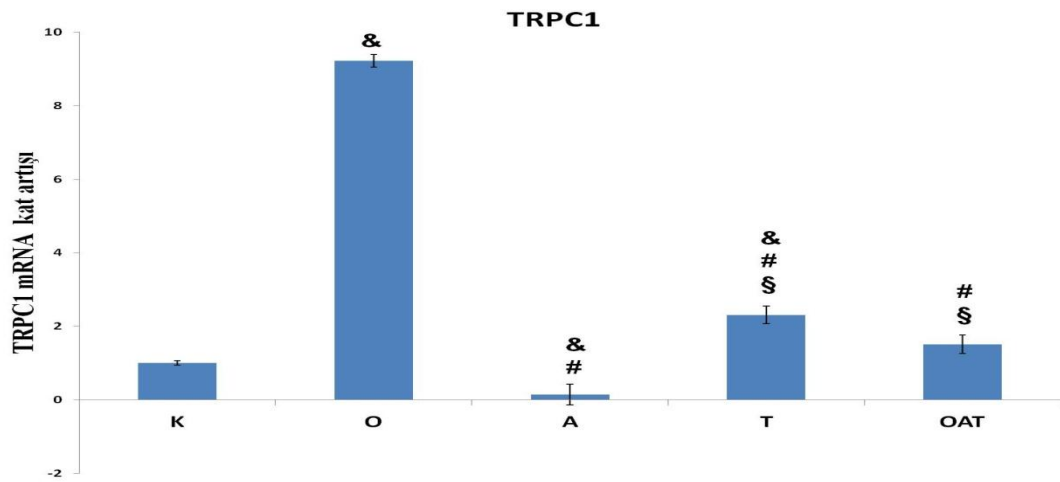
şekil 20. CHRNA9 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CHRNA4 gen ekspresyonun kontrol grubuna göre oligospermi ve teratospermi gruplarında arttığı, oligoastenoteratospermi ve astenospermi gruplarında ise anlamlı fark olmadığı tespit edildi.



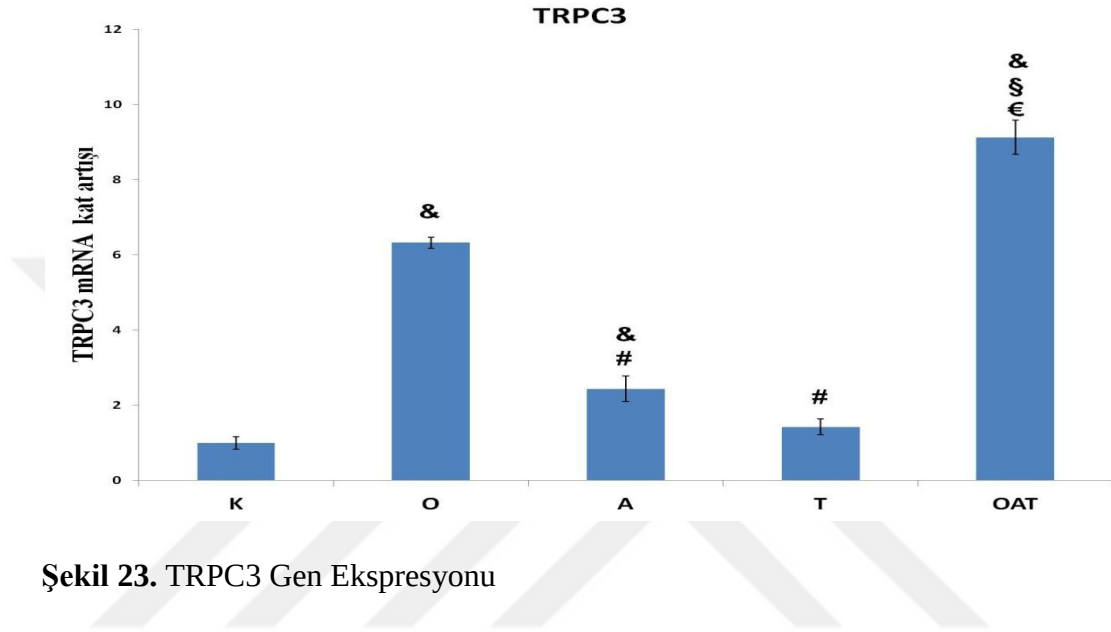
şekil 21. CHRNA4 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda TRPC1 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre oligospermi ve teratospermi gruplarında arttığı, astenospermi grubunda azldığı ve oligoastenoteratospermi grubunda ise anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

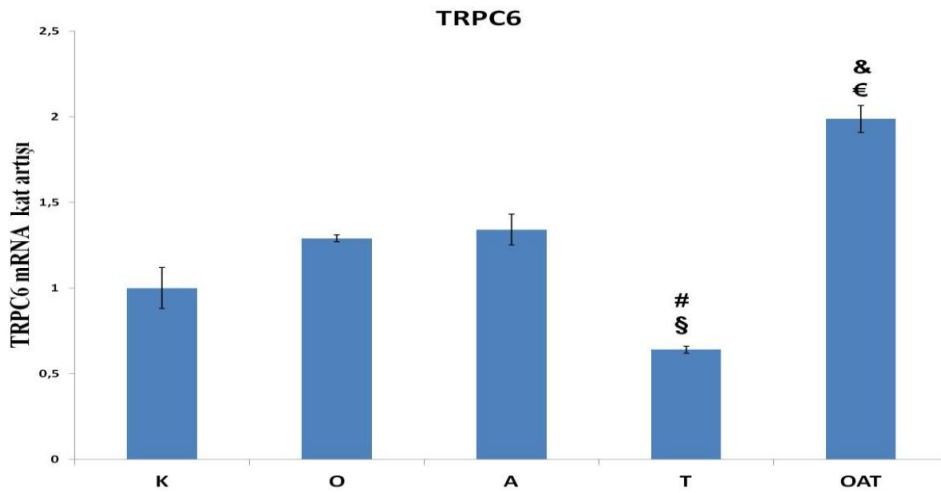


şekil 22. TRPC1 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda TRPC3 gen ekspresyonun kontrol grubuna gre oligospermi, astenospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında arttığı, teratospermi grubunda ise anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

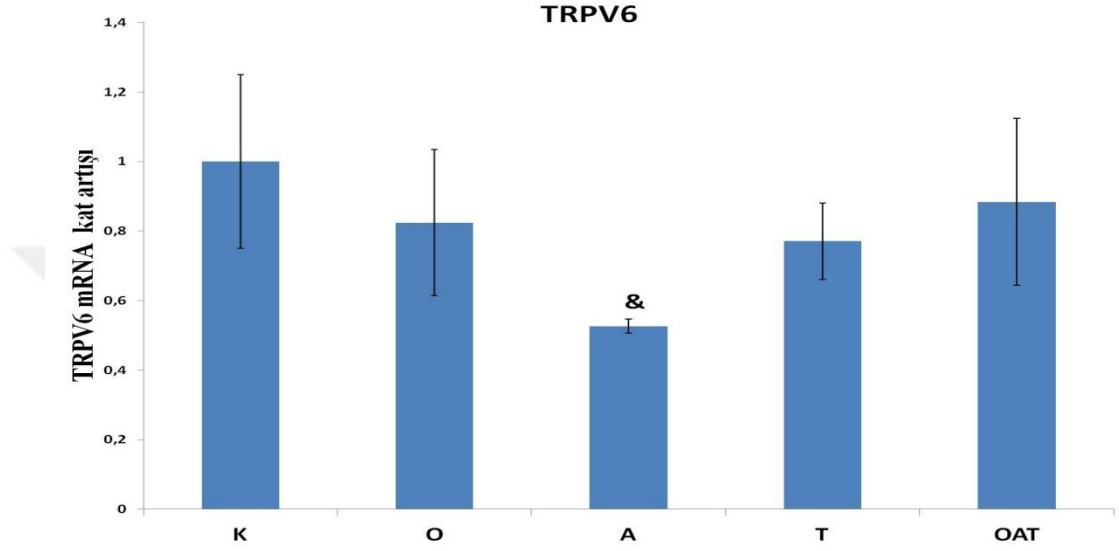


RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda TRPC6 gen ekspresyonunun oligoastenoteratospermi grubunda kontrol grubuna gre arttığı, diğer gruplarda ise anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.



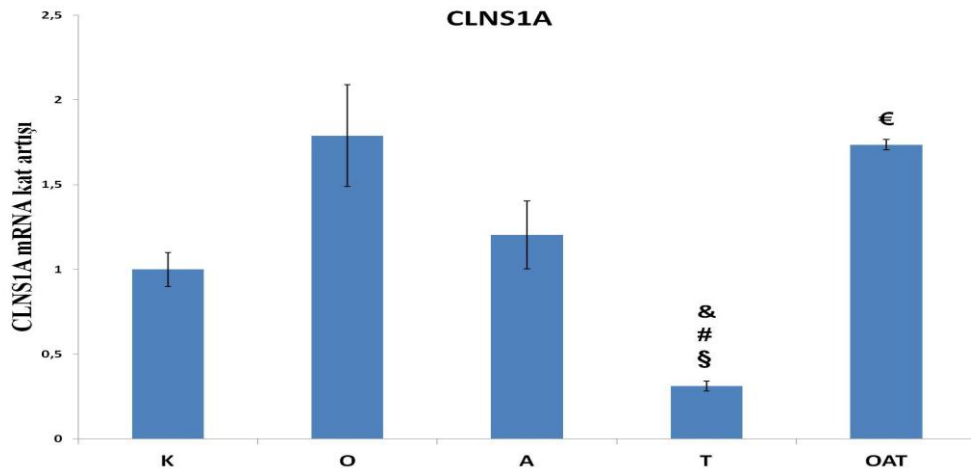
Şekil 24. TRPC6 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda TRPV6 gen ekspresyonunun astenospermi grubunda azaldığı, diğer gruplarda ise anlamlı fark olmadığı tespit edildi.



