



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE OKSİDATİF STRESİN cAMP
ARACILI PKA YOLAĞI PROTEİNLERİNE VE ICSI
PARAMETRELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEREN ERDEM ALTUN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi SEDA KARABULUT

İSTANBUL-2020



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE OKSİDATİF STRESİN cAMP
ARACILI PKA YOLAĞI PROTEİNLERİNE VE ICSI
PARAMETRELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEREN ERDEM ALTUN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi SEDA KARABULUT

İSTANBUL-2020

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde, gerek eğitimimde gerek kişisel gelişimimde her anımda yanımda olup, beni yönlendiren, her daim daha iyi bir öğrenci ve daha iyi bir insan olmamı sağlayan, desteğini ve güvenini bir an olsun eksiltmeyen sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Seda Karabulut'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecimde destek ve katkılarıyla bu çalışmayı mümkün kılan anabilim dalı başkanımız sayın Doç. Dr. İlknur Keskin'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez sürecimde ve ders dönemlerimde her an yanımda olan, desteklerini her an hissettiğim Dr. Hilal Eren Gözel'e, A. Ahsen Kaplan'a, Benay Daylan'a, Ar. Gör. Bircan Kolbaşı'ya, Ar. Gör. Çağrı Çakıcı'ya ve ekip arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Tez yazımım ve iş hayatımdaki desteklerinden ötürü Emb. Pelin Kutlu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bütün bu zorlu sürece birlikte göğüs gerdiğimiz, birlikte girdiğimiz bu yoldan çok daha güçlü çıktığımız can eşim Tansu Altun'a, hayatımın her alanında beni cesaretlendiren, düşüğümde elimi tutup kaldıran, beni bugünlere getiren çok kıymetli ailem Malka, Cemal ve Cem Erdem'e minnetlerimi sunarım. Son anda hayatımıza dahil olan daha yüzünü görmeden içimi titreten can parçam, sevgili Burcu Alp ve Cem Erdem'in biricik kızı, canım yeğenim Nerissa Sue Erdem'e verdiği tarifsiz mutluluktan dolayı çok teşekkür ederim. İkinci ailem Resmiye – Ertürk Altun'a, sonsuz sevgi ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR/İTHAF.....	iv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
1. TÜRKÇE ÖZET.....	15
2. İNGİLİZCE ÖZET.....	17
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	19
4. GENEL BİLGİLER.....	21
4.1. İnfertilite.....	21
4.1.1. Erkek İnfertilitesi.....	21
4.2. Oksidatif Stres.....	23
4.2.1. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi.....	23
4.2.2. Oksidatif Stres ve Semen Parametreleri.....	28
4.2.3. Oksidatif Stres ve ICSI Parametreleri.....	29
4.3. Hücresel Sinyal İletim Mekanizmaları.....	30
4.3.1. cAMP Bağımlı PKA Yolağı.....	34
4.4. Sperm Hücresinde cAMP Bağımlı PKA Yolağı.....	40
4.5. Semendeki Oksidatif Stresin cAMP Bağımlı PKA Yolağına Etkisi.....	44
5. MATERYAL VE METOT.....	48
5.1. Etik Onayı.....	48
5.2. Hastaların Seçilmesi ve Sperm Örneklerinin Toplanması.....	48
5.3. Hasta Dışlama Kriterleri.....	48
5.4. Semen Örneklerinin Hazırlığı.....	49
5.5. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi.....	49
5.5.1. Total Oksidan Seviye Tespiti.....	49
5.5.2. Total Antioksidan Seviye Tespiti.....	50
5.6. Lipit Peroksidasyon Analizi.....	51
5.6.1. Solüsyon Hazırlığı.....	52

5.7. Kromatin ve DNA Analizleri.....	53
5.7.1. DNA Fragmentasyon Analizi.....	53
5.7.2. Kromatin Yapı Analizi.....	54
5.7.2.1. Solüsyon Hazırlığı.....	55
5.8.cAMP Bağımlı PKA Yolağı Analizleri.....	55
5.8.1.cAMP Analizi.....	55
5.8.2.Proteinlerin (PKA ve p-PKA) İmmünohistokimyasal Analizi.....	58
5.8.2.1. Kimyasal Hazırlığı.....	61
5.9. Sperm Parametrelerinin Analizi.....	62
5.10. ICSI Parametrelerinin Analizi.....	66
5.10.1. Oositin İndüklenmesi ve ICSI Prosedürü.....	66
5.10.2. Fertilizasyon ve Embriyo Gelişim Takibi.....	67
5.10.3. Embriyo Transferi ve Gebelik Değerlendirmesi.....	67
5.11. İstatistiksel Analiz.....	71
6. BULGULAR.....	72
6.1. Oksidatif Stres Parametreleri.....	72
6.1.1. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	74
6.1.2. Malondialdehit Analizi.....	75
6.1.3. Total Oksidan Seviye Analizi.....	77
6.1.4. Total Antioksidan Seviye Analizi.....	78
6.2. Kromatin ve DNA Parametreleri.....	80
6.2.1. DNA Fragmentasyonu.....	82
6.2.2. Kromatin Bütünlüğü.....	88
6.3. cAMP Bağımlı PKA Yolağı Parametreleri.....	94
6.3.1. cAMP.....	94
6.3.2. PKA ve p-PKA.....	96
6.4. ICSI Parametreleri.....	109
6.5. Sperm Parametreleri.....	110
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	112
7.1. Oksidatif Stres Parametreleri.....	113
7.1.1. Oksidatif Stres İndeksi.....	113
7.1.2. Lipit Peroksidasyonu.....	114

7.1.3. Toplam Oksidan Seviyesi.....	116
7.1.4. Toplam Antioksidan Seviyesi.....	117
7.2. Kromatin ve DNA Parametreleri.....	120
7.3. Sinyal Yolağı Parametreleri.....	122
8. KAYNAKLAR.....	125
9. ETİK KURUL ONAYI.....	144
10. ÖZGEÇMİŞ.....	147



KISALTMALAR

- DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
- ROT: Reaktif oksijen türleri
- mtDNA: Mitokondriyal DNA
- MDA: Malondialdehit
- TAS: Toplam antioksidan seviyesi
- TOS: Toplam oksidan seviyesi
- LPO: Lipit peroksidasyonu
- ORP: Oksidasyon – redüksiyon potansiyeli
- G Protein: Trimerik GTP bağlayıcı protein
- GTP: Guanozin trifosfat
- GDP: Guanozin difosfat
- ATP: Adenozin trifosfat
- cAMP: Halkasal adenozin 3', 5' monofosfat
- AC: Adenilat siklaz
- PKA: Protein kinaz A
- pPKA: Fosforlanmış protein kinaz A
- tmAC: Transmembran adenilat siklaz
- sAC: Çözünür adenilat siklaz
- PTP: Protein tirozin fosforilasyon
- PTK: Protein tirozin kinaz
- IUI: Aşılama (İntrauterin inseminasyon)
- ICSI: İnterasitoplazmik sperm enjeksiyonu

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.2.2.1 : Semen parametre değerleri DSÖ, 2010.....	28
Tablo 5.8.1.1 : Semen örneği dilüsyon hazırlığı.....	57
Tablo 5.8.1.2 : Solüsyon hazırlığı.....	57
Tablo 5.8.1.3 : Standart hazırlama.....	57
Tablo 6.1.1 : Oksidatif stres parametreleri istatistiksel analizi.....	72
Tablo 6.1.2 : Hastaların okunan oksidatif stres parametre değerleri.....	73
Tablo 6.1.1.1 : Oksidatif stres indeksinin, oksidatif stres parametreleri ve DNA-kromatin parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....	74
Tablo 6.1.1.2 : Oksidatif stres indeksi ile cAMP bağımlı PKA yolağı parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	74
Tablo 6.1.1.3 : Oksidatif stres indeksi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	74
Tablo 6.1.1.4 : Oksidatif stres indeksi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	75
Tablo 6.1.2.1 : Malondialdehit analizinin oksidatif stres parametreleri ve DNA-kromatin parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	75
Tablo 6.1.2.2 : Malondialdehit analizi ile cAMP bağımlı PKA yolağı parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	76
Tablo 6.1.2.3 : Malondialdehit analizi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	76
Tablo 6.1.2.4 : Malondialdehit analizi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	76
Tablo 6.1.3.1 : Total oksidan seviyesinin, oksidatif stres parametreleri ve DNA-kromatin parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	77
Tablo 6.1.3.2 : Total oksidan seviyesi ile cAMP bağımlı PKA yolağı parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	77

Tablo 6.1.3.3 : Total oksidan seviyesi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	78
Tablo 6.1.3.4 : Total oksidan seviyesi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	78
Tablo 6.1.4.1 : Total antioksidan seviyesinin, oksidatif stres parametreleri ve DNA-kromatin parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	79
Tablo 6.1.4.2 : Total antioksidan seviyesi ile cAMP bağımlı PKA yolağı parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	79
Tablo 6.1.4.3 : Total antioksidan seviyesi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	79
Tablo 6.1.4.4 : Total antioksidan seviyesi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	80
Tablo 6.2.1 : Kromatin ve DNA Parametreleri.....	80
Tablo 6.2.2 : Hastaların DNA fragmentasyon ve kromatin bütünlüğü inceleme sonuçları.....	81
Tablo 6.2.1.1 : DNA fragmentasyonu analizinin oksidatif stres parametreleri ve kromatin bütünlüğü ile arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....	82
Tablo 6.2.1.2 : DNA fragmentasyonu analizi ile cAMP bağımlı PKA yolağı arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	82
Tablo 6.2.1.3 : DNA fragmentasyonu analizi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	83
Tablo 6.2.1.4 : DNA fragmentasyonu analizi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	83
Tablo 6.2.2.1 : Kromatin bütünlüğü analizinin oksidatif stres parametreleri ve DNA fragmentasyonu ile arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....	88
Tablo 6.2.2.2 : Kromatin bütünlüğü analizi ile cAMP bağımlı PKA yolağı arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	88
Tablo 6.2.2.3 : Kromatin bütünlüğü analizi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	89

Tablo 6.2.2.4 : Kromatin bütünlüğü analizi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	89
Tablo 6.3.1 : cAMP bağımlı PKA yolağı ortalama ekspresyon oranı istatistiksel analizi.....	94
Tablo 6.3.1.1 : cAMP analizi ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	94
Tablo 6.3.1.2 : cAMP analizinin DNA-kromatin parametreleri ve cAMP bağımlı PKA yolağı proteinleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	95
Tablo 6.3.1.3 : cAMP analizi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	95
Tablo 6.3.1.4 : cAMP analizi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	95
Tablo 6.3.2.1 : cAMP bağımlı PKA yolağının diğer parametrelerle ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	97
Tablo 6.3.2.2 : cAMP bağımlı PKA yolağı proteinlerinin (PKA ve p-PKA) ekspresyon bölgelerinin ortalama oranları.....	98
Tablo 6.4.1 : ICSI Parametrelerinin istatistiksel analizinin değerlendirilmesi.....	109
Tablo 6.4.2 : ICSI parametrelerinin birbirleri ile ilişkilerinin değerlendirilmesi.....	110
Tablo 6.5.1 : Sperm Parametrelerinin istatistiksel analizinin değerlendirilmesi.....	110
Tablo 6.5.2 : Sperm parametrelerinin birbirleri ile ilişkinin değerlendirildiği analiz.....	111

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.2.1.1.	: ROT kaynakları.....	24
Şekil 4.2.1.2.	: ROT' un sperm fizyolojisindeki rolü.....	25
Şekil 4.2.1.3.	: Sperm hücresinde oluşan ROT hasarları.....	26
Şekil 4.3.1.	: Hücre yüzey reseptörlerinin etki mekanizması.....	31
Şekil 4.3.2.	: Hücre yüzey reseptörleri.....	32
Şekil 4.3.3.	: G-protein yapısı.....	33
Şekil 4.3.4.	: Hücresel sinyal iletim yolları.....	34
Şekil 4.3.1.1.	: cAMP moleküler yapısı.....	35
Şekil 4.3.1.2.	: cAMP sentezi.....	37
Şekil 4.3.1.3.	: PKA yapısı.....	38
Şekil 4.3.1.4.	: cAMP tarafından düzenlenen glikojen metabolizması.....	39
Şekil 4.3.1.5.	: PKA aktivasyonu.....	40
Şekil 4.4.1.	: Sperm hücresinde cAMP bağımlı PKA yolağının işlevi.....	44
Şekil 4.5.1.	: Protein tirozin fosforilasyonu ve kapasitasyon oluşumu.....	45
Şekil 4.5.2.	: Sperm hüresinde kapasitasyon ve hiperaktivasyon regülasyon....	46
Şekil 5.5.1.	: Oksidatif stres ölçüm kitleri.....	50
Şekil 5.6.1.	: Lipit peroksidasyon analizi işlem basamakları.....	52
Şekil 5.7.1.1.	: DNA fragmentasyon analiz işlemi.....	54
Şekil 5.7.2.1.	: Toluidin mavisi boyama işlemi sonrası sperm yaymaları.....	55
Şekil 5.8.2.1.	: İmmünohistokimyasal analiz basamakları.....	60
Şekil 5.8.2.2.	: İmmünohistokimyasal analiz basamakları.....	61
Şekil 5.9.1.	: Sperm Diff-Quick boyama.....	64
Şekil 5.9.2.	: Sperm Diff-Quick boyama.....	65
Şekil 5.10.1.	: Metafaz II evresi.....	68
Şekil 5.10.2.	: ICSI işleminden 1 gün sonra.....	68
Şekil 5.10.3.	: ICSI işleminden 2 gün sonra.....	69
Şekil 5.10.4.	: ICSI işleminden 3 gün sonra.....	69
Şekil 5.10.5.	: ICSI işleminden 5 gün sonra.....	70
Şekil 5.10.6.	: Mikroenjeksiyon işlemi.....	70