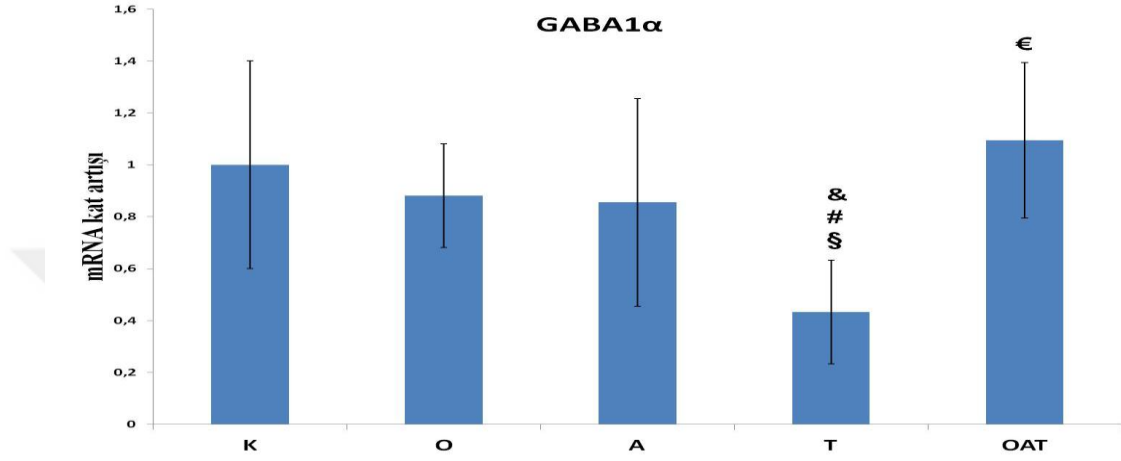
şekil 25. TRPV6 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CLNS1A gen ekspresyonunun teratospermi grubunda kontrol grubuna göre azaldığı, diğer gruplarda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



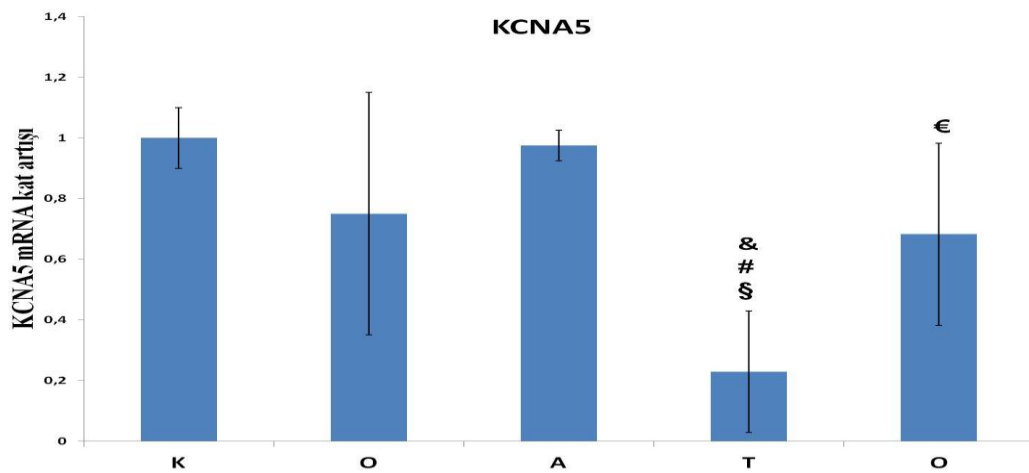
şekil 26. CLNS1A Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda GABA1 α gen ekspresyonunun teratospermi grubunda kontrol grubuna göre azaldığı, oligospermi, astenospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



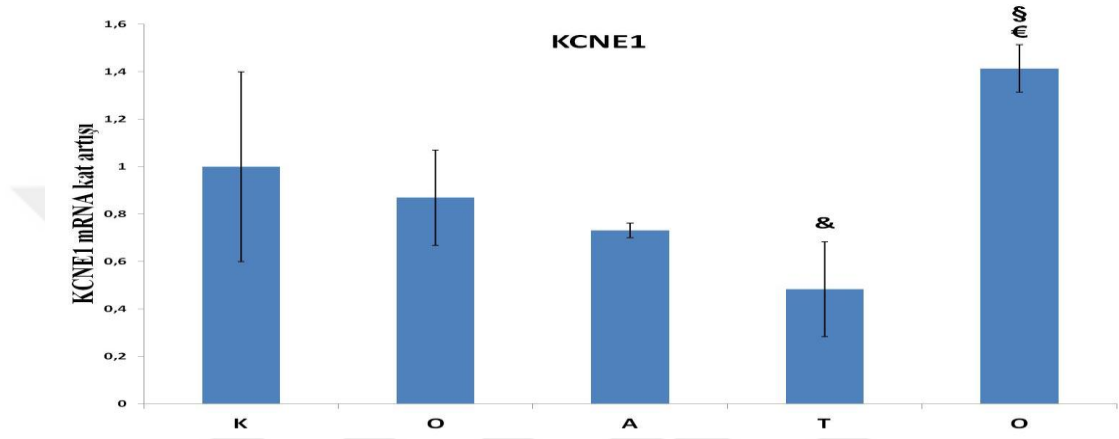
Şekil 27. GABA1 α Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda KCNA5 gen ekspresyonunun teratospermi grubunda kontrol grubuna göre azaldığı, oligospermi, astenospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



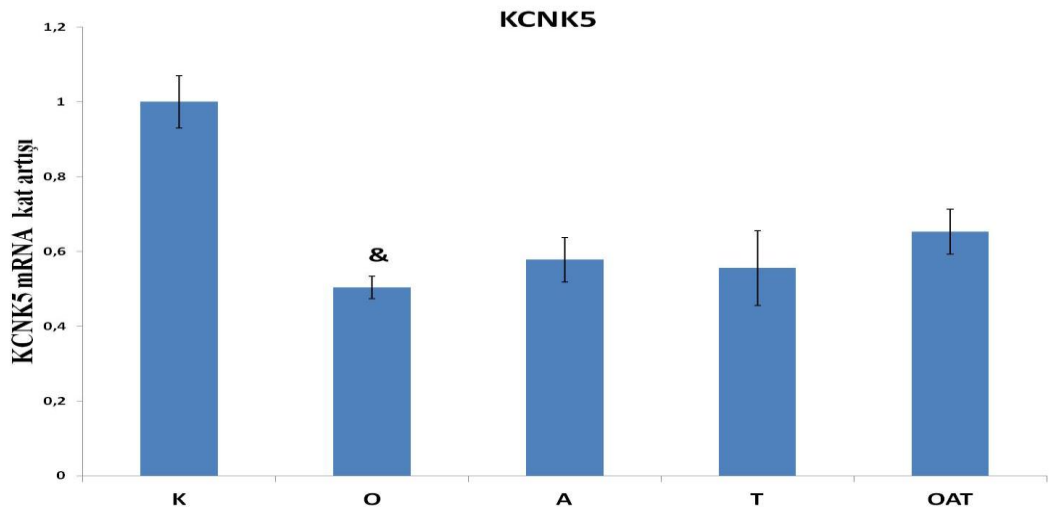
Şekil 28. KCNA5 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda KCNE1 gen ekspresyonunun teratospermi grubunda kontrol grubuna göre azaldığı, oligospermi, astenospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında ise anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



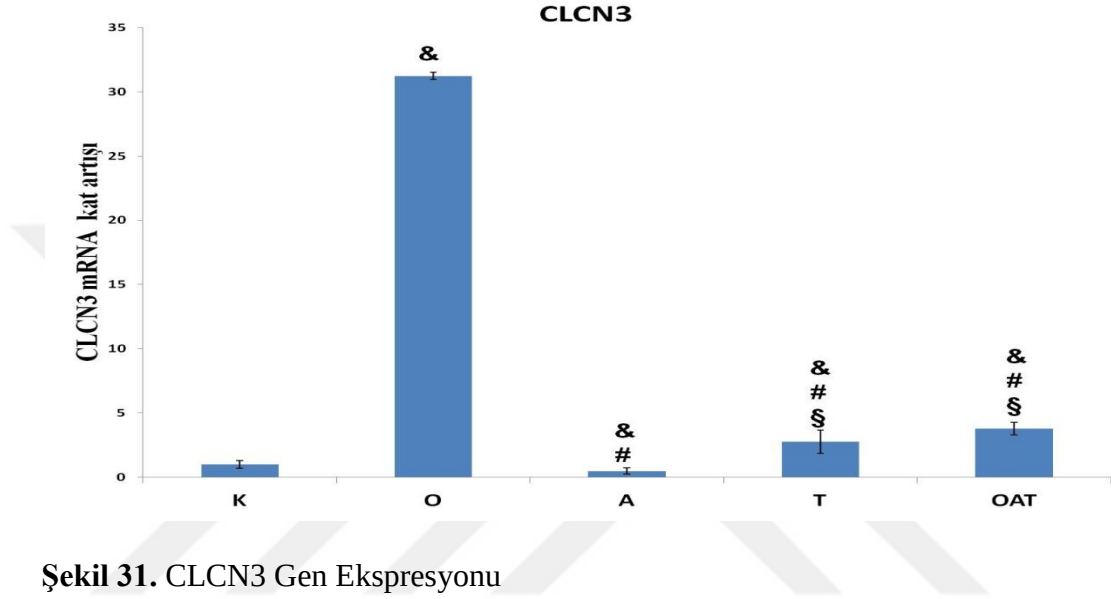
Şekil 29. KCNE1 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda KCNK5 gen ekspresyonunun oligospermi grubunda kontrole göre azaldığı, diğer gruplarda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi.



Şekil 30. KCNK5 Gen Ekspresyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak yapılan alışmamızda CLCN3 gen ekspresyonunun kontrol grubuna gre oligospermi, teratospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında arttığı, astenospermi grubunda ise azaldığı tespit edildi.



7. TARTIŞMA

Reprodüktif çağdaki çiftlerin bir kısmı istemeleri ve bir yıl korunmasız cinsel yaşama rağmen çocuk sahibi olamamaktadır (1). Erkek faktörlü infertilite; genetik faktörler, immünolojik, iatrojenik, sistemik, endokrin nedenler, idiopatik oligozoospermi, idiopatik astenozoospermi, idiopatik teratozoospermi, obstrüktif kriptozoospermi, obstrüktif azoospermi, idiopatik azoospermi gibi etyolojik gruplara ayrılmıştır. Ayrıca bazı hasta grupları normal hormon, spermogram ve genetik verilere sahip olmasına rağmen çocuk sahibi olamamaktadır (9,10). Mevcut çalışmada; varikozel öyküsü olmayan, aile öyküsü ve genetik parametreleri normal fakat oligozoospermi, teratozoospermi, astenozoospermi ve oligoastenoteratospermili infertil bireylerin sperm örneklerinde, iyon kanal gen ekspresyon paternleri araştırıldı ve fertil normospermik erkekler ile karşılaştırıldı.

Sperm morfolojik olarak karmaşık, oldukça küçük ve farklılaşmış hücrelerdir (149). Fertilizasyonu gerçekleştirmek üzere sperm; maturasyon ve yumurtaya yolculuğu boyunca çeşitli kimyasal sinyalleri algılayacak şekilde donatılmıştır (119). Bu süreçte etkili olan iyon kanallarının ve taşıyıcılarının hangileri olduğu ve mevcut iyon kanallarının bu süreçlerdeki görevleri tam olarak bilinmemekle beraber, sperm iyon kanallarının fertilizasyon için önemli süreçler olan; spermin olgunlaşması, akrozom reaksiyonu, sperm hareketliliğinin kontrolü, spermin yumurtaya doğru yönelmesi ve osmolaritenin düzenlenmesi basamaklarında rol aldığı düşünülmektedir (3). Fare ve insan erkek infertilite vakaları, bazı iyon kanallarının eksikliği veya mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Fakat, anormal sperm parametrelerine sahip infertil hastalardaki iyon kanal reseptörlerinin moleküler dinamiği hakkında çok az şey bilinmektedir.

Çalışmamızda normozoospermik örneklerle karşılaştırıldığında; özellikle astenozoospermia olmak üzere sperm anormalileri bulunan erkeklerde, iyon kanallarının mRNA ekspresyonlarında önemli farklılıklar gözlemlendi.

Kalsiyum kanalları; spermde bulunan klor, potasyum, sodyum ve asetilkolin gibi iyon kanalları içerisinde en önemlisidir. Bugüne kadar sperm baş ve kuyruğunda tespit edilen iyon kanallarının büyük çoğunluğu kalsiyum kanallarıdır (148). Kalsiyum her türlü hareketin başlaması için önemli bir iyondur (150). Motilite, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu; temel olarak sinyal iletimi, sinyal taşıyıcıları, adenozin trifosfatazlar (ATPase'lar) ve kalsiyum kanallarının çoklu sistemleri aracılığıyla Ca^{+2} un sitoplazmik konsantrasyonu tarafından düzenlenir (119). Erkek germ hücrelerinde yapılan patch-clamp uygulamalarında T-tipi akımların aktivitesi doğrulanmıştır (151). Çalışmamızda akrozom reaksiyonu (AR) ve sperm motilitesi gibi farklı hücresel işlevlerde etkili olan beş adet VDCC ve dört adet SOC'yi araştırdık (152).

Akrozom reaksiyonu (AR); spermin yumurtaya penetrasyonundan önce spermde gerçekleşmesi gereken bir olaydır. Akrozom spermatogenez sırasında, golgi cisimciğinden köken alan, spermatozoanın plazma membranında bulunan yapıdır ve sperm baş kısmının 2/3'lük kısmını oluşturmakla beraber akrozin ve hyaluronidaz enzimlerini içerir. Sperm kapasitasyon yeteneğini kazandıktan sonra zona pellucida penetrasyonunu gerçekleştirmesi için öncelikle akrozom reaksiyonunun indüklenmesi gerekir. Spermin zona pellucidaya bağlanması sırasında, sperm başındaki özellikli reseptörler aktive olarak eksositoz gerçekleşir. Ca^{+2} gerektiren ekzositozun; voltaj bağımlı Ca kanalları aracılığıyla gerçekleşen, harici Ca^{+2} akışıyla bağlantılı olduğu öne sürülmüştür. Spermin yumurtayla temas

sürecinde, yumurtanın zona pellusidasından ZP3 gibi kimyasal sinyallerin pH ve membran depolarizasyonunun artışı indüklediği ve sonrasında sperm membranında aktive olmuş VDCC'ler aracılığıyla; Ca^{++} 'un geçiş yaptığı tespit edilmiştir (152,153).

Memeli sperminde VDCC'ler AR'deki öneminden dolayı farmakolojik, elektrofizyolojik veya moleküler biyolojik araçlar kullanılarak detaylı olarak araştırılmıştır. Bazı farmakolojik çalışmalara göre; L-tipi kanalların AR' de rol aldığı belirlenmiştir.

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonun yükselmesi akrozom reaksiyonu, kapasitasyon, kemotaksis ve hiperaktif motilite ile kendini gösteren flagellar fonksiyondaki değişikliklerde gereklidir. Ca^{+2} 'daki artışlar spermin flagellar dalga formunu düzenlemekte ve asimetrik bükülmesini desteklemektedir (154).

CACNA1E alt birimleri, fare sperm flagellasının proksimal parçasında lokalizedir (155). CACNA1E nakavt fareler; fertil olmasına rağmen, bu farelerden alınan spermin yüzme davranışında lineerliğin arttığı gösterilmiştir, böylece voltaj kapılı kanal alt birimlerinden CACNA1E'nin sperm motilitesinde rol oynayabileceği ifade edilmiştir (156). CACNA1E ekspresyonu, fare sperm ana parçasının proksimal bölümünün dorsal ve ventral kenarları boyunca tespit edilmiştir ve asimetrik flagella hareketi için gerekli olan Ca 'un içeri akışını kontrol edebileceği öne sürülmüştür (157). Bilgisayar destekli sperm hareketliliği deneyi; doğrusal hız ve doğrusallığın CACNA1E+/+ spermdekine göre CACNA1E-/- spermde daha fazla olduğunu göstermiştir (156). Bununla birlikte, CACNA1E kanalı eksikliğinin bulunduğu bu fenotip sadece belirli in vitro koşullar altında belirgindir ve CACNA1E eksik erkek fareler fertildir. Bu durum

akla CACNA1E'nin sperm motilitesi için gerekli olmayabileceğini getirmektedir (158). Çalışmamızda; CACNA1E mRNA ifadesi ve hareketlilik arasında negatif bir ilişki tespit ettik. Bu bulgu CACNA1E -/- farelerdeki artmış sperm hızı ve doğrusallıkla tutarlı görünmektedir. CACNA1E ekspresyonun; sperm şekil bozukluğu mevcut olan teratozoospermi hastalarında azaldığı ve oligoastenoteratospermi hastalarında da arttığı tespit edildi. Fakat motilite bozukluğu olan astenozoospermi hastalarında; gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Yaptığımız çalışmada CACNA1B ekspresyonun, sperm hücrelerinin sayıca azaldığı oligozoospermi hastalarında; arttığı ve spermde hareket düşüklüğü olan astenozoospermi hastalarında da azaldığı tespit edildi.

Fare spermatogenik hücrelerinde yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanallarının yanı sıra, düşük voltajla aktive olan T-tipi Ca kanallarının varlığı da elektrofizyolojik olarak tespit edilmiştir. Fare sperminde yapılan çalışmalar sonucu T-tipi Ca kanalları olan CACNA1G, CACNA1H ve CACNA1I iyon kanallarının varlığı tespit edilmiştir ve bu kanalar sperm kamçısında lokalizedir. Bununla birlikte T-tipi CACNA1G, CACNA1H ve CACNA1I alt birimleri insan sperminde kamçının yanı sıra, akrozomal bölgede de mevcuttur (159,160).

Bu çalışmada, anormal sperm parametrelerine sahip olan tüm gruplarda; kontrol grubuna göre CACNA1G'de azalma ve CACNA1H'de ise artma saptanmıştır. Ayrıca TRPC1 dışında kalsiyum kanalı gen ekspresyonu ve sperm miktarı arasında; genel olarak negatif bir korelasyon bulunmuştur. Son zamanlarda, sperm anormalileri olan infertil erkeklerde; kalsiyum düzenlenmesiyle ilgili bazı yolakların düzensizliği rapor edilmiştir. Wang ve

arkadaşları varikozel (VC) hastalarından alınan anormal spermelerde; CACNA1H ve CACNA1G'nin mRNA ekspresyonlarının belirgin şekilde düşük olduğunu bildirmişler ve bu değişikliklerin VC hastalarında azalmış semen kalitesinin ve dolayısıyla infertilitenin nedenlerinden biri olabileceğini öne sürmüşlerdir (161). Anandamid, CACNA1G, 1H ve 1I'yi içeren T tipi kalsiyum kanallarının blokeridir ve submikromolar konsantrasyonlarda doğrudan T-kanallarında hareket eden ilk endojen ligand gibi gözükmektedir. Seminal plazma anandamid düzeyleri; normozoospermik erkeklerle karşılaştırıldığında astheozoospermi veya oligoasthenoterozoospermi olan erkeklerde önemli ölçüde daha düşük olduğu bulunmuştur (162). Tao ve arkadaşları spermatogenik T-tipi kalsiyum kanallarının tirozin kinazdan bağımsız inhibisyonu sonucu CACNA1E por-oluşturan $\alpha 1E$ altbiriminden yoksun spermde; değişmiş Ca^{2+} yanıtları, azalmış AR ve güçlü bir sub-fertilite fenotipi tespit etmişlerdir (156). Aksine, T-tipi Ca^{2+} kanalları CACNA1G ve CACNA1H eksikliği olan fareler fertil olduğundan, VGCC kanallarının sperm fizyolojisi için gerekli olmadığı ya da ek görevlere sahip olabileceği önerilmiştir (152,163).