Şekil 6.2.1.1.	: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği.....	84
Şekil 6.2.1.2.	: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği.....	85
Şekil 6.2.1.3.	: DNA fragmentasyonu < %30 olan 3 numaralı hastaya ait ışık mikroskopik görüntü X100.....	86
Şekil 6.2.1.4.	: DNA fragmentasyonu < %30 olan 31 numaralı hastaya ait ışık mikroskopik görüntü X100).....	87
Şekil 6.2.2.1.	: Sperm kromatin bütünlüğü Toluidin Mavisi boyama tekniği.....	90
Şekil 6.2.2.2.	: Toluidin Mavisi boyama tekniği.....	90
Şekil 6.2.2.3.	: 8 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100).....	91
Şekil 6.2.2.4.	: 26 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100).....	92
Şekil 6.2.2.5.	: 40 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100).....	93
Şekil 6.3.1.1	: cAMP standart kalibrasyon eğrisi.....	96
Şekil 6.3.2.1.	: cAMP bağımlı PKA yolağı proteinlerinin (PKA ve p- PKA) ekspresyon oranlarının bölgesel dağılımı.....	99
Şekil 6.3.2.2.	: PKA proteinin immünohistokimyasal analizi.....	100
Şekil 6.3.2.3.	: PKA proteinin immünohistokimyasal analizi.....	101
Şekil 6.3.2.4.	: PKA proteinin immünohistokimyasal analizi.....	102
Şekil 6.3.2.5.	: Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PKA protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100.....	103
Şekil 6.3.2.6.	: Sperm hücresinin kuyruk bölgesindeki PKA protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100.....	103
Şekil 6.3.2.7.	: Sperm hücresinin akrozom bölgesindeki PKA protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100.....	104
Şekil 6.3.2.8.	: p-PKA proteinin immünohistokimyasal analizi.....	104
Şekil 6.3.2.9.	: p-PKA proteinin immünohistokimyasal analizi.....	105
Şekil 6.3.2.10.	: p-PKA proteinin immünohistokimyasal analizi.....	106
Şekil 6.3.2.11.	: p-PKA proteinin immünohistokimyasal analizi.....	107

- Şekil 6.3.2.12. : Membran, ekvatoryal ve akrozom bölgelerindeki p-PKA proteinin ekspresyon görüntüsü.....108
- Şekil 6.3.2.13. : Baş anterior bölgesindeki p-PKA protein ekspresyonu.....108



1. ÖZET

ERKEK İNFERTİLİTESİNDE OKSİDATİF STRESİN cAMP ARACILI PKA YOLAĞI PROTEİNLERİNE VE ICSI PARAMETRELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İnfertilite, çiftlerin en az 1 yıl süre ile korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır (DSÖ, 2010). Toplumun ~%15'inde görülen infertilite sorunu ile karşılaşan çiftler yardımla üreme tekniklerine başvurmakta ve ancak bu yolla gebelik sağlanabilmektedir. Oksidatif stresin, birçok hastalığın etiolojisinde rol oynadığı gibi infertilitede de etkisi olduğu bilinmektedir. Sperm hücrelerinin fertilizasyon sürecinde (hiperaktivasyon, kapasitasyon) rol oynayan yollardan biri de cAMP bağımlı PKA yolağıdır. Çalışmamızda, seminal plazmada belirlenen oksidatif stres parametrelerinin sperm hücreleri üzerine hücresel, genetik ve fonksiyonel etkilerini ve bu spermier kullanılarak yapılan bir tüp bebek (ICSI) tedavisinde, tedavinin başarı ölçütlerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmamıza, tüp bebek merkezine başvuran 40 çiftin erkek partnerlerinin semen parametreleri, oksidatif stres değerleri (TOS, TAS, MDA), DNA fragmentasyonu ve kromatin bütünlüğü değerleri, cAMP düzeyleri, PKA ve p-PKA proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ve hücresel lokasyonları ve bu spermier kullanılarak yapılan bir ICSI tedavisi sonrası ICSI parametreleri araştırılmıştır. Oksidatif stresin ölçütlerinden biri olan MDA'nın, cAMP bağımlı PKA yolağı ile ($p=0,008$) ve kromatin yapısı ($p=0,607$) ve DNA Fragmentasyonu ($p=0,037$) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. TAS düzeyi ile sperm motilitesi ($p=0,047$) ve blastosist gelişim oranı ($p=0,023$) arasında, TOS düzeyi ile de spermier progresif motilite oranı ($p=0,053$) arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. PKA seviyesi ile progresif sperm motilitesi arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiş ($p=0,056$), bu proteinin aktive formu olan p-PKA ile de fertilizasyon oranı arasında ilişkili belirlenmiştir ($p=0,023$). Bulgularımız doğrultusunda semendeki oksidatif stresin, cAMP aracılı PKA yolağını aktive ettiği, bu yolağın sperm DNA'sı ve kromatin yapısını bozduğu, ve sperm motilitesi ve ICSI sonrası fertilizasyon oranlarını düşürdüğü sonucuna ulaşılmıştır. Konu ile ilgili yapılacak kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: cAMP/PKA yolağı, DNA fragmentasyonu, ICSI parametreleri, oksidatif stres, sperm parametreleri.

Bu alışma İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2019/10).



2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON cAMP-MEDIATED PKA PATH PROTEINS AND ICSI PARAMETERS IN MALE INFERTILITY

Infertility is defined as the couples' inability to achieve pregnancy despite unprotected and regular sexual intercourse for at least 1 year (WHO, 2010). Couples who encounter infertility problem, which is seen in ~ 15% of the society, attend to assisted reproductive techniques and pregnancy can only be achieved by this way. Oxidative stress is known to play a role in the etiology of many diseases as well as in infertility. One of the pathways that play a role (hyperactivation, capacitation) in the fertilization process of sperm cells is the cAMP-dependent PKA pathway. In our study, the cellular, genetic and functional effects of oxidative stress in seminal plasma on sperm cells and the effects of treatment on success rates in an in vitro fertilization (ICSI) treatment using these sperms were investigated. In our study, the semen parameters, oxidative stress values (TOS, TAS, MDA), DNA fragmentation and chromatin integrity values, cAMP levels, expression levels and cellular locations of PKA and p-PKA proteins of male partners of 40 couples who applied to the IVF center, and ICSI parameters were investigated after an ICSI treatment. It was determined that MDA, one of the criteria of oxidative stress, is associated with the cAMP-dependent PKA pathway ($p = 0.008$) and chromatin structure ($p = 0.607$) and DNA Fragmentation ($p = 0.037$). A significant relationship was found between TAS level and sperm motility ($p = 0.047$) and blastocyst growth rate ($p = 0.023$), and between TOS level and progressive motility rate of sperm ($p = 0.053$). A significant correlation was found between PKA level and progressive sperm motility ($p = 0.056$), and a relationship between p-PKA, the activated form of this protein, and fertilization rate ($p = 0.023$). According to our findings, we may conclude that oxidative stress in semen activates the cAMP-mediated PKA pathway, this pathway disrupts the sperm DNA and chromatin structure, and reduces sperm motility and fertilization rates after ICSI. More studies are needed to provide more evidence to the subject.

Key words: cAMP/PKA pathway, DNA fragmentation, ICSI parameters, oxidative stress, sperm parameters.

This work was supported by the Istanbul Medipol University Scientific Research Projects Commission (Project No: 2019/10)



3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, çiftlerin en az 1 yıl süre ile korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır (DSÖ, 2010). Toplumun ~%15'inde görülen ve her geçen gün insidansı hızla artan infertilite, günümüzün önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. İnfertilite ile karşılaşan çiftler yardımla üreme tekniklerine başvurmakta ve ancak bu yolla gebelik sağlanabilmektedir. İnfertilite tedavisi ve yardımla üreme tekniklerinde başarı olarak adlandırılan gebelik ve sağlıklı doğum birçok parametreye bağlı olmakla birlikte, başarı şansı günümüzde ortalama %40 civarında olup bu oranın yükseltilmesi birçok çalışmaya konu olmaktadır [1].

Erkek kaynaklı infertilite tanısında, DSÖ'nün oluşturduğu rehber doğrultusunda semen analizi gold standart olarak kullanılmakta, konsantrasyon, motilite ve morfoloji gibi sperm parametreleri belirlenerek erkek üreme potansiyeli belirlenmeye çalışılmaktadır [2]. Ancak semen analizi birçok erkek infertilite vakasını predikte etmekte yetersiz kalmakta ve sperm fonksiyonu ile ilgili bilgi verememektedir [3]. Bunun sonucu olarak infertilite ile karşı karşıya kalan erkeklerin yaklaşık %50'sine sorunun nedeni ile ilgili bir tanı koyulamamakta ve bu hastalar açıklanamayan infertilite grubu olarak sınıflandırılmaktadır [4]. Bu durumu açıklamak üzere sperm fonksiyonunu belirlemeye ve problemin etiolojisini bulmaya yönelik yapılan araştırmalar, oksidatif stresin erkek infertilite patogenezinde önemli payı olduğunu göstermiştir [5-8].

Oksidatif stresin birçok hastalığın etiolojisinde rol oynadığı gibi infertilitede de etkisi olduğu bilinmektedir [9]. Oksidatif stres çeşitli iç ve dış etkenler nedeniyle reaktif oksijen türleri ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkan bir durum olarak tanımlanmaktadır [10]. Bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren, stabil olmayan, yüksek enerjili atom veya moleküllere, serbest radikaller denmektedir. Serbest radikaller yüksek derecede reaktif özellik göstermelerinden dolayı lipitleri, amino asitleri ve karbonhidratları oksitleyebilmekte ve DNA mutasyonlarına yol açabilmektedir [11]. ROT (Reaktif Oksijen Türleri)

üretimi ve antioksidan savunma yeteneği arasında bir dengesizlik oluştuğunda meydana gelen oksidatif stres, sperm canlılığını, motilitesini ve döllenme potansiyelini olumsuz etkileyebilmektedir, bu durum, fertil erkek kontrollerle karşılaştırılan infertil erkek semen örneklerindeki anlamlı yüksek ROT seviyeleri bulunan çalışmalarda gösterilmiştir [9].

ROT, spermde olgunlaşma, aktivasyon, kapasitasyon ve akrozomal reaksiyon gibi fonksiyonel yeterliliğini kazanması için gerekli olan bir uyarıcıdır [12]. Spermde bulunan ROT, adenilat siklazı uyararak cAMP üretimini indüklemektedir. Sentezlenen cAMP ise PKA molekülünü aktive etmektedir [13]. Aktif hale geçen PKA, tirozin kinazların aktivasyonu ve/veya protein fosfatazların inhibisyonuyla protein fosforilasyonunu arttırmaktadır. Artmış protein fosforilasyonu kapasitasyonu uyarmaktadır [14].

Fertilite ve infertilitenin, erkek gamet hücresi olan spermin kalitesi (morfolojik, genetik, yapısal ve fonksiyonları) ile direkt ilişkili olup tüp bebek başarı ölçütlerini (fertilizasyon oranı, embriyo gelişim oranı, embriyo kalitesi, gebelik oranı, implantasyon oranı ve devam eden başarı oranları vb.) etkileyebileceği gösterilmiştir [15-17]. Ancak, gerek normal fertilite süreci gerekse infertilite etiyolojisinde oksidatif stresin rolü, etkileri ve moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Oksidatif stresin ICSI parametrelerine etkisi ile ilgili ise literatürde sadece bir çalışma olup, bu çalışmada fertilizasyonu olumsuz etkilediği iddia edilmiştir [18].

Çalışmamızda, seminal plazmada belirlenen oksidatif stres parametrelerinin sperm hücreleri üzerine hücresel, genetik ve fonksiyonel etkilerini ve bu spermler kullanılarak yapılan bir tüp bebek (ICSI) tedavisinde, tedavinin başarı ölçütlerine etkileri araştırılarak erkek infertilite patogenezinde önemli rolü olan seminal oksidatif stresin etkilerinin kapsamlı olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfertilite

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılında güncel olarak belirlediği tanıma göre, çiftlerin en az 1 yıl süre ile korunmasız ve düzenli olarak cinsel ilişkiye girmesine rağmen gebeliğin oluşmaması durumudur. Son dönemlerde çiftlerin yaklaşık %15'inde görülebilen [19] ve insidansı büyük bir hızla artmakta olan infertilite, ciddi bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Düzenli ve korunmasız cinsel ilişki yaşayan çiftlerin yaklaşık %85'i, ilk 1 yıl içerisinde çocuk sahibi olabilmektedir. Üçüncü yıldan sonra bu oran %25'lere kadar düşebilmektedir. Dünya genelinde infertilite vakalarının, yaklaşık %40'ı kadın, %40'ı erkek [20] ve %10'u hem kadın hem erkek kaynaklı olabilmektedir. Diğer %10-15'lik grup, açıklanamayan infertilite olarak kaydedilmektedir.

Kadın ve erkeğe ait problemlerin önemine ve ilişkili faktörlere bağlı olarak çiftlere, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu tedavisi uygulanmaktadır. Ancak gerek başarısızlık ihtimali barındırdığından, gerekse tedavi sürecindeki güçlüklerden dolayı hastalar maddi ve manevi olarak yıpranabilmektedir. Tüp bebek tedavisinin günümüzdeki bildirilen başarı oranı yaklaşık %40'tır. İnfertilite kliniklerine tedavi için başvuran hastalardan, öncelikli olarak FSH, LH, E2, progesteron, prolaktin ve testosteron gibi hormon tetkikleri istenmekte, kadın üreme kanallarındaki ve sperm taşıyıcı kanal ve organlara ait anatomik bozukluklar araştırılmakta, DSÖ'nün belirlediği semen parametrelerine göre semen analizi yapılmaktadır.

4.1.1. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite kaynaklarına bakıldığında %40'lık bir orana sahip olan erkek nedenli infertilitenin altında yatan mekanizma, bütünüyle aydınlatılamamıştır [21,22]. Bilinen nedenler arasında; spermatogenez (sperm oluşumu) sırasında meydana gelebilecek hasarlar, hormonal bozukluklar ve genetik hastalıklar sayılabilmektedir.

Bunlardan başka, sosyal yaşam kaynaklı oksidatif strese neden olabilecek sigara, alkol veya uyuşturucu kullanımı, radyasyon maruziyeti, stres gibi faktörler de sıralanabilmektedir [23].

İnsan genomunun %10'u üreme ile ilgili bulunmuştur [24]. Bu bilgi ışığında, erkek fertilitasını etkileyen genetik bir mutasyonun diğer fizyolojik süreçlere de etkisi olabileceği düşünülmektedir. Örneğin non-obstrüktif azoospermi hastalarında, DNA hasar onarım mekanizmalarında ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde hata oranlarının daha fazla olduğuna ve azoospermik hastalarda kanser oranlarının daha yüksek olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır [25]. Yine Klinefelter sendromuna sahip hastalarda kardiyovasküler hastalıklar insülin direnci ve kanser çeşitlerinden özellikle erkek meme kanseri riskinde artış olduğu gözlenmektedir [26-28]. Klinefelter sendromu, 47,XXY genotipinin primer hipogonadizmin şeklinde ifadesidir ve erkek infertilitesine/subfertilitesine neden olduğu bilinmektedir.