T-tipi Ca kanallarında genisteinin inhibitör etkisi, sperm akrozom reaksiyonu ve spermin zona pellisudaya bağlanmasının inhibisyonuyla sonuçlanan hiperpolarize bir değişim ile ilişkilidir. Tao ve arkadaşları transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinde genisteinin CACNA1G ve CACNA1H' yi inhibe ettiği, ancak CACNA1I' e etki etmediğini tespit etmişlerdir. T- tipi Ca^{+2} kanalları, akrozom reaksiyonu ve spermin hareketi gibi erkek üreme sisteminin anahtar bileşenleri olduğundan; genisteinin anti-infertilite etkilerini açıklayabilir (164).

AR; DHP, pizomid ve nikel gibi çeşitli Ca_v3 kanalı antagonistleri tarafından inhibe edilebilir. Örneğin ürokortin, fenvalerat ve gossypol gibi moleküllerin spermatogenik hücrelerde T türü akımları inhibe ettiği gösterilmiştir ve böylece bu iyon kanalları kontraseptif uygulamalarda kullanılabilir (165).

Memeli Geçici Reseptör Potansiyeli (TRP) iyon kanalı süper ailesi; TRPC (kanonik), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPML (mucolipid) ve TRPP (polikistin) olmak üzere 6 alt familyaya ayrılarak 28 üyeden oluşur. Birçok TRP proteini duyuşal fizyoloji, varikosel ve erkek infertilitesi gibi süreçlerde kritik rol oynamaktadır (100).

T tipi Ca^{+2} kanalları aracılığıyla kalsiyumun değerlerindeki geçici artışlar; sperm kapasitasyonunu başlatmak için gerekli olsa da, akrozom reaksiyonu; TRPC kanalları aracılığıyla oluşabilecek sürdürülebilir Ca^{+2} girişini gerektirir. Bunun yanı sıra, kapasitasyon sırasında gözlenen Ca^{+2} artışından sorumlu iyon taşıma sistemlerinin kimliği tam olarak bilinmemektedir. T-tipi Ca_v kanallarının yanı sıra, TRP ailesinin birkaç üyesi de spermde tespit edilmiştir ve kapasitasyon sırasındaki rolü araştırma konusudur. TRPC kanallarının; normal fizyolojik fonksiyon için gerekli olan sürdürülebilir Ca^{+2} yükselmesinden sorumlu olan, store-operated kanallar için aday moleküler birimler olarak hareket edebileceği bildirilmiştir. TRP ve siklik nükleotid-kapılı (CNG) kanallarının ekspresyonu; hem spermatogenik hücrelerde hem de olgun spermelerde tespit edilmiştir (166,167).

Bu kanallar heterojen bir şekilde bu hücrelerde dağılmıştır, bu nedenle farklı fonksiyonlara katılabileceği düşünülmektedir. Sperm tarafından termo ve kemo algılamanın, yumurtaya doğru yolculuğu sırasında spermere rehberlik ettiği

bilinmektedir. Bu sinyalizasyonda TRPC ailesinin rolü üzerinde durulmuştur; ancak her üyenin tam rolü ve ligand /sinyal molekülünün tespit edilmesi gerekmektedir. TRPC kanalları, altı transmembran birimden meydana gelmiştir ve yapılan çalışmalarda spermde TRPC1, 3, 4 ve 6 olmak üzere dört tipi tanımlanmıştır (103). Yapılan çalışmalar TRPC2 nakavt farelerin fertil olması nedeniyle, birden fazla TRP kanalının etki edebileceğini ve TRPC kanallarının spermde heteromultimer şeklinde rol alabileceğini akla getirmektedir (168). TRPC kanallarının dağılımı; insan ile fare arasında önemli derecede farklılık gösterir, ancak TRPC1, 3, 4 ve 6'nın insan sperm kamçısında tespit edilmesi motilitede rol oynayabileceğini düşündürmektedir (103). TRPC kanal aktivitesinin farmakolojik baskılanması, insan sperminin hareketliliğinde bozukluğa neden olmaktadır. AR'de görevli olan TRP kanallarının nasıl aktif hale geldiği sorusunun hala cevabı bilinmemektedir. TRPC6 insan sperminde postakrozomal bölgede lokalizedir ve akrozom reaksiyonunda yer alabileceği düşünülmektedir. TRPC1 ve TRPC3 flagellum ile sınırlandırılır ve olgun spermin kaudal epididimden salınmasından dolayı diğer Ca^{+2} girişi kanalları ile uyumlu olarak sperm aktivasyon sürecinde yer alabilir. Aynı zamanda TRPC3 epididimde sıvı oluşumunda da rol oynamaktadır (100).

Fare sperm akrozom bölgesinde TRPC1, 2 ve 5 yer almaktadır. Farelerde TRPC2'nin ZP3 tarafından indüklenmiş AR ile ilişkili olduğu bulunmuştur ve bir anti-TRPC2 antikorunun uygulanmasıyla fare sperminde ZP-kaynaklı akrozom reaksiyonu ve yumurta kaplama proteinleri tarafından oluşturulan devamlı Ca^{+2} tepkisi azalmıştır. Bununla birlikte, TRPC2'den (aynı zamanda TRPC1-7, TRPV1-4, TRPA1, TRPM1-4 ve TRPM8 kodlayan genler gibi) yoksun farelerde,

sperm fizyolojisi veya erkek infertilitesinde belirgin kusurlar olduğu gözlenmiştir (169).

Astenospermide; TRPC1 ekspresyonunda belirgin bir azalma dışında, anormal sperm parametrelerine sahip tüm infertil hastalarda; artmış TRPC3 ve TRPC1 ekspresyonu saptandı. TRPC6 ise sadece oligoastenospermia grubunda anlamlı olarak artmıştır. İnsan sperm TRPC iyon kanallarının farmakolojik inhibitörleri, motiliteyi konsantrasyon ve zamana bağlı olarak azaltmıştır (103). Ru ve arkadaşları; spermin Pyr3 (TRPC3 antagonisti) ile inkübe edildiğinde hücre $[Ca^{2+}]$ i seviyelerinin belirgin şekilde arttığını bildirmişlerdir; bu değişim sperm mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir azalma ile beraber sperm $[Ca^{2+}]$ i mobilizasyonu yoluyla sperm fonksiyonunu değiştirmiştir (170). TRPC1 ve TRPC6 spesifik blokerlerin; sperm motilitesi ve akrozom reaksiyonu üzerindeki etkileri, insan sperm hücresi üzerinde çalışılmamıştır.

Epididim içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunun yüksekliği, sperm hücre zarındaki kalsiyum kanalı olan TRPV6 kanalını inaktif hale getirir. TRPV6 kanalının, fazla kalsiyumdan dolayı bozulan açılıp-kapanma düzeni, hücre içerisine gereğinden fazla kalsiyum girmesine ve böylece spermin fonksiyonunun bozulmasına sebep olur. Farelerle yapılan testlerde, kalsiyum miktarının normal seviyeye düşürülmesi durumunda, TRPV6 kanallarının tekrar düzenli çalışmaya ve buna bağlı olarak da hücre içerisine kontrollü kalsiyum iyonu alındığı görülmüştür. Trpv6 $-/-$ farelerde cauda epididimiden türetilen spermlerin hareketliliği, döllenme kapasiteleri ve canlılığı önemli ölçüde azalırken Ca^{+2} konsantrasyonları Trpv6 $-/-$ erkeklerin kaudal sıvısında anormal derecede yüksek olduğu bulunmuştur (171). Bu veriler ışığında, bazı potansiyel mekanizmalar

sperm anormalliği olan hastada kalsiyum iyon kanalının, anormal ekspresyonundan sorumlu olabilir. Teratospermik ejakülatlardan elde edilen anormal spermelerde; özellikle kalsiyum iyon kanallarının kontrol ettiği kapasitasyon ve akrozomal reaksiyonda azalma olduğu bildirilmiştir (163). Biz sperm hücresindeki kalsiyum iyon kanalı ekspresyonundaki değişikliklerin, hücre içi kalsiyum seviyesini $[Ca^{2+}]$ etkileyerek motilite ve akrozom reaksiyonunun bozulmasına neden olabileceğini önermekteyiz. Önceki yayınlar, $[Ca^{2+}]$ 'un fare sperm flagella'sındaki dynein aktivitesinin düzenlenmesinde yer aldığını ve $[Ca^{2+}]$ 'sürekli yükselmesinin memeli sperminin hareketliliğini baskılamak için önemli olabileceğini bildirmektedir. AR başlatılması sırasında, VDCC'lerin açılmasıyla membran depolarizasyonu sonrasında Ca^{2+} akışı aracılığıyla sitoplazmadaki $[Ca^{2+}]$ 'da geçici bir yükselme tetiklenir. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki bu ilk artış, hücre içi habercileri aktive ederek intra-akrozomal depolardan kalsiyum iyonlarını serbest bırakarak plazma zarında SOC'nin açılmasına yol açar. Sperm flagellumunda farklı TRPC kanallarının işlevi bilinmemekle beraber, motilitenin (aktivasyon) başlaması ve hiperaktivasyon gibi döllenme için önemli olaylara katılabilecekleri düşünülmektedir (126). Mevcut çalışma, VDCC ve SOC kalsiyum kanallarının yüksek hücre içi kalsiyum düzeyi aracılı motilite ve akrozom reaksiyonu gibi kalsiyumla düzenlenen sperm aktivitelerinin bozulmasına neden olabilecek adaylar olacağını önermektedir.

Progesteron, prostaglandin (E1) ve asetilkolin (ACh) içeren bazı endojen ajanlar in vitro akrozomal ekzositozu tetikleyebilmesine rağmen, AR'nın birincil in vivo başlatıcısının; ZP3 (veya ZPC) olarak adlandırılan bir ZP glikoprotein bileşeni olduğuna düşünülmektedir. ZP ile başlatılan AR ve AR ile ilişkili

kompleks sinyal olayları sırasında aktive edilen sperm plazma zarındaki reseptörlerin ve kanalların doğası hala araştırılmaktadır. Sperm fonksiyonunda; nikotinik asetil kolin reseptörleride dâhil olmak üzere çeşitli nöronal reseptörler etkilidir. Omurgalılarda şimdiye kadar 10α , 4β ve birer adet ϵ , δ , γ nAChR subunitleri tanımlanmıştır. İnsan sperminde orta parça, boyun ve post akrozomal bölgelerde ekspresyonu lokalize olan $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ ve $\beta 4$ nAChR subunitleri ifade olmaktadır (172). İnsan sperminde farklı nAChR alt tiplerinin farklı bölgelerde bulunması, sperm fonksiyonunu değişik yönlerde etkileyebileceğini akla getirmektedir. Memeli fertilizasyonunda bahsedildiği gibi önemli adımlardan biri akrozom reaksiyonudur (AR) ve oositi çevreleyen zona pellucida (ZP) ve glikoprotein matrisi ile sperm başı temas ettiğinde gerçekleşen ekzositotik olaydır. Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChRs) de dâhil olmak üzere birçok nöronal reseptör sperm fonksiyonuna dahil edilmiştir. ACh'nin mikromolar konsantrasyonları; kapasitan insan ve fare spermlerinde AR'ı başlatabilir ve nACh antagonistleri (α -bungarotksin (α -BTX), α -konotoksin IMI (α -CTX IMI ve methyllycaconitine (MLA)) ACh-başlangıçlı AR'yi inhibe etmektedir. ACh molekül sinyalizasyonu nikotinik ve muskarinik olmak üzere iki farklı tipte reseptörle etkileşir. İmmünohistokimyasal çalışmalar insan sperminde muskarinik AChR'lerin varlığını göstermektedir. Muskarinik AChR'lerin antogonisti olan QNB'nin $50\mu\text{M}$ 'lık uygulamasının, fare sperminde ZP-başlangıçlı AR'yi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Fakat insan sperminde ACh tarafından başlatılan AR'ye etki etmediği muskarinik tip ACh'lerin ACh tarafından başlatılan AR'de rol oynamadığı öne sürülmüştür (173). Mevcut çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CHRNA3 ve 5 tüm gruplarda artarken, CHRNA9 sadece OAT

grubunda artmıştır. CHRNB4’ünde astenozoospermi dışındaki tüm gruplarda kontrole kıyasla arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar oldukça ilginçtir, çünkü normalde özellikle astenozoospermi grubunda motilite ile ilişkili iyon kanallarının ekspresyonunda azalma olacağı düşünülmektedir. Artan nAChR reseptör ekspresyonu, sperm anormalisine sahip infertil erkekte ACh veya AcHE ekspresyon düzeyinin azalmasına yanıt olabilir. Bununla birlikte, sperm anormallikleri olan infertil erkeklerde ACh veya AcHE düzeylerinin araştırıldığı çalışmalar bildirilmemiştir. Fakat alzheimer hastalığındaki (AD) bireysel kolinerjik bazal önbeyin (CBF) nöronları, hipokampal nöronlar, astrositler ve periferik kan lökositlerinde; hem $\alpha 7$ nAChR mRNA’sında hem de protein ekspresyon seviyelerinde artma olduğu rapor edilmiştir. Kanıtlar, artmış $\alpha 7$ nAChR ifadesinin AD başlangıcında bazokortikal kolinerjik aktiviteyi sürdürmek için bir tampon görevi üstlenebileceğini önermektedir (174). Bu noktada, artmış AChR ekspresyonu anormal nAChR etkileşimleri tarafından telafi edilen dengeleyici bir yanıt olarak ortaya çıkabilir. Kolinerjik fonksiyon bozukluğunun, infertil erkeklerde hücre dejenerasyonuna veya sperm aktivitelerinin bozulmasına neden olarak, sperm anomalilerine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

İnsanda folliküler sıvı sperm hareketlerinin kazanılmasında düzenleyici rol oynar ve akrozom reaksiyonunu tetikler. Genital yol boyunca spermin foliküler sıvı ile teması sonrası progesteron etkin rol oynar. Qi-Xian Shi ve arkadaşının yapmış olduğu çalışmada progesteronun kapasitan fare spermatozoada akrozomal ekzositozu uyardığı tespit edilmiştir. Ancak bunun dışında birden fazla mekanizma reaksiyonda etkilidir. Spermatozoada GABA_A reseptörlerinin varlığı

belirlenmiştir. GABA, esasen klorüre geçirgen GABA (A) reseptörü vasıtasıyla etki ederek insan spermatozoasındaki akrozom reaksiyonunu uyarmaktadır. Alfa1 subunit immünoaktivitesi spermatogonia, spermatosit ve round spermatidlerin çekirdeğinde tespit edilmiştir (175). Testislerde spermatogenezin homeostazını korumak için spermatogonial kök hücre (SSC) çoğalmasının negatif düzenleyicisi olarak SSCs’lerde; GABA sistemi etkindir (176). İki farklı tipte reseptör olmak üzere GABA α ve GABA β ; klor ve kalsiyum iyon transportu ile AR’unu uyarır ve GABA α - β reseptör antagonistleri AR inhibisyonunu sağlamaktadır. GABA α reseptör antagonisti ‘‘biculline’’ ve GABA β reseptörü antagonisti ‘‘saclofen’’ ile yapılan çalışmalarda folliküler sıvı ile indüklenen AR’un inhibisyonu gerçekleşmiştir (177). Mevcut çalışmada teratospermik erkeklerde ekspresyonun azalması dışında, sperm anormalileri olan infertil hastalarda; GABAA ekspresyonunda herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Ancak ilginçtir, seminal plazma GABA düzeyi veya sperm hacmi düzenlemesindeki rolü günümüze kadar sperm anormalilerinde biyokimyasal yöntemlerle araştırılmamıştır.

Testiste üretilen sperm, sperm hücrelerini yıkayan osmolite bakımından zengin bir sıvı salgılayan epididimde olgunlaşmaya girer. Bu hücreler ejakulasyondan sonra, aksesuar bezi sıvılarının hipo-osmosal ortamlarıyla ilk karşılaştıklarında ve daha sonra kadın dölyolu içinde hacmini korumak zorundadırlar. Spermatozoa; dişi üreme kanalına boşalmasıyla bir hipo-ozmotik ortamla karşılaşır ve bu durumda hücre hacminin düzenlenmesi hücre fonksiyonu için gereklidir. Yani spermatozoa epididimde yaşanan kademeli hiper-ozmotik değişikliklere maruz kalmaktadır. Bu nedenle, hücre hacmini düzenleme sperm işlevi için fizyolojik önem taşımaktadır. Potasyum kanalları sperm hacminin

düzenlenmesinde rol almaktadır. Patch clamp çalışmaları ve farmakolojik çalışmalar sonucu; insan sperm hücresinde KCNA5, KCNE1 ve KCNK5 iyon kanallarının varlığı tespit edilmiştir. KCNE1; sperm boyun ve kuyruk kısmında lokalizedir ve hem protein hem de mRNA ekspresyonu belirlenmiştir. KCNE1, KCNA5 ve KCNK5 potasyum iyon kanallarının üçünün de sperm hücre hacim düzenlenmesinde görev aldığı belirlenmiştir. Yeung ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre; sperm RNA'sının kantitatif RT-PCR analizi sonucu ekspresyonu miktarları KCNE1 > KCNA5 > KCNK5 olarak belirlenmiştir ve bu sonuca göre KCNE1 iyon kanalının, insan spermatozoasında düzenleyici hacim azalmasına katılan başlıca K-kanalı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Klorür kanalları ailesinden CLCN3'ün de hücre hacmi düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür. CLCN3 iyon kanalı sperm hücrelerinde tespit edilmiştir ve sperm hücrelerinde CLCN3 ekspresyonu özellikle boyun, orta parça ve tüm sperm kuyruğu boyunca lokalizedir. Hacim duyarlı klorür kanalı için bir başka moleküler aday CLNS1A'dır. Kanalin sitosolik düzenleyici protein olup olmadığı hala tartışma konusudur.

Spermatozoa'daki düzenleyici hacim azalmalarından muhtemel sorumlu iyon kanalları; voltaj kapılı potasyum kanalları (özellikle Kv1.5 (KCNA5), minK (KCNE1) ve TASK2 (KCNK5) ve klorid kanalları CLCN3 ve CLNS1A'dır (178). Bizim çalışmamızda, oligoastenoterospermi grubunda; KCNE1'in önemsiz derecede artışı haricinde, kontrolle kıyaslandığında tüm gruplarda; tüm K⁺ kanallarında azalmış ekspresyon tespit edilmiştir. Teratospermi grubunda KCNA5, KCNE1, KCNK5 için ve oligospermide ve astenospermide KCNK5 için bu düşüşler önemli seviyededir. CLCN3 ve CLNS1A; hacim duyarlı Cl-kanalları,

sperm hücresinin fizyolojik hipo-ozmotik uyarımı ile hacim düzenlemesini desteklemektedir. CLCN3 ekspresyonu; oligoasteospermide anlamlı derecede artarken, astenospermide belirgin oranda azalmıştır ve CLNS1A ekspresyonunda; teratospermide anlamlı olarak azalmıştır. CLNS1A aslında murin spermelerinde görülen en güçlü adaydır, erkeklerde ekspresyonu sadece sporadiktir (178). Ancak, çalışmamızda qRT-PCR ile tüm gruplarda CLNS1A ekspresyonu tespit edildi. K^+ ve Cl^- iyon kanallarının azalmış ekspresyonuna bağlı olarak; hacim regülasyonu ve epididimal osmolit alımı mekanizmalardaki hatalar, sperm baş hacminde anormal bir artışa ve infertiliteye yol açan hareket şekillerinin değişmesine ve ileri progresyona zarar veren sperm kuyruğunun angülasyonuna neden olabilir.