Öte yandan, erkek fertilitasını etkileyebilecek akut ve kronik hastalıkların başında, retrograd ejakülasyona neden olabilen diyabet, luteinize edici hormonda (LH) azalmaya ve testosteronun östrodiol dönüşmesine sebep olarak testosteron seviyesinde ve sperm konsantrasyonunda azalmaya neden olabilen obezite sayılabilir [29]. Hastanın maruz kaldığı herhangi bir travma, gonadotropin salınımını baskılayarak sperm üretimini etkileyebilmekte, bu etki travmadan 1-3 ay sonra parametrelere yansımaktadır.

Ergenlik sonrası geçirilmiş bir kabakulak hastalığı, testiste atrofiye, epididim veya vas deferenste yara dokusu oluşumuna veya tıkanıklığa neden olabilmektedir [29]. Yine birçok kronik hastalığın, altta yatan sebeplerden biri olan yaşam şekli, erkek infertilitesinin de altta yatan sebeplerden biri olarak sayılabilir. Etki şekli tam olarak aydınlatılmamış olsa da psikolojik stres, sigara, alkol ve uyuşturucu gibi madde bağımlılıklarının, yukarıda da belirtildiği gibi, semen hacminin azalmasına, sperm konsantrasyonu sayısında düşüklüğe, sperm motilite ve morfolojisine olumsuz etki ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır [30].

4.2. Oksidatif Stres

Hücrenel metabolizmanın bir ürünü olarak mitokondride, moleküler oksijenden üretilen reaktif oksijen türleri, serbest radikaller ve non-radikallerden oluşmaktadır. Bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren, stabil olmayan, yüksek enerjili atom veya moleküllere, serbest radikaller denmektedir. Eşlenmemiş elektron içeren kararsız yapıdaki atom veya moleküller kararlı hale gelebilmek için diğer bileşiklerin elektronlarıyla birleşerek oksidasyona neden olabilmektedirler. Bu şekilde meydana gelmiş olan serbest radikaller, yüksek derecede reaktif özellik göstermelerinden dolayı lipitleri, amino asitleri ve karbonhidratları oksitleyebilmekte ve DNA mutasyonlarına yol açabilmektedir [11].

Reaktif oksijen türleri, eşleştirilmemiş elektronlarla donatılmış oksijen veya azottan türetilmiş moleküller dizisi olmakla birlikte, hücre metabolizması ve çeşitli hücrenel fonksiyon işlemleri sırasında üretilen yan ürünlerdir [31]. Oksidatif stres, ROT üretimi ve antioksidan savunma yeteneği arasında bir dengesizlik oluştuğunda meydana gelmektedir. Oluşan dengesizlik sonucu artmış olan oksidatif stres, sayısız hastalıkta önemli rol oynamaktadır. Bu hastalıklar başında kanser [32], vasküler hastalıklar, yüksek kolesterol [33], hipertansiyon, Parkinson, Alzheimer, diyabet ve böbrek hastalıkları gelmektedir.

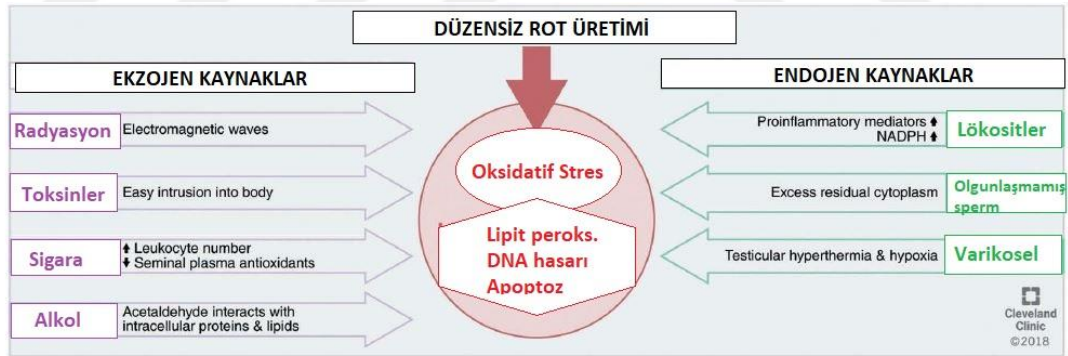
4.2.1. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi

Sperm hücrelerinin içerisinde bulunduğu seminal plazma, sperm hücrelerini besleyen bir ortam sunmaktadır. Seminal plazmanın içerisinde sperm hücreleri dışında, lökositler, olgunlaşmamış germ hücreleri, sertoli hücreleri gibi farklı hücreler de bulunmaktadır [34]. Lökositler, enfeksiyon ve inflamasyon durumunda aktif hale gelen savunma sistemi hücreleridir. Aktif haldeki lökositler seminal plazmadaki ROT miktarını arttırmaktadır [35]. DSÖ'nün yapmış olduğu tanıma göre, ejakülattaki lökosit konsantrasyonu mililitrede 1×10^6 seviyesinin üzerine çıktığında lökositospermi oluşmaktadır. Lökositospermi durumu, sperm hücrelerinin ROT üretimini arttırmaktadır [36]. Olgunlaşmamış sperm hücreleri, anormal baş morfolojisi ve

sitoplazmik retansiyon ile karakterizedir. Sperm olgunlaşması sırasında fazlalık olan sitoplazma uzaklaştırılmadığında, serbest radikal oluşumu gözlenir [37]. Bu durum, olgunlaşmamış sperm hücrelerinin, ROT kaynaklarından biri olduğuna işaret etmektedir [38]. Endojen ROT kaynaklarından bir diğeri olan sertoli hücrelerinin de, ROT aracılı spermatogenez sürecinde rol aldığı düşünülmektedir [39].

Varikozel, enfeksiyon, kriptorşidizm, obezite, kanser, radyasyon, sigara, alkol, uyuşturucu, iyonlaştırıcı radyasyon ve yüksek sıcaklığa maruz kalma, çevre kirliliği gibi birçok etken oksidatif strese katkıda bulunan faktörler arasında sayılabilmektedir [40,41].

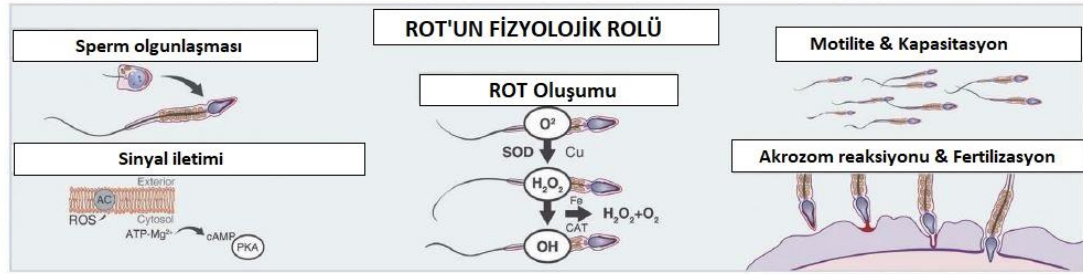
Yapılan çalışmalarda sağlıklı fertil kontrollerle karşılaştırılan idiopatik infertil erkek hastalarında, antioksidanlara kıyasla yüksek miktarda seminal ROT miktarı gözlenmiştir. [42]. ROT ve antioksidanlar arasındaki bu bozulmuş denge, oksidatif strese ve sonucunda erkek infertilitesine neden olabilmektedir.



Şekil 4.2.1.1: ROT kaynakları. (Dutta S., 2019)

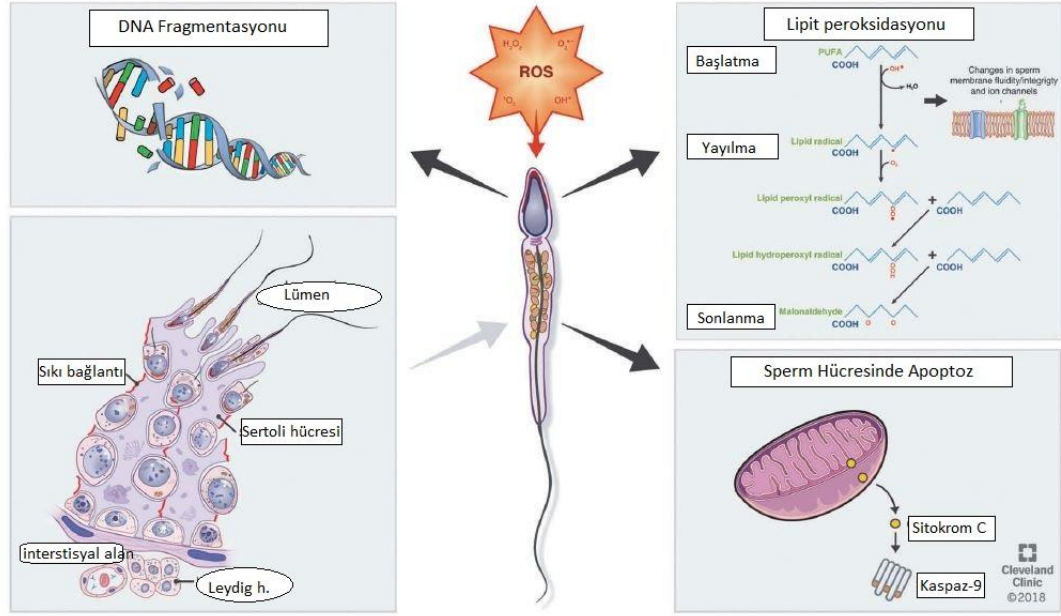
Sperm hücresi, motilite için ihtiyacı olan enerjiyi sağlamak üzere, bol miktarda mitokondri içermektedir. Hücredeki ROT'nin ana kaynağının mitokondri olması sperm hücresindeki ROT miktarını arttırmaktadır [43]. Oksidatif stres, ROT üretimi ve antioksidan savunma yeteneği arasında bir dengesizlik olarak tanımlanmakta ve açıklanamayan erkek infertilitesinin patofizyolojisinde klinik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir [10]. Semen örneğinde sperm hücresi tarafından üretilen fizyolojik

miktardaki ROT, hücre içi sinyal yollarını düzenleyerek kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozomal reaksiyon ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi fonksiyonel süreçler için gereklidir (Şekil: 4.2.1.2). ROT artışının yüksek ve antioksidan kapasitesinin düşük olduğu yani oksidasyon-redüksiyon dengesinin bozulduğu durumlarda oluşan oksidatif stres ise oksidatif hasara neden olmaktadır [43,44]. Oluşan oksidatif stres, sperm canlılığını, motilitesini ve dölleme potansiyelini olumsuz etkileyebilmektedir, bu durum, fertil erkek kontrollerle karşılaştırılan infertil erkek semen örneklerindeki anlamlı yüksek ROT seviyeleri bulunan çalışmalarda gösterilmiştir [9].



Şekil 4.2.1.2: ROT'un sperm fizyolojisindeki rolü (Dutta S., 2019)

Sperm hücresi, antioksidanların bol miktarda bulunduğu sitoplazma bakımından fakir, hücre onarım sistemleri bakımından da az gelişkindir, plazma membranında bulundurduğu kolesterol ve çoklu doymamış yağ asitleri nedeniyle de ROT'ne karşı oldukça hassas olabilmektedir [45]. Patolojik seviyede bulunan ROT miktarının insan spermindeki DNA (hem mitokondriyal hem de nükleer genom), protein, lipid gibi yapılarda ciddi hasarlara neden olduğu bilinmektedir [46] (Şekil 4.2.1.3).



Şekil 4.2.1.3: Sperm hücresinde oluşan ROS hasarları. (Dutta S., 2019)

Patolojik miktardaki ROS, DNA' daki fosfodiester omurgalara saldırarak DNA fragmentasyonuna ve bunun sonucunda anormal sperm parametrelerine neden olabilmektedir [47]. Ayrıca yüksek seviyedeki ROS miktarı, düzensiz veya artmış apoptotik sinyallere neden olarak da dolaylı olarak DNA fragmentasyonuna yol açmaktadır [48]. ROS, sitokrom C salgılayan iç ve dış mitokondriyal membranları bozabilmekte ve salgılanan sitokrom C, apoptotik kaspazları aktive edebilmektedir [49]. DNA hasarı ve anormal kromatin paketlenmesi sonucunda embriyonun fertilizasyon sonrası gelişimi, olumsuz etkilenir, embriyoda bölünme ve sonrasında da gebelik oranlarında azalmaya neden olabilmektedir. Mitokondriyal DNA (mtDNA), mitokondrilerin içinde yer alan küçük, dairesel bir DNA türüdür. mtDNA, oksidatif fosforilasyon ve ATP üretiminde çok önemli rol oynamaktadır. Ayrıca mtDNA' nın mutasyon oranı, nükleer DNA'ninkinden iki kat fazladır. Bu özelliğinden dolayı daha fazla sayıda sperm hücresinde hasarlı mitokondri bulunmakta, bu hücreler tam apoptoza girememekte ve hasar görmüş DNA'ya sahip bu spermler, ejaküle olmaktadır [50].

ROT ayrıca, lipit peroksidasyonu ve mtDNA mutasyonları aracılığı ile de enerji üretimini inhibe etmektedir, bu inhibisyon etkisi ile sperm motilitesinde azalmaya neden olabilmektedir [51].

Sperm hücresinin plazma membranında, metilen grupları arasında konjuge edilmemiş çift bağlara sahip çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) bulunmaktadır. Metilen grubuna yakın çift bağ, karbon-hidrojen bağının gücünü azaltmaktadır. Bu durum hidrojeni, oksidatif stres hasarına karşı hassas hale getirmektedir. Sperm hücreindeki redoks dengesi bozulup ROT miktarı arttıkça, sperm plazma membranının yağ asitlerinin çoğunluğu erimekte ve membran akışkanlığının azalmasına neden olan lipit peroksidasyonuna neden olabilmektedir. Hücredeki peroksidatif hasar, lipit peroksidasyonunun biyokimyasal belirteci olan malondialdehit analizi ile gösterilebilmektedir. Lipit peroksidasyonunun membran fonksiyonları ve membran bütünlüğünün kaybına neden olduğu, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [52,53].

Spermatogenez, pubertede başlayıp erkek hayatı boyunca devam eden bir süreçtir. Sperm üretimi sürekli gerçekleşse de ilerleyen yaşla birlikte seminal plazmadaki antioksidan miktarı gittikçe azalmakta, bu da oksidasyon-redüksiyon dengesini bozarak oksidatif strese neden olabilmektedir [54,55].