Bu çalışmada, infertil erkeklerde sperm anormalisine neden olan mekanizmalar hakkında yeni bilgiler elde edilmiştir. Yapılan araştırmada, ilk defa iyon kanalı ekspresyon değişikliklerini gösterdik. CACN1H, TRPC1, TRPC3 ifadesinde artış ve CACNA1G'nin ifadesinde azalma; insan sperminde hücre içi kalsiyum seviyelerine bağlı olabilir. $[Ca^{2+}]_i$ dengesinde çok sayıda düzenleyici role sahip olan VDCC ve SOC kanalları etkili olabilir. Gelecekteki araştırmalar kalsiyum kanallarındaki ekspresyon değişikliğinin neden olduğu; spermdeki Ca^{2+} girişine etki eden mekanizmaları belirlemek ve sperm hücresel metabolizmasının düzenlenmesinde ve sperm motilitesi ile AR sırasında hücre dışı sinyallere cevap vermede; bu proteinlerin rolünün ne olduğuna yönelik olacaktır. Ayrıca hücre içi Ca^{2+} 'u yükselten hücre içi depolardan kalsiyum iyonlarını (Ca^{+2}) serbest bırakmak için, diğer taşıyıcıların katılımı göz ardı edilemez. Teratozoospermide; özellikle sperm hacim düzenlenmesinden sorumlu

Cl^- ve K^+ kanallarının azalmış ekspresyonu tespit edildi. Sperm hacim düzenlenmesinin başlıca yolları olarak; hacme duyarlı K ve Cl kanalları önerilmekle birlikte, çoğu inhibitörün insan ejakulat spermilerin RVD'sinde herhangi bir etkiye sahip olup olmadığı test edilmemiştir. Tüm sperm anormalliklerinde CHRNA reseptörlerinin upregülasyonunu anlamak, infertil hastalarda kolinerjik sistemin düzenlenmesini aydınlatılabilir. Her ne kadar iyon kanalı ekspresyon değişiklikleri sperm anomalilerini tetikleyen olayların altında yatan nedenlerden biri olsa da, sperm anomaliliği olan infertil erkeklerde ortaya çıkan motilite, akrozom reaksiyonu ve volum regülasyonunda bozulma ve iyon kanallarının aktivasyonundan sonra ortaya çıkan sinyal bağlamında bilgi elde edilmesi için; bu bulgularla ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu sinyalizasyonda iyon kanallarının rolünün tanımlanması, sperm fizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır ve doğurganlık veya doğum kontrolü gerçekleştirmek için fırsatlar sunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Coutton C, Satre V, Arnoult C, Ray P. Genetics of male infertility: the new players. *Medecine sciences: M/S* 2012; 28(5): 497-502.
2. Perdrix A, Travers A, Chelli MH, et al. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Human reproduction* 2011; 26(1): 47-58.
3. Zheng LP, Wang HF, Li BM, Zeng, XH. Sperm-specific ion channels: targets holding the most potential for male contraceptives in development. *Contraception* 2013; 88(4): 485-491.
4. 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.
5. Carrell DT, Liu L, Christensen G. Polyploidy in mouse embryos derived from in vivo and in vitro fertilization is dependent on the timing of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) injection. *Fertil Steril* 2007; 87: 1470-1472.
6. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Human Reproduction* 2003; 18(9): 1959-66.
7. Tanagho EA, McAninch JW. *Smith Genel Üroloji*. 17. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri 1999; 681-690.

8. Brosens I, Gordts S, Valkenburg M, Puttemans P, Campo R, Gordts S. Investigation of the infertile couple: when is the appropriate time to explore female infertility? Human Reproduction 2004; 19(8): 1689-92.
9. Rowe PJ, Comhaire F, Hargreave T, Mellows H. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1993.
10. Dr. Sinan Zeytinoglu. Seminal plazma ve spermatozoada lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktiviteleri. Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskisehir; Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1997.
11. Yaman S, Müftüoglu YZ, Anafarta K, Bedük Y. Erkek İnfertilitesi. Üroloji, Ankara, Günes Kitabevi 1990: 483-508.
12. Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. Obstetrics & Gynecology 2004; 103(1): 51-6.
13. Paker S. Histoloji. 2. Baskı, Bursa; Uludag Üniversitesi Basımevi, 1993.
14. Marieb EN. Transparency Acetates: Human Anatomy and Physiology. 5th Edition, Benjamin Cummings: San Francisco 2001: 567-588
15. Çimen A. Anatomi, 6. Basım, Bursa; Uludağ Üniversitesi Matbaası; 1996.
16. Jensen CE, Wiswedel K, McLoughlin J, van der Spuy Z. Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. Fertility and sterility 1995; 64(6): 1189-1197

17. Junqueira CL, Carneiro J, Kcley RO. Basic Histology. Aytekin Y. (Çeviri Editörü). 8. Basım, İstanbul: Barış Kitabevi 1993.
18. Ganong WF. Review of Medical Physiology. 16th Edition, Appletoia and Lange: California 1993: 387-408.
19. Korkud G, Karabay K. Üroloji. İstanbul Ü. Cerrahpasa Tıp Fakültesi Yayınları 1985: 59-65.
20. Gallardo E, Simon C, Lewy M, et al. Effect of age sperm fertility potential: oocyte donation as a model. Fertility Sterility 1996; 66(2): 260-264.
21. Mladenovic I, Micic S, Papic N, Genbacev O, Marinkovlc B. Sperm morphology and motility in different age populations. Archives of andrology 1994; 32(3): 197-205.
22. Seftalioglu A. Genel insan embriyolojisi. Ankara: Ankara Ü. Basımevi 1991: 11-17.
23. Davis RO, Gravance CG. Consistency of sperm morphology classification methods. Journal of andrology 1994; 15(1): 83-91.
24. Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R, Sabanegh E. New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. International journal of urology 2010; 17(10): 839-47.

25. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Basaklar C. (Çeviri Editörü). 6. Baskı. Ankara: Williams-Wilkins Company-Palme Yayıncılık 1993.
26. Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 8. Baskı, Ankara: Meteksan A.Ş. 1993:1102- 1132.
27. Gartner PL, Hiatt LJ. Color textbook of histology. W.B. Saunders company 1997: 403-421.
28. Hancock AD, de Kretser DM. The axonemal ultrastructure of spermatozoa from men with asthenospermia. Fertility and sterility 1992; 57(3): 661-664.
29. Boyraz G. Açıklanamayan İnfertilite Nedeniyle İntrauterin İnseminasyon Uygulanan Hastalarda Ejakülattaki Preapoptotik Sperm Oranının İntrauterin İnseminasyon Başarısındaki Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi 2013.
30. Carreras A, Mendoza C. Zinc levels in seminal plasma of fertile and infertile men. Andrologia 1990; 22(3): 279-83.
31. Bibbins PE, Ward JB, Lipshultz LI, Hokanson JA, Legator, MS. Incidence of sperm with two fluorescent bodies in men with impaired fertility. Fertility and sterility 1992; 57(2): 402-408.

32. Arce JC, De Souza MJ, Pescatello LS, Luciano AA. Subclinical alterations in hormone and semen profile in athletes. *Fertility and sterility* 1993; 59(2): 398-403.
33. Gonzales FG, Kortebani G, Mazzolli AB. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertility and sterility* 1992; 57(5):1058-1065.
34. Bostofte E, Bagger P, Michael A. Fertility prognosis for infertile men: results of follow-up study of semen analysis in infertile men from two different populations evaluated by the cox regression model. *Fertility and sterility* 1990; 54(6): 1100-6.
35. Cooper TG, Weidner W, Nieschalg. The influence of Inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal fructose and citric acid. *Int J Androl* 1990; 13: 336-339.
36. Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM. Variation of semen measures within normal men. *Fertility and sterility* 1985; 44(3):396-400.
37. Singer R, Sagin M, Levinsky H, Allalouf D. Andrological parameters in man with high sperm counts and possible correlation with age. *Archives of andrology* 1990; 24: 107-111.
38. Jequier AM, Crich JP. Semen analysis: a practical guide. Blackwell Scientific Publications; St. Louis, USA, Blackwell Mosby Book Distributors 1986: 1-145.

39. Alexander NJ. Male evaluation and semen analysis in gynecology and obstetrics. Saunders; Michigan 1983: 460-482.
40. Spratt DI, Carr DB, Merriam GR, et al. The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1987; 64(2): 283-91.
41. Grigороva M, Punab M, Ausmees K, Laan M. FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. Human reproduction 2008; 23(9): 2160-6.
42. Grigороva M, Punab M, Poolamets O, et al. Increased Prevalance of the -211 T allele of follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2010; 95(1): 100-8. , 95(1), 100-108.
43. Castro-Magana M, Bronshter B, Angulo MA. Genetic forms of male hypogonadism. Urology 1990; 35(3): 195-204.
44. Veldhuis JD, Dufau ML. Estradiol modulates the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. J Clin Invest 1987; 80(3): 631-8.
45. Aribarg A, Zhang GY, Cao J, et al. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. Fertility and Sterility 1996; 65(4): 821-9.