Oksidatif stres ölçümü için çeşitli yollar geliştirilmiştir. Seminal plazmadaki hücre dışı ROT miktarını ölçebilen 'Kemilüminesan ROT Testi' bunlardan biridir [56]. Semen içindeki total antioksidan kapasitesini ölçen 'TAK (Total Antioksidan Kapasitesi) testi' bir diğeridir [57]. ROT-TAK testinde ise iki değişkenin indeksi oluşturulmaktadır [58]. MDA testi ile lipit peroksidasyon düzeyi belirlenebilmekte, bu da oksidatif stres durumuna işaret etmektedir [59]. ORP testi, oksidan ve antioksidanları ölçüp redoks dengesini belirlemektedir. Son dönemlerde ise, kullanım kolaylığı ve zaman avantajı ile, oksidan-antioksidan dengesini gösteren MiOXSYS cihazı kullanılmaktadır [60].

4.2.2. Oksidatif Stres ve Semen Parametreleri

İnfertilite nedeniyle kliniklere başvuran erkek hastalara semen parametrelerinin değerlendirildiği konvansiyonel semen analizi yapılmaktadır. DSÖ, 2010 kriterlerine göre (Şekil 4.2.2.1), sperm parametreleri normal seviyenin altında olan hastalara, oligozoospermi, astenozoospermi veya teratozoospermi tanısı konmaktadır. Üretilen semende sperm yoksa bu durum, 'azoospermi' olarak adlandırılmaktadır. Bazı azoospermi vakalarında, hasta aslında sperm üretebilmektedir ancak vas deferenste yani spermi taşıyan kanallarda tıkanıklık olabilmekte, bu nedenle ejakülatta sperm görülememektedir. Semen üretilmediği vakalar ise 'aspermi' olarak tanımlanır. Sperm konsantrasyonu 15 milyondan az ise durum, 'oligozoospermi'dir. Sperm hareketliliğindeki azalmaya 'astenozoospermi', spermdeki yapısal ve morfolojik bozukluklar ise, 'teratozoospermi' olarak adlandırılmaktadır.

Tablo 4.2.2.1: Dünya Sağlık Örgütü Semen Parametre Değerleri, 2010

PARAMETRELER	NORMAL DEĞERLER
Semen hacmi (mL)	1,5
pH	≥ 7,2
Sperm sayısı / mL ($\times 10^6$ /mL)	15 (12-16)
Toplam sperm sayısı ($\times 10^6$ /ejakülata)	39 (33-46)
Toplam progresif hareketlilik (%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm) (%)	58 (55-63)
Sperm morfoloji (normal %)	4 (3,0-4,0)
Peroksidaz (+) lökosit ($\times 10^6$ /mL)	< 1,0

Yapılan çalışmalarda, seminal plazmadaki artmış ROT seviyesi ile sperm parametreleri arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır [7]. Artmış ROT seviyelerinin neden olduğu oksidatif stres, lipid peroksidasyonuna, bu da plazma membran zarı bütünlüğünü ve geçirgenliğinde bozulmaya, enzim aktivasyonlarına ve hücrel apoptozda olumsuz etkiye neden olur. Bütün bunların sonucunda sperm sayısı ve hareketliliği azalır, anormal sperm morfolojisi gözlenmeye başlar [61,62].

Yapılan bazı çalışmalarda likopenin, antioksidan kapasitesini arttırıp oksidatif stres hasarını azalttığı, böylece sperm sayısı, konsantrasyonu ve motilitesinde düzelmeye sebep olduğu gösterilmiştir [63,64].

Oksidatif stres görülen hastaların sperm parametreleri (sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi) incelendiğinde, sperm sayısı ve motilitesinde azalma olduğu ve morfolojisinin bozulduğu bildirilmiştir [65,66]. Ayrıca oksidatif stresin sperm DNA'sına yaptığı hasar sonucunda, sperm motilitesini olumsuz etkilediği, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [65].

Literatürde erkek infertilitesi çalışmalarında seminal plazmadaki oksidatif stres analizi farklı yollarla yapılabilmektedir. Doğrudan oksidatif stres tayini ya da dolaylı oksidatif stres sonucu oluşabilecek lipid peroksidasyon seviyesi analiz edilmekte, spermdeki DNA fragmentasyonu da içeren çeşitli hasarlar incelenebilmektedir [46]. Ancak konvansiyonel sperm analizi gibi evrensel bir teknik, tam olarak belirlenmemiştir. Varolan çalışmalar, infertilitenin altında yatan nedenleri gün yüzüne çıkarabilmek için, daha detaylı taramaların yapılması gerektiğine işaret etmektedir.

4.2.3. Oksidatif Stres ve ICSI Parametreleri

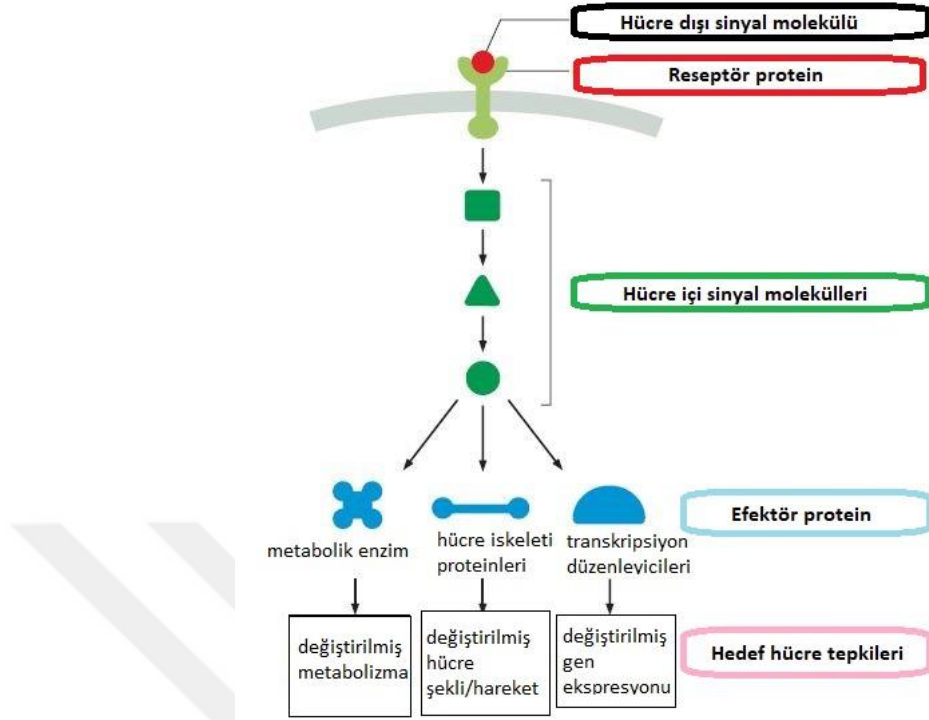
Sperm hücresinde DNA fragmentasyonunun en büyük nedeninin ROT ve oksidatif stres olduğu gösterilmiştir [67]. Oksidatif stres sonucu hasar gören DNA bütünlüğünün, fertilizasyon, embriyo gelişimi, implantasyon ve gebelik için önemli olduğu düşünülmektedir [68-70]. Literatürde sperm DNA hasarının yardımcı üreme tekniklerinin sonuçlarını ne şekilde etkileyeceği hakkında farklı fikirler öne sürülmüştür. Yapılan bir çalışmada, sperm DNA hasarının IVF klinik gebelik oranlarını olumsuz etkilediği, ancak ICSI işlemi uygulanan gebeliklere etkisi olmadığı gösterilmiştir [71]. Başka bir çalışmada ise, infertil erkeklerin DNA bütünlüğünün incelenmesinin klinikte bir sonuç veremeyeceği bildirilmiştir [72]. Bu çalışmalardan farklı olarak, özellikle DNA hasarı ile klinik gebelikler arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [73].

ICSI işlemi uygulanan kadın hastaların folikül sıvılarındaki oksidatif stres ölçümleri, bu sıvıdaki ROT'nin gebeliği olumsuz etkilediğini göstermiştir [74]. ICSI tedavisi gören hastaların incelendiği başka bir çalışmada, kültür ortamındaki embriyoların 3. günde gösterdikleri artmış ROT seviyesinin, blastosist gelişme hızını ve klinik gebeliği olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir [75].

4.3. Hücresel Sinyal İletim Mekanizmaları

Çok hücreli organizmalar canlılığın devamı için özelleşmiş bir hücrelerarası iletişim ağına sahiptirler. Hücreler, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve buldukları doku içerisindeki organizasyonlarını düzenlemek ve koordine edebilmek için birbirleri ile ilişki kurmaktadır. Hücreler arasındaki haberleşme, çevreden veya başka hücrelerden alınan uyarının yani 'hücre sinyali'nin spesifik bir cevap oluşturulmak üzere, hücre içine iletilmesi şeklinde gerçekleşmektedir [76]. Ligand – reseptör ilişkisi kurulduğunda, ilgili moleküller ve yolaklar aktif hale gelmektedir.

Uyarı molekülleri hücreye iki şekilde girmektedir. Biri suda çözünmeyen, sadece özel taşıyıcı proteinlere bağlanarak taşınan, steroid hormon reseptörleri olan, hücre içi reseptörlerdir. Diğer ise, suda çözünen hormon reseptörleri, yani hücre yüzey reseptörleridir. Bunlar, hidrofilik özellik gösterir, hedef hücre yüzeyindeki reseptör proteine bağlanıp görevini yerine getirmektedir (Şekil 4.3.1).

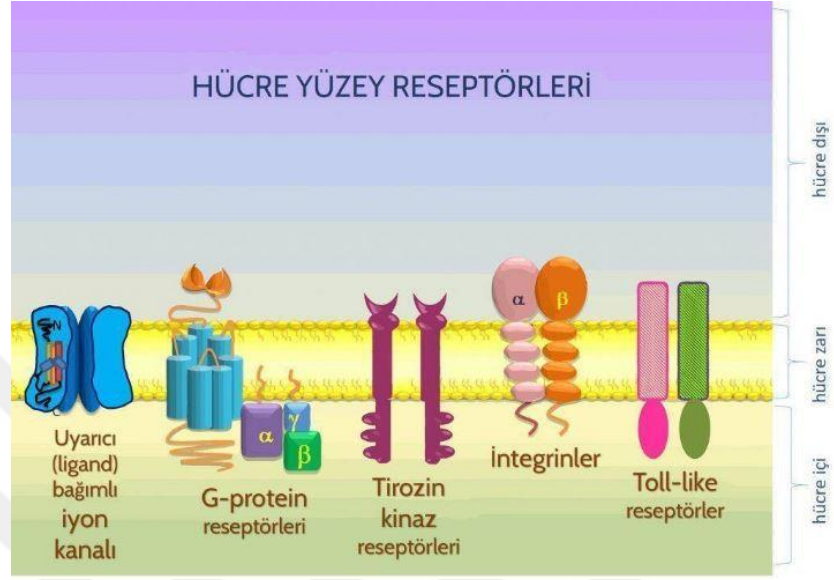


Şekil 4.3.1: Hücre yüzey reseptörlerinin etki mekanizması. Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Molecular Biology Of The Cell 4th ed.)

Hücre yüzey reseptörleri, yani suda çözünür hormon reseptörleri, uyarıyı iletim sistemlerine göre sınıflandırılmaktadır. Hücre yüzey reseptörleri; iyon kanalına bağlı, G proteinine bağlı ve enzime bağlı reseptörler olarak ayrılırlar (Şekil 4.3.2).

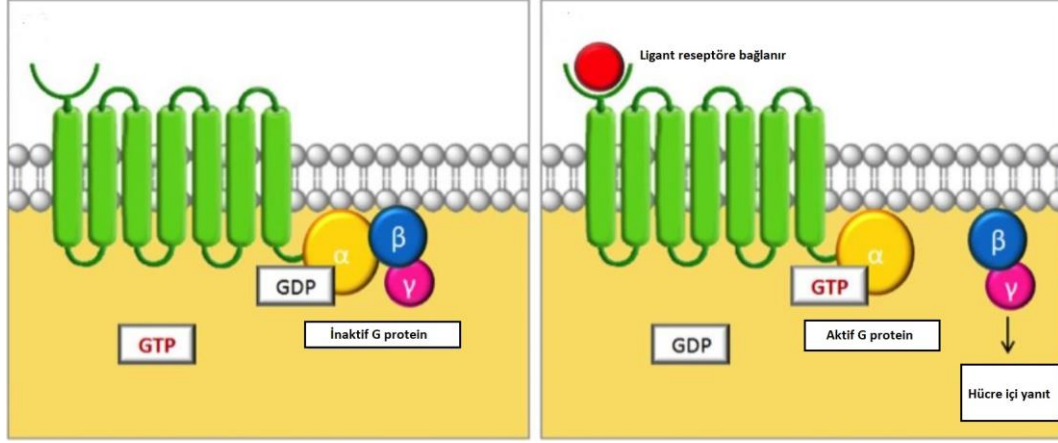
Enzime bağlı hücre yüzey reseptörleri, ligandın bağlandığı bölümü hücre membranının ekstrasellüler yüzeyinde kalacak şekilde membrana oturmuş, transmembran proteinleridir. Bilinen 5 sınıfı bulunmaktadır. Bunlardan bir grubu, büyüme faktör reseptörü olarak adlandırılan, sinyal proteinlerinin tirozin kalıntılarını fosforilleyen, ‘tirozin kinaz reseptörleri’dir (RTK). Tirozin kinaz reseptörleri, EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) reseptörü, NGF (Nöronal Büyüme Faktörü) reseptörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörü ve insülin reseptörlerini kapsamaktadır. Hücre sitozolünde, cGMP sentezini katalizleyen ‘guanilat siklaz reseptörleri’, ‘tirozin kinazla birleşmiş reseptörler’, zara bağlı veya sitozolde çözülmüş olarak bulunan ‘tirozin fosfataz reseptörleri’ ile TGF- β (transforme edici

büyüme faktörü-beta) ailesi üyeleri gibi, serin ve treonin kalıntılarını fosforilleyen ‘serin-treonin kinaz reseptörleri’ bulunmaktadır.



Şekil 4.3.2:Hücre yüzey reseptörleri. (picscience.net)

Hücre yüzey reseptör grubunun en yaygın üyeleri G proteinine bağlı reseptörlerdir [77] (Şekil 4.3.3). G proteini (trimerik GTP bağlayıcı proteinler), hücre yüzeyindeki reseptörler ile hücre zarına bağlı hedef proteinler arasındaki ilişkiyi kurar. Hücre içerisindeki hedef proteini, bir enzim veya iyon kanalı olabilir. Hücre içerisindeki hedef proteinlerin aktivasyonu ‘hücre içi ikinci haberci’ olarak adlandırılan, hücre içi habercilerin konsantrasyonunu değiştirmektedir. Tanımlanmış hücre içinde ikinci haberciler; halkasal adenosin 3', 5'-monofosfat (cAMP), halkasal guanozin 3', 5' monofosfat (cGMP), 1,2 diaçilgiserol (DAG), inositol 1,4,5 trifosfat (IP3) ve kalsiyumdur (Ca²⁺). Hücrede en sık kullanılan ikinci habercilerden biri cAMP' tir [77].

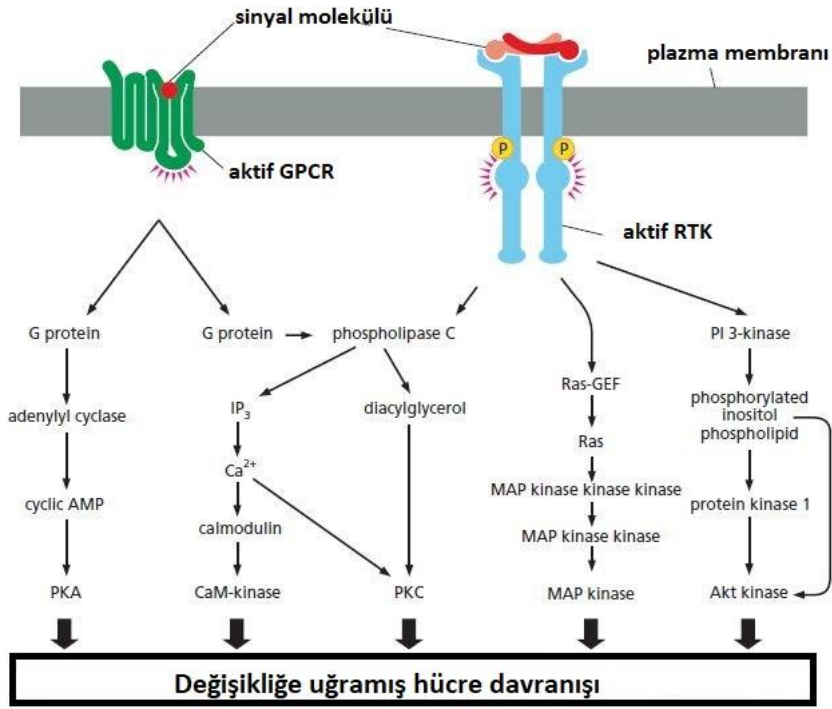


Şekil 4.3.3: G-protein yapısı. (Capper MJ., 2018)

Hücrede apoptoz, proliferasyon, gen ekspresyonu gibi hücresel cevapların tümü, hücre içi sinyal yolları vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Hücre içerisindeki birçok yolak birbiriyle ilişkili şekilde çalıştığı halde en temel olanları cAMP, cGMP, Fosfolipaz C-Ca²⁺, NF-Kb transkripsiyon, Ca²⁺ – kalmodülin, MAP kinaz (mitojenle aktiflenen protein kinaz), JAK-STAT ve PI3K yollarıdır [78].

cGMP'nin sentezi, nitrik okside duyarlı olan guanilat siklaz tarafından gerçekleştirilir. Bu molekül, sinir, dolaşım ve bağışıklık sistemlerinde rol oynamaktadır. RTK'ya bağlanan fosfolipaz C, aktif hale gelir, bir membran lipiti olan fosfotidil inositol 4,5 bifosfatın (PIP2), inozitol 1,4,5 trifosfata (IP3) ve diaçilgliserole (DAG) hidrolizini gerçekleştirir. DAG, protein kinaz C (PKC) yolunu aktifleştirerek hücre çoğalmasında etkili olan bir moleküldür. IP3 ise hücre içi Ca²⁺ depolarından Ca²⁺ salınımını uyarır [78] (Şekil 4.3.4).

Hücrede aktif hale gelen reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar), hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını uyararak Ras – Raf – MAP kinaz yolunu aktive eder. MAP kinazlar transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını sağlar. JAK-STAT yolağı ise hematopoetik hücre gelişiminde rol oynamaktadır [79].



Şekil 4.3.4. : Hücresel sinyal iletim yolları. (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Molecular Biology Of The Cell 4th ed.)

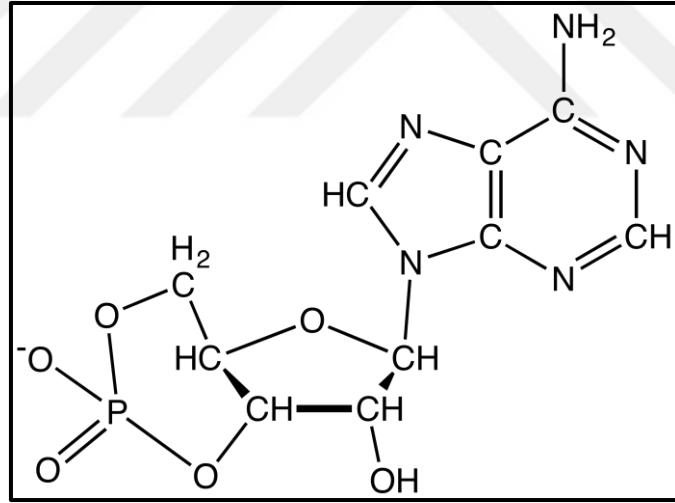
ATP'den adenilat siklaz yardımıyla sentezlenen cAMP, PKA'yı aktive edip seçili proteinlerin serin ve treonin kalıntıları fosforile etmesini sağlar. Hayvan hücresinde hücre proliferasyonu, hücre sağ kalımı ve hücre farklılaşmasında etkilidir. Ayrıca cAMP'ın PKA'yı aktif hale getirmesiyle hücre çekirdeğine göç eden PKA, CRE'ye (cAMP cevap elementi) bağlı proteini (CREB) fosforlar. CREB, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasından sorumlu gen dizilimini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür [78].

4.3.1. cAMP Bağımlı PKA Yolağı

cAMP bağımlı PKA yolağı, çok çeşitli organizmalarda yaşam süreci için gereklidir. cAMP, kalp atış hızındaki artış, kortizol sekresyonu, glikojen ve yağın parçalanması gibi birçok değişik hücresel olaya aracılık eder [80]. cAMP, hafıza, kalpte gevşeme süreci ve böbrekte emilen suyun korunmasında da gerekli bir

moleküldür. Bu yol, enzim aktivasyonu ile gen ekspresyonunu düzenler. Var olan enzimin aktivasyonu çok daha hızlı bir süreçken, gen ifadesinin düzenlenmesi uzundur ve saatler sürebilir [81]. cAMP yolunun incelenmesi, cAMP'in fonksiyon kaybı (inhibisyon) ve fonksiyon kazanımı (artışı) yoluyla yapılmaktadır. cAMP'a bağlı yol kontrol edilmezse, hiper proliferasyona yol açabilir ve bu da kanser gelişimi de dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte sorun oluşturabilir [80].

Halkasal adenosin 3', 5'-monofosfat (cAMP), ilk olarak 1950 yıllarında, küçük bir hücre içi haberci olarak tanımlanmıştır [78]. cAMP, çeşitli hücre tiplerinde hücre içi sinyal iletiminde ikinci haberci olarak görev gören bir nükleotittir [82] (Şekil 4.3.1.1).

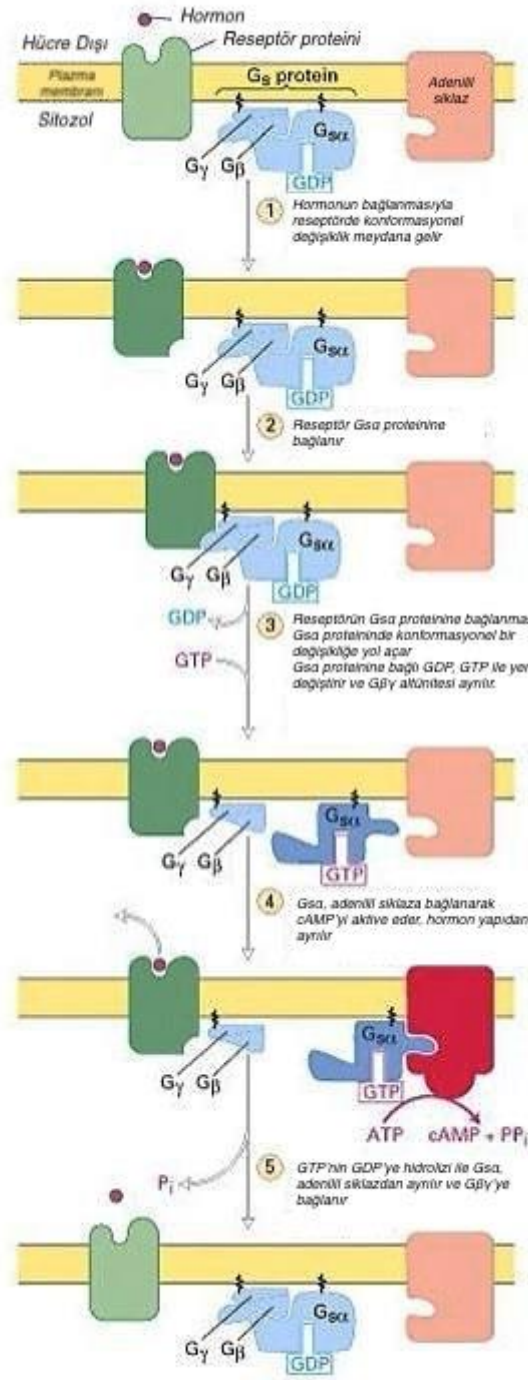


Şekil 4.3.1.1. : cAMP moleküler yapısı

cAMP, bütün prokaryot ve ökaryot hücrelerinde bulunmaktadır. Hücre içi konsantrasyonu 10^{-7} M'dır [77]. Hücre içindeki görevini yerine getirebilmesi için konsantrasyonu çok hızlı bir şekilde azaltabilmekte veya çoğalabilmektedir. Hücre dışından bir sinyal geldiğinde cAMP konsantrasyonu saniyenin yirmi katından hızlı değişebilmektedir. cAMP, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, gen transkripsiyonu

ve protein ekspresyonu gibi çeşitli hücresele fonksiyonları düzenlemektedir [82, 83]. 1970 yılında Martin Rodbell ve arkadaşları, hücre içinde bulunan ikinci haberci olan cAMP'nin, hücre zarına bağı olarak bulunan bir enzim olan adenilat siklaz tarafından aktifleştirildiğini bildirmişlerdir.

Hücre yüzey reseptörlerinden biri olan G protein reseptörleri; adenilat siklaz gibi enzimleri aktif hale getirdikleri için 'uyarıcı (stimulatory) G protein' yani G_s protein olarak da adlandırılmaktadır. G_s proteinlerine GTP bağlanırsa aktif, GDP bağlanırsa inaktif hale geçmektedirler (Şekil 4.3.1.2). G_s proteinleri α , β ve γ olmak üzere 3 farklı polipeptidden oluşmaktadır (Şekil 4.3.1.2). G_s proteinlerinin α bölümü GTP'yi kendine bağlayarak adenilat siklazı aktifleştirmekte ve GTP'yi hidroliz edebilmektedir. G_s proteinlerinin β ve γ bölümleri birlikte bir kompleks oluşturarak, G_s proteinlerinin hücre zarının sitoplazmik yüzeyine bağlanmasını sağlamaktadır. GDP bağı G_s proteinleri inaktif durumdayken, hücre dışından gelen bir ligand tarafından uyarılan hücre yüzeyindeki reseptörler, G_s proteinlerinin α alt birimine GDP yerine GTP'nin geçmesini sağlar. GTP bağı olan α alt birimi ayrılıp hücre yüzeyinde bulunan adenil siklaz enzimine bağlanarak adenil siklazın ATP yardımı ile cAMP'ı sentezlemesini sağlar. cAMP sentezlenme süreci çok hızlı meydana gelir ve etkisi kısa sürer. cAMP'ın oluşumunu takiben G_s proteinlerinin α alt birimi, hızla GTP'yi hidrolize edip $\beta\gamma$ kompleksiyle yeniden birleşir ve adenilat siklazı inaktifleştirip GDP bağı inaktif durumdaki G_s proteinlerini oluşturur (Şekil 4.3.1.2).



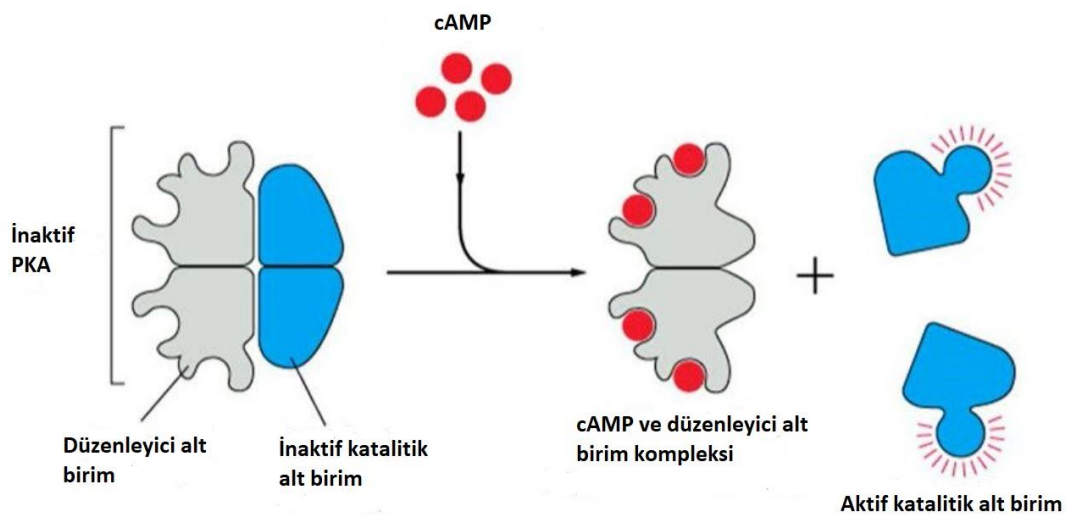
Şekil 4.3.1.2: cAMP sentezi. (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Molecular Biology Of The Cell 4th ed.)

cAMP, fosfodiesterazlar (PDE) tarafından bozunabilmektedir. PDE, hücre zarında bulunan aktifleştirilmiş adenilat siklaz tarafından sentezlenip, hücre içi ikinci haberci moleküllerinin hidrolizini katalize eden bir enzimdir [84,85].