46. Freeman DA. Steroid hormone-producing tumors of the adrenal, ovary, and testes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 1991; 20(4): 751-66.
47. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT. Obesity and male reproductive potential. *Journal of andrology* 2006; 27(5): 619-26.
48. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of andrology* 2006; 27(3): 450-2.
49. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92(3): 762-70.
50. Krausz C, Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: update, 2006; *Front Biosci* 2006; 11: 3049-61.
51. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men *Nature genetics* 2001; 29(3): 279-86.
52. Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A, et al. Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; 84(10): 3660-5.

53. Griffin JE. Androgen resistance-the clinical and molecular spectrum. *New England Journal of Medicine* 1992; 326(9): 611-8
54. von Eckardstein S, Syska A, Gromoll J, et al. Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; 86(6): 2585-90.
55. Johnson L, George FW, Neaves WB, et al. Characterization of the testicular abnormality in 5 alpha-reductase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1986; 63(5): 1091-9.
56. Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *New England Journal of Medicine* 1994; 331(16): 1056-61.
57. Tapanainen JS, Aittomäki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT, et al. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nature genetics* 1997; 15(2): 205-6.
58. Elsawi MM, Pryor JP, Klufio G, Barnes J, Patton MA. Genital Tract function in men with Noonan syndrome *Journal of medical genetics* 1994; 31: 468-70.
59. Rutland J, De long RU. Random ciliary orientation. A cause of respiratory tract disease. *New England Journal of Medicine* 1990; 323 (24): 1681-4.
60. Osegbe DN, Akinyanju OO. Testicular dysfunction in men with sickle cell disease. *Postgraduate medical journal* 1987; 63: 95-8.

61. Howards SS. Subclinical varicocele. Fertility and sterility 1992; 57(4): 725-6.
62. Pryor JL, Howards SS. Varicocele. The Urologic clinics of North America 1987; 14(3): 499-513.
63. Goldstein M, Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. The Journal of urology 1989; 142: 743-5.
64. Rajfer J, Handelsman DJ, Swerdloff RS, et al. Hormonal therapy of cryptorchidism: A randomized, double-blind study comparing human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone. Obstetrical & Gynecological Survey, 1986. 314(8): 466-70.
65. Raheem AA, Ralph D. Male infertility: causes and investigations. Trends in Urology & Men's Health 2011; 2(5): 8-11.
66. Rowley MJ, Leach D R, Warner GA, Heller CG. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. Radiation research 1974; 59(3): 665-78.
67. Beard CM, Benson Jr RC, Kelalis PP, Elveback LR, Kurland LT. The incidence and outcome of mumps orchitis in Rochester, Minnesota, 1935 to 1974. In Mayo clinic proceedings 1977; 52(1): 3-7.
68. Umapathy E. STD/HIV association: effects on semen characteristics. Archives of andrology 2005; 51(5): 361-5.
69. Hargreave TB. Genetic basis of male infertility. British Medical Bulletin 2000; 3: 650-71.

70. Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. Journal of endocrinological investigation 2000; 23: 684-90.
71. Chillon M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. New England Journal of Medicine 1995; 332: 1475-80.
72. Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. Novak Jinelokoji. 1996, Williams& Wilkins, Baltimore –Nobel, İstanbul,1998.
73. Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T,et al. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara: Güneş Kitabevi, 1996: 1287.
74. Glover TD, Barratt CL. Male Fertility and Infertility. 1. Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1999;162.
75. OK E. Asthenozoospermia olgularında semen analizi ve sperm defektlerinin faz kontrast mikroskobu ile ortaya konması. Doktora Tezi, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005
76. Cannon SC. Physiologic principles underlying ion channelopathies. Neurotherapeutics 2007; 4: 174-183.
77. Hille B. Potassium channels and chloride channels. Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates Inc, 1992.
78. Lozovaya N, R Min, V Tsintsadze, N Burnashev. Dual modulation of CNS voltage-gated calcium channels by cannabinoids: Focus on CB1 receptor-independent effects. Cell Calcium 2009; 46(3): 154-62.

79. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. Annual review of cell and developmental biology 2000; 16: 521-55.
80. Catterall WA, Few AP. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. Neuron 2008; 59(6): 882-901.
81. Khosravani H, Zamponi GW. Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. Physiological reviews 2006; 86(3): 941-966.
82. Kim DS, Jung HH, Park SH, Chin H. Isolation and characterization of the 5-prime-upstream region of the human N-type calcium channel α -1B subunit gene: chromosomal localization and promoter analysis. Journal of Biological Chemistry 1997; 272(8): 5098-5104.
83. Weiss N. The first disease connection for Cav2. 2 channels. Gen. Physiol. Biophys 2015; 34: 217-219.
84. Lacerda AE, Kim HS, Ruth P, et al. Normalization of current kinetics by interaction between the α 1 and β subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel. Nature 1991; 352 (6335): 527-30.
85. Powers PA, Gregg RG, Lalley PA, Liao M, Hogan K. Assignment of the human gene for the α -1 subunit of the cardiac DHP-sensitive Ca^{2+} channel (CCHL1A1) to chromosome 12p12-pter. Genomics 1991; 10(3): 835-839.
86. Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H. Ca^{2+} signalling between single L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in heart cells. Nature 2001; 410: 592-597.

87. Narayanan D, Xi Q, Pfeffer LM, Jaggar. Mitochondria control functional CaV1.2 expression in smooth muscle cells of cerebral arteries. Novelty and Significance. Circulation research 2010; 107(5): 631-641.
88. Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP, et al. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. Science 1993; 260 (5111): 1133–6.
89. Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, et al. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. Nature 1998; 391: 896-900.
90. Jagannathan S, Punt EL, Gu Y, et al. Identification and localization of T-type voltage-operated calcium channel subunits in human male germ cells: expression of multiple isoforms. Journal of Biological Chemistry 2002; 277(10): 8449-8456.
91. Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, et al. Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha-1I subunit. Journal of Biological Chemistry 2000; 275(22): 16530-16535.
92. Mittman S, Guo J, Emerick MC, Agnew WS. Structure and alternative splicing of the gene encoding alpha-1I, a human brain T calcium channel alpha-1 subunit. Neuroscience letters 1999; 269(3): 121-124.
93. Fraser LR. Minimum and maximum extracellular Ca²⁺ requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. Journal of reproduction and fertility 1987; 81(1): 77-89.
94. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Interaction between Ca²⁺ cyclic 3',5' adenosine monophosphate the superoxide anion and tyrosine

- phosphorylation in the regulation of human sperm capacitation. *Journal of andrology* 1998; 19(4): 434-443.
95. Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of Cell Science* 2004; 117(2): 211-222.
 96. Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004; 11: 1-12.
 97. Florman HM, Corron ME, Kim TDH, Babcock DF. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Developmental biology* 1992; 152(2): 304-14.
 98. Wakeling EN, Neal AP, Atchison WD. Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels. INTECH Open Access Publisher, 2012.
 99. Takahashi N, Kozai D, Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Frontiers in physiology* 2012; 3.
 100. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological reviews* 2008; 87(1): 165-217.
 101. Di A, Malik AB. TRP channels and the control of vascular function. *Current opinion in pharmacology* 2010; 10(2): 127-32.
 102. Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, et al. The Ca^{+2} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced

- apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action, The EMBO journal 2001; 20(11): 2690-701.
103. Castellano LE, Trevino CL, Rodriguez D, et al. Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. FEBS Letters 2003; 541(1-3): 69–74.
 104. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. Annu Rev Biochem 2007; 76: 387-417.
 105. Felix R. Molecular physiology and pathology of Ca²⁺-conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. Reproduction. 2005; 129(3): 251–262.
 106. Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. FEBS Letters 1995; 373 (3): 193-8.
 107. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, et al. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. Proceedings of the National Academy of Sciences 1995; 92(21): 9652-9656.
 108. Becker EB, Fogel BL, Rajakulendran S, et al. Candidate screening of the TRPC3 gene in cerebellar ataxia. The Cerebellum 2011; 10(2): 296-299.
 109. McKay RR, Szymeczek-Seay CL, Lievremon JP, et al. Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRP4 and TRP3. Biochemical Journal 2000; 351(3): 735-746.

110. Schaefer M, Plant TD, Stresow N, Albrecht N, Schultz G. Functional differences between TRPC4 splice variants. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(5): 3752-3759.
111. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005; 308 (5729): 1801–4.
112. Peng JB, Brown EM, Hediger MA. Epithelial Ca^{+2} entry channels: transcellular Ca^{+2} transport and beyond. *The Journal of physiology* 2003; 551(3): 729–40.
113. Barley NF, Howard A, O'Callaghan D, Legon S, Walters JR. Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2001; 280 (2): G285–90.
114. Hirota J, Ando H, Hamada K, Mikoshiba K. Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *Biochemical Journal* 2003; 372: 435-441.
115. Bosanac I, Alattia JR, Mal TK, Chan, J. Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand". *Nature* 2002; 420 (6916): 696-700.
116. Yoshida Y, Imai S. Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *The Japanese Journal of Pharmacology* 1997; 74 (2): 125–37.
117. Nucifora FC, Li SH, Danoff S, Ullrich A, Ross CA. Molecular cloning of a cDNA for the human inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1, and the

- identification of a third alternatively spliced variant. *Molecular brain research* 1995; 32(2): 291-296.
118. Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian journal of andrology* 2011; 13(3), 395-405.
 119. Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews* 2011; 91(4): 1305-1355.
 120. Johnson KJ, Sander T, Hicks AA, et al. Confirmation of the localization of the human GABAA receptor alpha 1-subunit gene (GABRA1) to distal 5q by linkage analysis. *Genomics* 1992; 14 (3): 745–8.
 121. Glatt K, Glatt H, Lalande M. Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics* 1997; 41(1): 63-69.
 122. Aurell C, Meizel WS. Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Developmental biology* 1993; 159(2): 679-90.
 123. Gault J, Robinson M, Berger R, et al. Genomic organization and partial duplication of the human alpha-7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics* 1998; 52(2): 173-185.
 124. Nasiripourdori A, Taly V, Grutter T, Taly A. From toxins targeting ligand gated ion channels to therapeutic molecules. *Toxins* 2011; 3(3): 260-293.
 125. Son JH, Meizel S. Evidence suggesting that the mouse sperm acrosome reaction initiated by the zona pellucida involves an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Biology of reproduction* 2003; 68(4): 1348-1353.