Litaratürde, cAMP sinyal yolağını da içine alan hücre içi ikinci habercilerin, iltihap [86], kanser [87], miyokard atrofisi [88] ve depresyon [89] da dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca hücrelerde biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan cAMP sinyal yolunun, nörotransmitter sentezinin düzenlenmesi [90], transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi [91] gibi fonksiyonları sayesinde, çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve hatta tedavi edilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir [92,93].

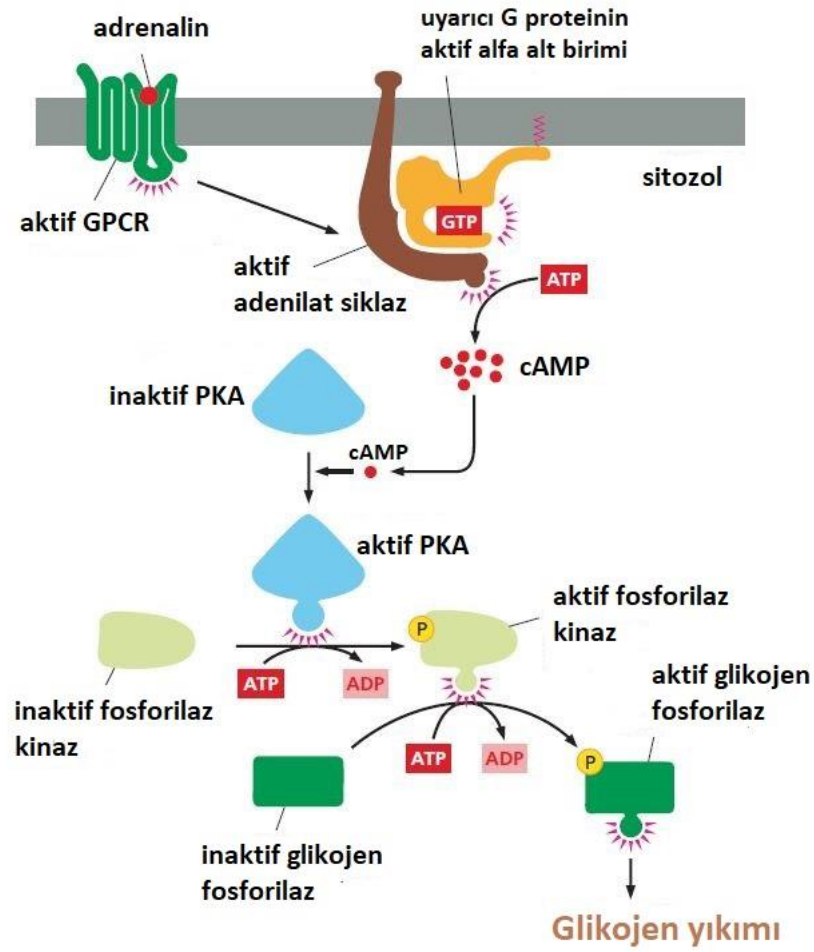
Adenilat siklaz, ATP'yi cAMP'a dönüştürerek cAMP'a bağımlı protein kinaz A enzimini aktifleştirir. Aktifleşen PKA, bazı spesifik proteinleri hücrel reaksiyonları başlatmak üzere fosforile etmektedir [94].

Protein kinaz A'nın yapısında iki adet düzenleyici ve iki adet de katalitik alt birimden oluşmaktadır. Sitozolda konsantrasyonu artmış olan cAMP, düzenleyici alt birimlere bağlanıp, katalitik alt birimlerin düzenleyici alt birimlerden ayrılmasına neden olur. Ayrılan katalitik alt birimler, çok sayıda fosforilaz kinaz molekülünü fosforlamak üzere aktifleşir [77] (Şekil 4.3.1.3). PKA, hedef proteinine fosfat grubu bağlayıp yapısını değiştirerek, hedef proteininin aktivitesini düzenlemektedir.



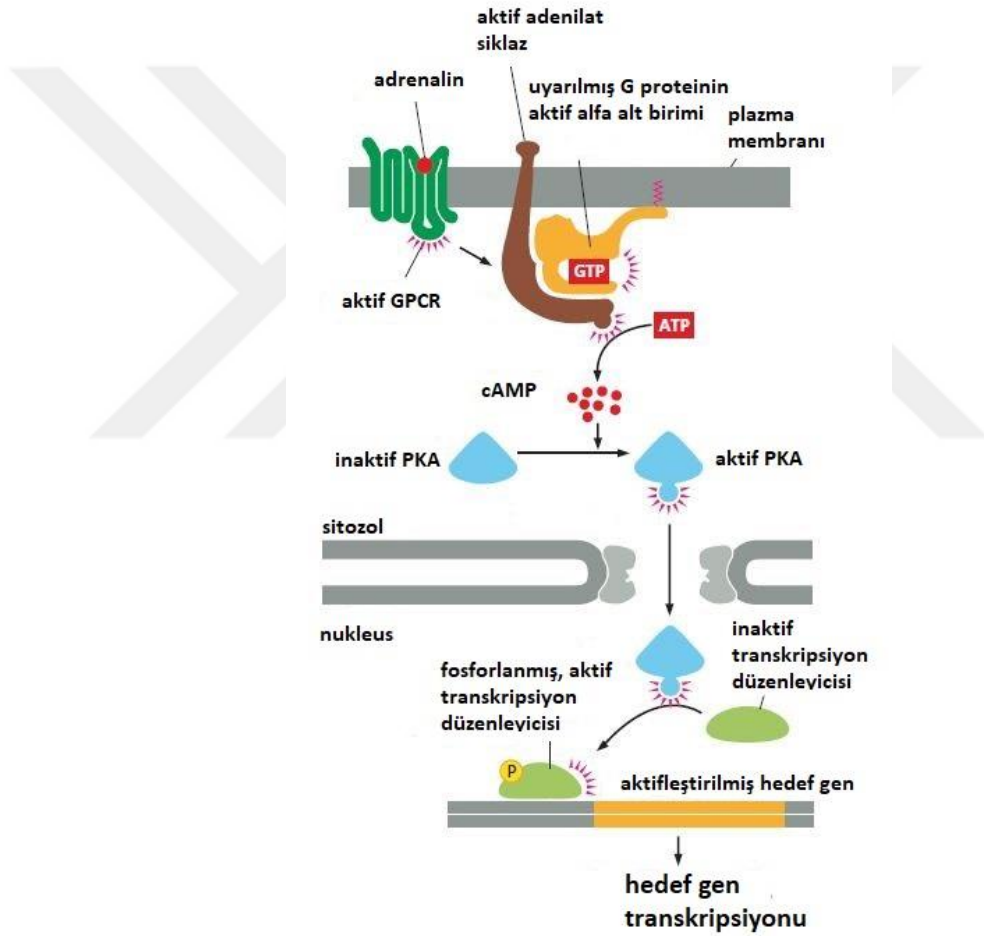
Şekil 4.3.1.3: PKA yapısı (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Molecular Biology Of The Cell 4th ed.)

cAMP tarafından düzenlenen fosforilasyon, ilk olarak glikojen metabolizması ile gösterilmiştir [78]. Glikojenin depo şekli olan glukozu yıkımı, böbrek üstü bezlerinden kana salgılanan adrenalin tarafından düzenlenmektedir. Salgılanan adrenalin, adenilat siklazı aktive ederek cAMP'ın hücre içi konsantrasyonunu hızla artırır, sentezlenen cAMP, PKA'yı aktive eder. Aktifleşen PKA, fosforilaz kinaz ve glikojen sentaz denilen iki enzimi fosforlayıp glikojen metabolizmasını düzenler [77] (Şekil 4.3.1.4).



Şekil 4.3.1.4: cAMP tarafından düzenlenen glikojen metabolizması. (Alberts B., Essential cell biology 4th ed.)

cAMP fonksiyonunun ilk hedeflerinden biri PKA'dır. Hücrede hormonal stimülasyona, fosforilasyonu katalizleyerek cevap oluşturur. DNA replikasyonu [95,96], aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi [97], hücre büyümesi [98] gibi birçok hücre fonksiyonunda rol alan önemli bir düzenleyici enzimdir. Yapılan çalışmalarda, PKA'nın aracılık ettiği cAMP'nin, endokrin, kardiyovasküler, nöronal ve immün fonksiyonların da dahil olduğu birçok fizyolojik işlemlerin düzenleyicisi olduğu da gösterilmiştir [99-101] (Şekil 4.3.1.5).



Şekil 4.3.1.5. : PKA aktivasyonu (Alberts B., Essential cell biology 4th ed.)

4.4. Sperm Hücresinde cAMP Bağımlı PKA Yoluğu

Bütün hücrelerde olduğu gibi sperm hücresinde de metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesi, hücre içi sinyal iletim mekanizmasıyla gerçekleşir. Spermde sinyal

iletiminde, birçok molekül ve yolak görev almaktadır. Literatürde bildirilen ve spermde rol alan sinyal yolları arasında, MAP kinaz ailesinin alt grupları [102-105], PI3K ve AKT bulunmaktadır [106-108]. MAP kinaz ailesinin alt grupları olan ERK, JNK ve p38 izoformları sertoli ve germ hücrelerinde tanımlanmıştır [102] ve spermatogenez sürecinde fonksiyonel rol aldıkları gösterilmiştir [103]. Kapasitasyon sürecindeki sperm hücresinin hareketliliğini kazanmasında ve sperm-oosit füzyonunu gerçekleştirebilmesinde MAPK yolağının rol aldığı gösterilmiştir [105]. Protein kinaz B (PKB) olarak da adlandırılan AKT, somatik hücrelerde hayatta kalma ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynamaktadır [109]. Bu yolağın ilk bileşeni olan PI3K ve AKT yolağının sperm motilitesini ve sperm canlılığını düzenlediği gösterilmiştir [106-107]. AKT sperm kapasitasyon sürecini baskılamakta ve spermin yaşlanmasına ve ölümüne yol açan apoptotik kaskada girmesini önlemektedir [108]. Biz çalışmamızda, cAMP bağımlı PKA yolağını inceleyeceğiz.

cAMP'nin, 1950'lerdeki keşfinden itibaren yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Başlangıçta cAMP'ın tek hedefinin PKA olduğu düşünülmüş olsa da, sonraları hedeflerinin arasında RAP guanin-nükleotid değişim faktörü (GEF) EPAC [110-111] ve siklik-nükleotid-geçitli iyon kanalları da [112] olduğu gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, cAMP'ın sentezinin, adenilat siklazı kodlayan 10 ayrı genin ürünleri tarafından gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Bunlardan dokuzu (Adcy1-9), transmembran adenilat siklaz (tmAC) izoformları ailesinin üyelerini kodlamaktadır. Tüm izoformlar, G proteinleri tarafından düzenlenmekte ve diterpen forskolin (fosfodiesteraz) tarafından aktive edilmektedir [113].

Tek bir atipik adenilat siklaz ise (Adcy10, aka sAC, SACY-soluble adenilat siklaz) [114], alternatif birleştirme ile çoklu izoformlar oluşturmaktadır [115-116]. Bunlar, G proteinin regülasyonuna karşı duyarsız olmaları ile tmAC'lardan ayrılmaktadırlar [117]. sAC ilk olarak sıçan testisinde yapılan bir çalışmada bulunup 'çözünür' adenilat siklaz olarak tanımlanmıştır [118]. sAC'ye ait en belirgin özellik ise HCO^{-3} tarafından doğrudan uyarılması ve bu sayede hücrede CO^2 sensörü olarak işlev görmesidir [114]. Seminal plazmadaki HCO^{-3} 'ün, sperm hücresinde cAMP seviyesinin hızla artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir [119-120]. Ayrıca farklı

çalışmalarda, sAC yokluğunda spermin hiperaktivasyona uğramadığı ve in-vitro olarak döllenenmediği bildirilmiştir [121,122].

Sperm hücresi testisten ayrıldıktan sonra morfolojik olarak olgunlaşmıştır ancak kapasitasyon kazanamadığı için fertilizasyon sürecini tamamlayamamaktadır. Fertilizasyon için gerekli olan kapasitasyonu tamamlamasını sağlayan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bilindiği kadarıyla sperm hücresinin kapasitasyonun kazanması için önce, kapasitasyondan sorumlu sinyal yollarının aktivasyonu ve epididimal epitel tarafından salgılanan proteinlerin erkek üreme kanalına eklenmesi gerekmektedir. Bu işlemler sırasında sperm, kademeli olarak kapasitasyon kazanır [123]. Memeli sperminin kapasitasyon sürecini tamamlayıp fertilizasyon yeteneğini dişi üreme kanalında (oosit kanalı lümeninde) bir süre kalarak elde ettiği bulgusu, ilk olarak 1951'de, tavşan ve sıçanlarda ortaya konmuştur [124,125]. 1952'de ise fertilizasyon yeteneğini kazanma süreci 'kapasitasyon' olarak adlandırılmıştır [126]. Bir çalışmada, bir süre domuz üreme kanalında inkübe edilen domuz sperminin, zonası bulunmayan fare yumurtasına penetrasyonunun gerçekteştiğini bildirmektedir. Bu çalışmadan yola çıkararak, dişi üreme kanalında geçirilen kapasitasyon sürecinin farklı türler arasında da benzer olabileceği fikri ortaya atılmıştır [127].

Birçok çalışmada cAMP'nin, motilite [128] ile hiperaktivasyon olarak bilinen, hareketlilik düzenindeki değişiklikler ve akrozom reaksiyonuna girme [129] yeteneğinin geliştirilmesi dahil, kapasitasyon [130-133] sırasında meydana gelen olaylar için gerekli olduğu rapor edilmiştir. cAMP'nin sperm üzerindeki etkilerinin çoğunun, PKA'nın aktivasyonuna aracılık ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır [134].

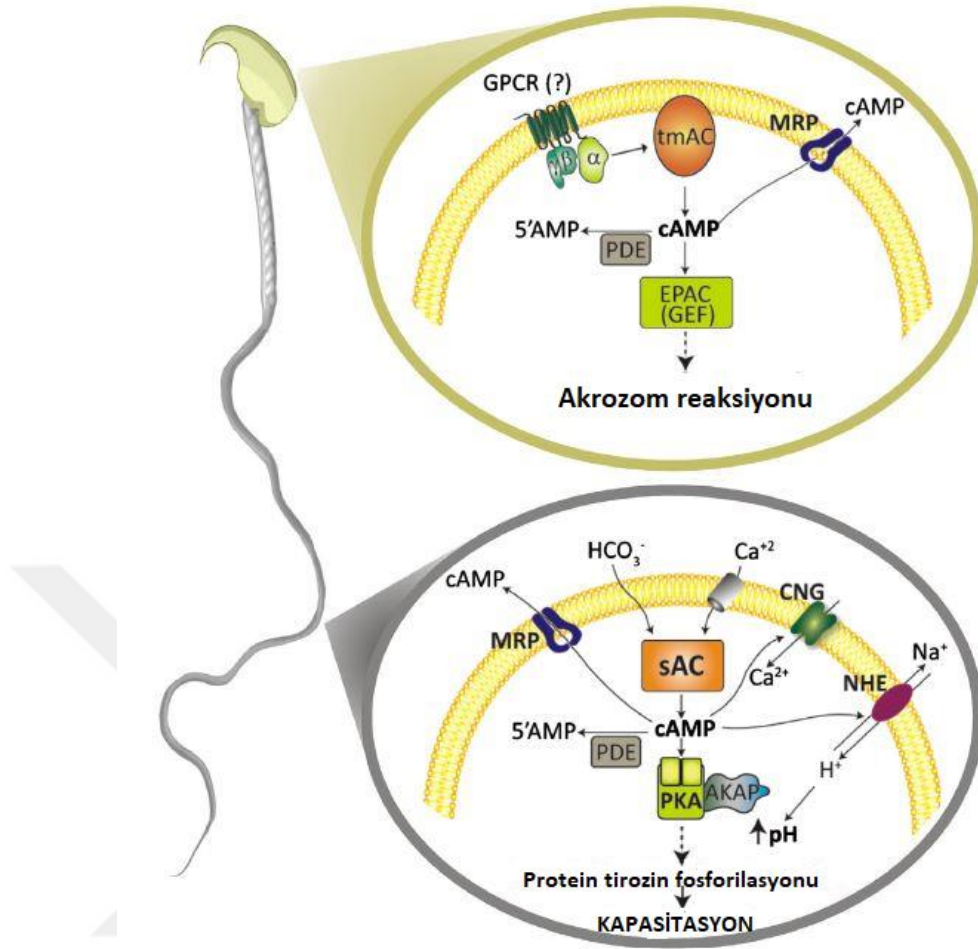
Kapasitasyon sürecinde, sperm plazma membranında bulunan kolesterol, albümin tarafından uzaklaştırılır. Bu durum, membran geçirgenliğinin artmasına neden olur [135,136]. Ardından HCO^{-3} [137,138] ve membran kanallarının [139] da uyarılmasıyla sitozoldeki Ca^{+2} miktarı artar. Artan Ca^{+2} , sAC'yi uyararak cAMP'in sentezlenmesini sağlar [121] (şekil 4.4.1).

Sperm kapasitasyon sürecinde özellikle HCO^{-3} ve sAC büyük önem arz etmektedir. cAMP sentezini, HCO^{-3} tarafından aktive edilen sAC, gerçekleştirir. Sentezlenen cAMP, PKA'yı aktive eder. Ejakülasyonundan önce seminal plazma içeriğinde düşük seviyede HCO^{-3} konsantrasyonu gözlenmesine karşın [140], ejakülasyondan sonra seminal plazmada ve daha sonra da dişi üreme kanalında HCO^{-3} konsantrasyonunda kapasitasyon için gerekli olan bir artış gerçekleşmektedir.

HCO^{-3} 'ın bulunmadığı kapasitasyon ortamında inkübe edilmiş domuz sperm hücrelerini içeren sitoplazmik damlacıkların zona pellucidaya bağlanamadıkları bildirilmiştir [141]. Bu nedenle, fonksiyonel olarak hazırlanmış sperm hücrelerinin zona pellucida ile etkileşime girebilmesi ve fertilizasyonu sağlayabilmesi için, kolesterol organizasyonunda değişiklikler gerekmektedir. Kapasitasyon sürecinde sperm plazma membranındaki kolesterol miktar ve dağılımı değişikliğe uğramaktadır. Plazma membranında bulunan kolesteroldeki değişiklikler spermde bulunan sinyal yollarını düzenler. Kapasitasyon süreci sperm plazma membranını daha az stabil hale getirmektedir [142].

Sperm hücre membranından kolesterolü çıkaran bir ajan olan siklodekstrin kullanılan bir çalışmada, sperm hücrelerinin HCO^{-3} bulunmayan ortamda siklodekstrin ile inkübe edilmesinin, PKA aktivasyonunu [143] ve PTP düzeyini [144] artırdığı gözlenmiştir [135,136]. HCO^{-3} , sperm hücrelerinin plazma membranında meydana gelen albümin aracılı kolesterol ekstraksiyonu sonucunda kolesterolün dağılımını, diğer bir deyişle sperm lipit membranını yeniden düzenlemektedir [142,145].

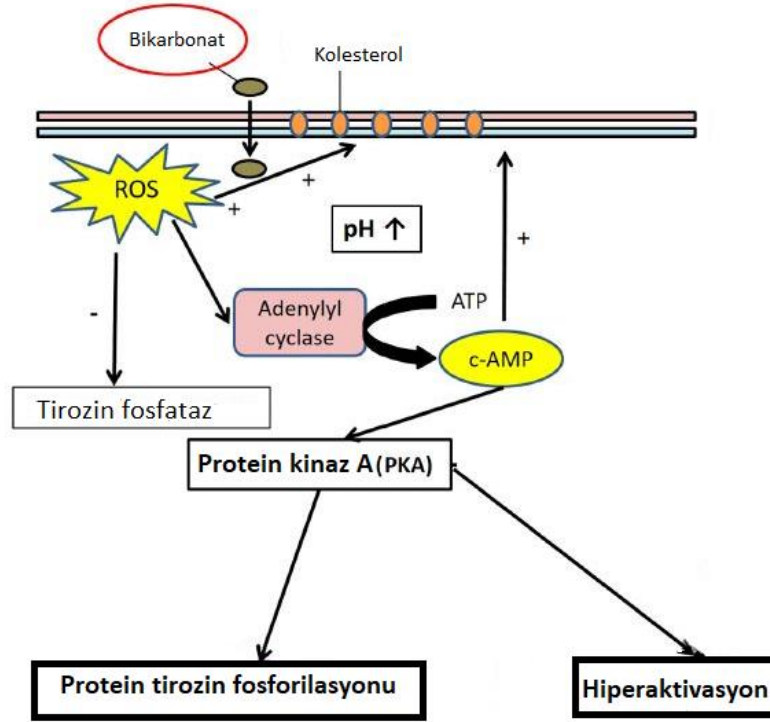
Sperm membran hiperpolarizasyonunun da kapasitasyon sürecine dahil olduğu gösterilmiştir [146]. Hiperpolarizasyon, hücre içi negatif yüklerde bir artış anlamına gelmektedir. HCO^{-3} , kapasitasyona bağlı membran hiperpolarizasyonuna neden olur. HCO_3 aracılı hiperpolarizasyon Na^{+} 'a bağımlıdır ve sonucunda pH artışına yol açar [147]. Artmış hücre içi pH da progresif hareketlilik ve kapasitasyon gibi çeşitli memeli sperm fonksiyonlarının kontrolünde rol oynamaktadır [148,149].



Şekil 4.4.1: Sperm hücresinde cAMP bağımlı PKA yolağının işlevi. (Buffone MG., 2014)

4.5. Semendeki Oksidatif Stresin cAMP Bağımlı PKA Yolağına Etkisi

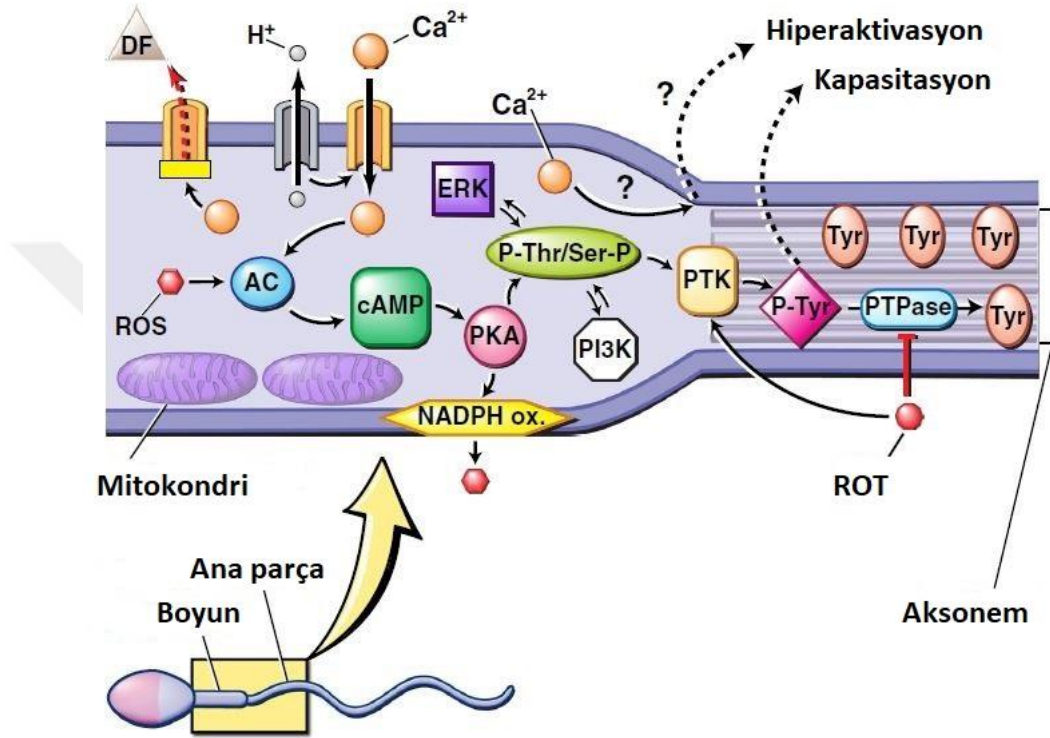
ROT, spermde olgunlaşma, aktivasyon, kapasitasyon ve akrozomal reaksiyon gibi fonksiyonel yeterlilik kazanımı için gerekli olan bir uyarıcı moleküdür [12]. Spermde bulunan ROT, AC'yi uyararak cAMP üretimini indükler. Sentezlenen cAMP ise PKA molekülünü aktive eder [13]. Sonrasında PKA, tirozin kinazların aktivasyonu ve/veya protein fosfatazların inhibisyonuyla, protein fosforilasyonunu artırır. Artmış protein fosforilasyonu kapasitasyonu uyarmaktadır [150].



Şekil 4.5.1: Protein tirozin fosforilasyonu ve kapasitasyon oluşumu. (Leemans B., 2019)

Sperm hücreleri, ejakülasyondan sonra kadın genital kanalında kapasitasyon adı verilen bir olgunlaşma sürecine girmektedir. Spermde meydana gelen bu değişiklikler, oosit zona pellucidasına penetre olup bunu takiben oositle kaynaşmasını sağlamaktadır. Sperm hücrelerinin fertilizasyonu gerçekleştirebilmesi için kazanması gereken özelliklerden biri de hiperaktivasyon yeteneğidir. Hiperaktivasyon, kapasitasyon sürecinin içerisine dahil edilmekte olup artmış ve lineer olmayan sperm hareketliliği olarak tanımlanmaktadır. ROS'un sperm hiperaktivasyon kazanımı sürecinde olumlu yönde etkileri bulunmaktadır [151]. Ca^{+2} iyonları ve ROS (özellikle O_2^-) [152], adenilat siklazı uyarak cAMP üretimini indükler. Üretilen cAMP'nin PKA'yı aktif hale getirmesiyle NADPH oksidazı tetikler ve daha fazla ROS oluşumuna neden olur. Aktif hale gelen PKA ayrıca, protein tirozin kinazı aktive edebilen serin ve tirozin kalıntılarını fosforile eder. Sonuç olarak PTK, aksonem ve sperm kuyruğunun hücre iskeleti etrafını saran lifli kılıftaki tirozin kalıntılarının fosforilasyonunu tetiklemektedir.

Reaktif oksijen türlerinden biri olan H_2O_2 , PTK'yı indüklemekte bu sayede tirozin fosforilasyonunu arttırmaktadır. Artmış tirozin fosforilasyonu, hiperaktivasyonun tamamlandığını göstermektedir [12,13] (Şekil 4.5.2).



Şekil 4.5.2: Sperm hücresinde kapasitasyon ve hiperaktivasyonun regülasyonu. (Du Plessis SS.,2015)

Semde fizyolojik koşullar altında üretilen ROT, sperm hücresinin kapasitasyon kazanmasında ve akrozom reaksiyonuna girmesinde rol oynamaktadır [152,153]. Sürekli olarak üretilen endojen ROT, sperm hücresinin olgunlaşma sürecinde hücre içi fosforilasyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır. Donà ve ark. [154] yaptıkları çalışmada, endojen ROT'un eşik seviyesinin 0,05 ile 0,1 RLU (bağlı ışık birimleri) arasında değiştiğini ve bu değerlerin dışına çıkan ROT seviyesinin sperm hücresindeki moleküler mekanizmaları ve apoptoz ile sonlanabilecek hücre işlev bozukluklarına neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, fertilizasyonun gerçekleşmek üzere kapasitasyonunu tamamlamış ve hiperaktivasyon kazanmış sperm hücresi, oositin etrafındaki kümülüs hücrelerini geçip oosit ile birleşimi sağlayacak akrozomal reaksiyonlar için, hücre içerisindeki Ca^{+2} akışının cAMP ve PKA miktarını artırmasıyla oluşan protein tirozin fosforilasyona ihtiyaç duyar. ROT'un da plazma membran proteinlerinin fosforilasyonları dahil sperm hücresinin bu eylemlerini gerçekleştirmesi için aracılık ettiği gösterilmiştir [12].

Bütün hücrelerde olduğu gibi sperm hücrelerinde de, hücre içi sinyal iletimi sperm fiziolojisi açısından çok önemli bir rol oynamaktadır. Hücre içi ikinci haberci olan cAMP ve onun hedeflerinden biri olan PKA sinyal yolağı, spermin fertilizasyon sağlamada ihtiyacı olan hiperaktivasyon ve kapasitasyon yeteneklerini kazanmasında anahtar rol oynamaktadır [123].

Biz de çalışmamızda, tüp bebek merkezine başvuran ve geleneksel semen analizi sonucuna göre normozoospermi tanısı alan normal sperm değerlerine sahip hastaların, seminal oksidatif stres seviyesini ve oluşabilecek oksidatif hasarın sperm hücreleri üzerine hücresel, genetik ve fonksiyonel etkilerini ve bu spermeler kullanılarak yapılan bir tüp bebek (ICSI) tedavisinde, tedavinin başarı ölçütlerine etkilerini araştırmayı hedefledik.