126. Bray C, Son JH, Meizel S. Acetylcholine causes an increase of intracellular calcium in human sperm. *Molecular human reproduction* 2005; 11(12): 881-889.
127. Eng CM, Kozak CA, Beaudet AL, Zoghbi HY. Mapping of multiple subunits of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor to chromosome 15 in man and chromosome 9 in mouse. *Genomics* 1991; 9(2): 278–82.
128. Groot Kormelink PJ, Luyten WH. Cloning and sequence of full-length cDNAs encoding the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits beta-3 and beta-4 and expression of seven nAChR subunits in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and/or IMR-32. *FEBS letters* 1997; 400(3), 309-314.
129. Chini B, Raimond E, Elgoyhen AB, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human alpha 7-nicotinic receptor subunit gene (CHRNA7). *Genomics* 1994; 19 (2): 379–81.
130. Gault J, Robinson M, Berger R. Genomic organization and partial duplication of the human alpha-7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics* 1998; 52(2): 173-185.
131. Lustig LR, Peng H. Chromosome location and characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha (alpha) 9 (CHRNA9) gene. *Cytogenetic and genome research* 2002; 98(2-3): 154-159.
132. Vincler M, Wittenauer S, Parker R, et al. Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(47): 17880-17884.

133. Yeung CH, Cooper TG. Potassium channels involved in human sperm volume regulation-quantitative studies at the protein and mRNA levels. *Molecular reproduction and development* 2008; 75(4): 659-668
134. Cooper TG, Yeung CH. Involvement of potassium and chloride channels and other transporters in volume regulation by spermatozoa. *Current pharmaceutical design* 2007; 13(31): 3222-3230.
135. Pardo LA, Stühmer W. The roles of K⁺ channels in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2014; 14(1): 39-48.
136. Chevillard C, Attali B, Lesage F, et al. Localization of a potassium channel gene (KCNE1) to 21q22.1-q22.2 by in situ hybridization and somatic cell hybridization". *Genomics* 1993; 15 (1): 243–5.
137. McPherson JD, Wasmuth JJ, Chandy KG, et al. Chromosomal localization of 7 potassium channel genes. *Cytogenet. Cell Genet* 1991; 58: 1979.
138. Philipson LH, Hice RE, Schaefer K, et al. Sequence and functional expression in *Xenopus* oocytes of a human insulinoma and islet potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991; 88(1): 53-57.
139. Reyes R, Duprat F, Lesage F, et al. Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(47): 30863-30869.
140. Goldstein SA, Bayliss DA, Kim D, et al. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacological reviews* 2005; 57(4): 527-540.

141. Bittner S, Bobak N, Herrmann AM, et al. Upregulation of K(2P)5.1 potassium channels in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2010; 68(1): 58-69.
142. Li WY, Wong FL, Tsai SN, et al. Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant, cell & environment* 2006; 29(6): 1122-1137.
143. Borsani G, Rugarli EI, Taglialatela M, Wong C, Ballabio A. Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics* 1995; 27(1): 131-141.
144. Taine L, Coupry I, Boisseau P, et al. Refined localisation of the voltage-gated chloride channel, CLCN3, to 4q33. *Human genetics* 1998; 102(2): 178-181.
145. Anguita J, Chalfant ML, Civan MM, Coca-Prados M. Molecular cloning of the human volume-sensitive chloride conductance regulatory protein, pICln, from ocular ciliary epithelium. *Biochemical and biophysical research communications* 1995; 208(1): 89-95.
146. Koboldt D. "A Promising New Drug for Cystic Fibrosis"
<http://massgenomics.org/2011/02/a-promising-new-drug-for-cystic-fibrosis.html>
147. Nagl UO, Erdel M, Schmarda A, et al. Chromosomal localization of the genes (CLNS1A and CLNS1B) coding for the swelling-dependent chloride channel I(Cln). *Genomics* 1996; 38(3): 438-441.

148. Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, et al. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 2006; 131(6): 977-988.
149. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 1994; 2(04): 371-372.
150. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995; 80(2): 259-268.
151. Arnoult C, Villaz M, Florman HM. Pharmacological properties of the T-type Ca^{+2} current of mouse spermatogenic cells. *Molecular pharmacology* 1998; 53(6): 1104-1111.
152. Escoffier J, Boisseau S, Serres C, et al. Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of $\text{CaV}3.1$ and $\text{CaV}3.2$ channels in sperm cells: an evaluation from $\text{CaV}3.1$ and $\text{CaV}3.2$ deficient mice. *Journal of cellular physiology* 2007; 212(3): 753-763.
153. De Blas G, Michaut M, Treviño CL, et al. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(51): 49326-49331.
154. Brokaw CJ. Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembranated sea urchin sperm flagella. *The Journal of Cell Biology* 1979; 82(2): 401-411.
155. Serrano CJ, Treviño CL, Felix R, Darszon A. Voltage-dependent Ca^{+2} channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. *FEBS letters* 1999; 462(1-2): 171-176.
156. Sakata Y, Saegusa H, Zong S, et al. $\text{Cav}2.3$ ($\alpha 1\text{E}$) Ca^{+2} channel participates in the control of sperm function. *FEBS letters* 2002; 516(1-3): 229-233.

157. Westenbroek RE, Babcock DF. Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel $\alpha 1$ subunits in sperm. *Developmental biology* 1999; 207(2): 457-469.
158. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, et al. Altered pain responses in mice lacking $\alpha 1E$ subunit of the voltage-dependent Ca^{+2} channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97(11): 6132-6137.
159. Treviño CL, Felix R, Castellano LE, et al. Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca^{+2} channels in mammalian male germ cells and sperm. *FEBS letters* 2004; 563(1-3): 87-92.
160. Chan HC, Wu WL, Sun YP, et al. Expression of sperm Ca^{+2} -activated K^{+} channels in *Xenopus* oocytes and their modulation by extracellular ATP. *FEBS letters* 1998; 438(3): 177-182.
161. Wang SP, Wang PT, Gao F, et al. Decreased mRNA expressions of T-type channel $\alpha 1H$ and $\alpha 1G$ in the sperm of varicocele patients and their implication. *Zhonghua nan ke xue*=National journal of andrology 2012; 18(4): 331-334.
162. Amoako AA, Marczylo TH, Marczylo EL, et al. Anandamide modulates human sperm motility: implications for men with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *Human Reproduction* 2013; 28(8): 2058-2066.
163. Stambouliau S, Kim D, Shin HS, et al. Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the $CaV3.1$ ($\alpha 1G$) calcium channel: $CaV3.2$ ($\alpha 1H$) is the main

- functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. *Journal of cellular physiology* 2004; 200(1): 116-124.
164. Tao J, Zhang Y, Li S, Sun W, Soong TW. Tyrosine kinase-independent inhibition by genistein on spermatogenic T-type calcium channels attenuates mouse sperm motility and acrosome reaction. *Cell calcium* 2009; 45(2): 133-143.
 165. Bai J, Shi Y. Inhibition of T-type Ca^{2+} currents in mouse spermatogenic cells by gossypol, an antifertility compound. *European journal of pharmacology* 2002; 440(1): 1-6.
 166. Weyand I, Godde M, Frings S, et al. Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* 1994; 368(6474): 859.
 167. Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biology* 2001; 3(5): 499-502.
 168. Nilius B, Voets T. TRP channels: a TR (I) P through a world of multifunctional cation channels. *Pflügers Archiv* 2005; 451: 1–10.
 169. Jungnickel MK, Sutton KA, Florman HM. In the beginning: lessons from fertilization in mice and worms. *Cell* 2003; 114(4): 401–404.
 170. Ru Y, Zhou Y, Zhang Y. Transient receptor potential-canonical 3 modulates sperm motility and capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation via $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilization. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2015; 47(6): 404-413.

171. Weissgerber P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, et al. Excision of Trpv6 gene leads to severe defects in epididymal Ca²⁺ absorption and male fertility much like single D541A pore mutation. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287(22): 17930-17941.
172. Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Journal of neurobiology* 2002; 53(4): 447-456.
173. Kumar P, Meizel S. Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(27): 25928-25935.
174. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert review of neurotherapeutics* 2008; 8(11): 1703-1718.
175. Kanbara K, Okamoto K, Nomura S, et al. The cellular expression of GABA(A) receptor alpha1 subunit during spermatogenesis in the mouse testis. *Histology and histopathology* 2010; 25(10): 1229-38
176. Du Y, Du Z, Zheng H, et al. GABA exists as a negative regulator of cell proliferation in spermatogonial stem cells. *Cellular & molecular biology letters* 2013; 18(2): 149-62.
177. Burello N, Vicari E, D'Amico L, et al. Human follicular fluid stimulates the sperm acrosome reaction by interacting with the GABA receptors. *Fertility and sterility* 2004;82(3): 1086-1090.

178. Cooper TG, Yeung CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microscopy research and technique* 2003; 61(1): 28-38.



ÖZGEÇMİŞ

Seda ÖZAYDIN

Elazığ-12.03.1988

İlkokul, ortaokul-Tuncay Küçüközer İlköğretim Okulu (1993-2001)

Lise-Korgeneral Hulusi Sayın Lisesi(2001-2004)

Lisans-Fırat Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Fen Bilgisi Öğretmenliği
(2005-2009)

Yüksek lisans-Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü-Moleküler Biyoloji(2011-2017)

Lisans-Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü(2011-2014)

Yüksek lisans-Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Biyoloji(2012 -2017)

Milli Eğitim Bakanlığı resmi burslu öğrenci (2015-)