5. MATERYAL VE METOT

Projemizin deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nde ve İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde (REMER) gerçekleşmiştir. Hastaların tüp bebek tedavisi ve ICSI işlemleri ise Çamlıca Medicana Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'nde yapılmıştır.

5.1. Etik Onayı

Etik onayı İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

5.2. Hastaların Seçilmesi ve Sperm Örneklerinin Toplanması

İnfertilite nedeniyle Çamlıca Medicana Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvurup ICSI tedavisine alınan 40 çift çalışmaya alınmıştır. Semen örnekleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ, 2010) belirlediği semen parametrelerine göre normozoospermi değerlerine sahip erkek hastalar seçilmiştir.

5.3. Hasta Dışlama Kriterleri

Çalışmamıza, 2'den fazla ICSI siklusunda olan çiftler, dondurulmuş embriyo transferi siklusları, preimplantasyon genetik tarama (PGS) ve preimplantasyon genetik tanı (PGT) uygulanan sikluslar dahil edilmemiştir. Ayrıca, azoospermi ve kriptozoospermi belirlenen, spermin testiküler yöntemlerle (TESA/TESE/microTESE) elde edildiği sikluslar, testislerinden cerrahi operasyon geçirmiş, kronik hastalığa sahip, genetik anomali belirlenen son olarak 20 yaşından küçük ve 45 yaşından büyük erkek hastalar çalışmaya alınmamıştır.

5.4. Semen Örneklerinin Hazırlığı

Hastadan alınan semen örneğinin 1 mL'si sperm yıkama ve akabinde ICSI işlemleri için ayrılmıştır. 10'ar µL konsantrasyon, vitalite, morfoloji ve sperm dışı hücre analizi için ayrılmıştır. Geriye kalan semen örneği önce vortekslenip 30 µL'si sperm DNA fragmentasyonu analizi (Geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi) için eppendorf tüpe konulup -20°C'ye kaldırılmıştır. Ardından +4°C, 3500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Seminal plazmadan 30'ar µL cAMP analizi (ELISA), lipid peroksidasyon analizi (MDA analizi) ve TAS-TOS analizi için ayrılmıştır. -20°C'de muhafaza edilmiştir. Semen örneklerinin, sperm yıkama sonrası ICSI işlemi yaptıktan sonra kalan kısmını +4°C, 3500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra sperm kromatin yapı analizi (Toluidine Blue boyama) ve proteinlerin (PKA ve p-PKA) immünohistokimyasal analizi için sperm yayma işlemi yapılmıştır. Lam üzerine 10 µL sperm örneği konulup lamel yardımıyla yayması yapılmıştır ve kapalı serin bir ortamda muhafaza edilmiştir.

5.5. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi

Oksidatif stres ölçümü, ticari olarak satın alınan Rel Assay Diagnostics (Sigma Aldrich) Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) test kitleri kullanılarak ölçülmüş ve hesaplanmıştır (Şekil 5.5.1).

$$\text{Oksidatif stres indeksi} = \text{TOS} / (\text{TAS} * 10)$$

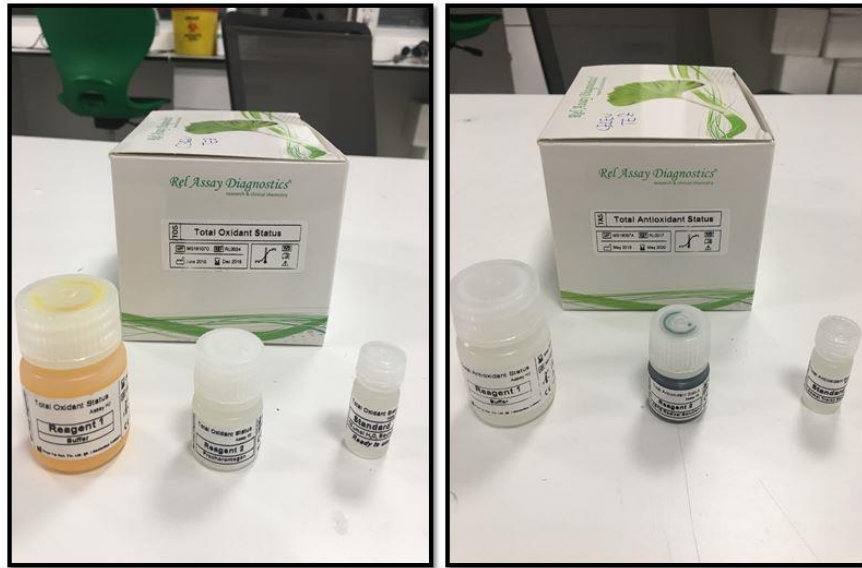
5.5.1. Total Oksidan Seviye Tespiti

Total oksidan seviyesi testi satın alınan kit protokolüne göre uygulanmıştır. Protokole göre; 96 well plate'in kuyucuklarına 7,5 µL semen örneklerinden konulmuştur. Standart 1 olarak ultra distile sudan 7,5 µL, Standart 2 olarak da 7,5 µL kitin içerisinde hazır halde bulunan Stock Stabilized Standart solüsyonundan konulmuştur. Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan Assay Buffer (Reagent 1)'dan 50 µL bütün standart ve semen örneklerinin bulunduğu kuyucuklara

eklenmiştir. Başlangıç absorbansı olarak spektrofotometre (iMAX) ile 530 nm’de ölçüm yapılmıştır. Ölçümden sonra standartların ve semen örneklerinin üzerine 2,5 µL kitin içerisinde bulunan Prokromojen solüsyonu yavaşça eklenmiştir. Oda sıcaklığında hafifçe çalkalayarak 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından spektrofotometre ile 530 nm’de son okuma ölçümü yapılmıştır ve veriler kaydedilmiştir.

5.5.2. Total Antioksidan Seviye Tespiti

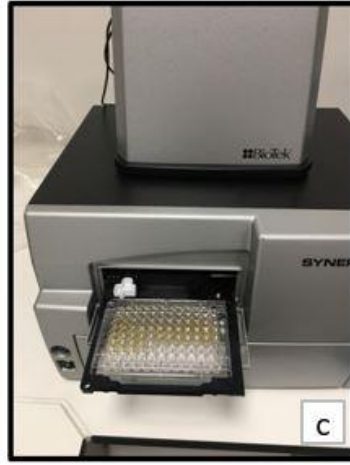
Total antioksidan seviyeleri de ticari olarak satın alınan Rel Assay TAS Kit (Sigma-Aldrich) protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Protokole göre; 96 well plate’in kuyucuklarına 3 µL semen örneklerinden konulmuştur. Standart 1 olarak 3 µL ultra distile su, Standart 2 olarak ise kitin içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan 3 µL 1.0 mmol Trolox Equiv/L kuyucuğa konulmuştur. Kitin içerisinde bulunan Assay Buffer (Reagent 1)’dan 50 µL standartlara ve semen örneklerine eklenmiştir. Başlangıç absorbansı olarak spektrofotometrede 660 nm’de ölçüm yapılmıştır. İlk okuma yapıldıktan sonra standartların ve semen örneklerinin üzerine kitin içerisinde bulunan 7,5 µL Colored ABST Radical solüsyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında hafifçe çalkalayarak 10 dakika inkübe edilmiştir. Spektrofotometrede 660 nm’de son okuma ölçümü yapıp veriler kaydedilmiştir.



Şekil 5.5.1: Oksidatif stres ölçüm kitleri

5.6. Lipit Peroksidasyon Analizi

Lipit peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehid (MDA) tayini ile analiz edilmiştir. MDA analizinin yöntemi MDA ile tiobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesidir. Örnek ve kör tüp olmak üzere 2 adet tüp hazırlanmıştır. Örnek tüpünün içine 50 µL serum ve 0,25 mL 1,22 M trikloroasetik asit (TCA) ilave edilip vorteksle karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnek tüpünün içerisine 0,047 M 0,15 mL tiobarbitürik asit (TBA) eklenip vortekslenmiştir. 30 dakika su banyosu içinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından ticari olarak alınabilen 0,40 mL n-bütanol ilave edilmiş ve vorteksle karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (Şekil 5.6.1.a). Santrifüj işleminden sonra karışımın 0,2 mL'lik bütanol fazı 96 well plate kuyucuklarına koyulmuştur (Şekil 5.6.1.b). Kör tüpüne ise yine 0,2 mL n-bütanol konulmuştur. Örnek tüpünden alınan bütanol fazı köre karşı 532 nm'de okutulmuştur (Şekil 5.6.1.c). MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1.56.10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak sonuç elde edilmiştir [155].



Şekil 5.6.1: Lipit peroksidasyon analizi işlem basamakları.

5.6.1. Solüsyon Hazırlığı

1 M NaOH Hazırlığı

TBA çözeltisi için taze olarak hazırlanmıştır. 4 gr NaOH (Thermo Scientific, Amerika) bir miktar distile su içerisinde çözdürülmüştür. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,047 M TBA Çözeltisi Hazırlığı

Önceden hazırlanıp oda sıcaklığında karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir. 6 mL 1 M NaOH, 500 mg TBA (Sigma Aldrich, Amerika) ile karıştırılmıştır. Karışımın üzerine 69 mL distile su eklenmiştir.

TCA Çözeltisi Hazırlığı

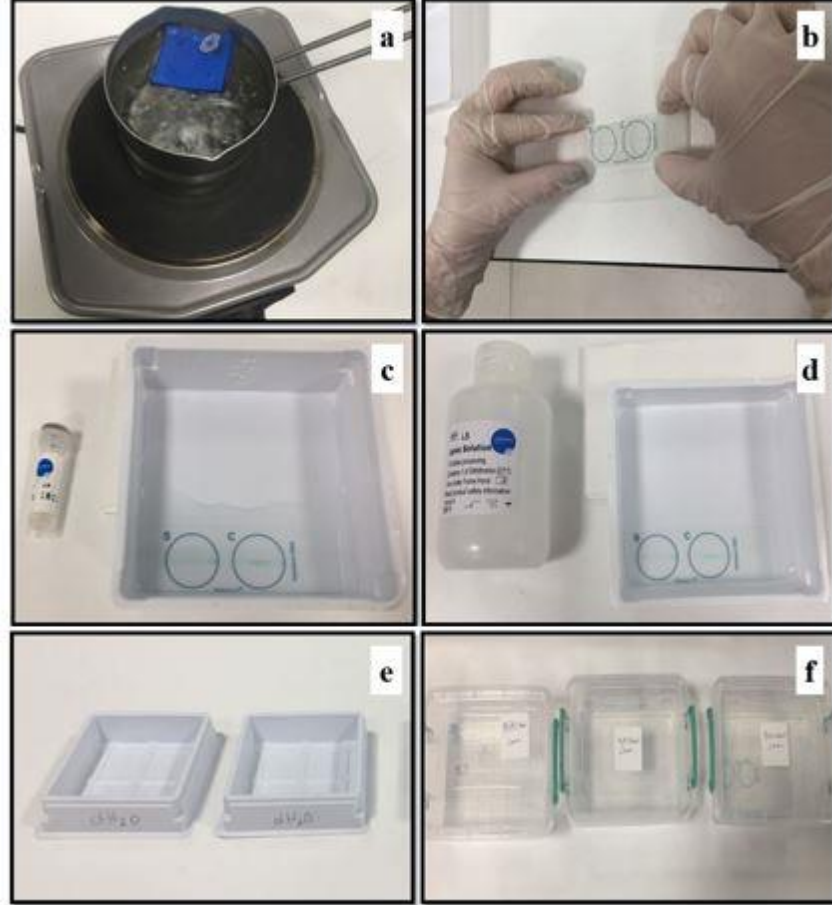
TCA çözeltisi de önceden hazırlanıp oda sıcaklığında karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir. 20 mL TCA (Merck, Almanya), %37'lik 5 mL HCl karıştırılmıştır. Karışımın hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

5.7. Kromatin ve DNA Analizleri

5.7.1. DNA Fragmentasyon Analizi

Sperm DNA fragmentasyonu, geliştirilmiş Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) yöntemi kullanılarak HaloSperm kiti (Halotech DNA SL, Halosperm HT-HS10, İspanya) ile analiz edilmiştir. Halosperm sperm DNA fragmentasyon kiti içerisindeki protokol uygulanmıştır. Kitin içerisinde bulunan agaroz tüp, 95-100⁰C'de su banyosunda 5 dakika boyunca erimesi için bekletilmiştir (Şekil 5.7.1.1.a). Eriyen agaroz jel 5 dakika boyunca 37⁰C'lik etüvde bekletilmiştir. Eppendorf tüpüne 12,5 µL sperm örneği, 20 µL eritilmiş agaroz jel eklenip karıştırılmıştır ve hızlıca kitin içerisinde bulunan super-coated lamlara yayılıp baloncuk bırakmayacak şekilde lam ile kapatılmıştır. Her sperm örneği için aynı işlem uygulanmıştır. Lamellerle kapatılan super-coated lamalar 5 dakika boyunca +4⁰C'de inkübe edilmiştir. Bu sırada bir kaptaki denatürasyon solüsyonu hazırlanmıştır. Kitin içerisinde bulunan denatürasyon ajanından (DA) 80 µL alınıp 10 mL distile su ile karıştırılmıştır. İnkübasyon süresi dolan preparatların lamelleri üzerinden yavaşça kaydırılıp alınmıştır (Şekil 5.7.1.1.b) ve oda sıcaklığında 6 dakika boyunca yatay olarak DA solüsyonunun içerisine bırakılmıştır (Şekil 5.7.1.1.c). Bu sırada kitin içerisinde bulunan lizis solüsyonundan 10 mL kadar bir kaba alınmıştır. DA solüsyonundan çıkarılan sperm yaymaları yine yatay olarak lizis solüsyonuna konulmuştur (Şekil 5.7.1.1.d). Oda sıcaklığında 23 dakika boyunca lizis solüsyonu içerisinde bekletilmiştir. Ardından 5 dakika boyunca distile su içerisinde yıkama işlemi yapılmıştır (Şekil 5.7.1.1.e). Yıkama işleminden sonra artan etanol serisinde (%70, %90 ve %100) 2'şer dakika dehidrate edilmiştir (Şekil 5.7.1.1.e). Preparatlar karanlık ve kuru bir ortamda kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra Diff-Quick boyama yapılmıştır. Diff-Quick boya seti fiksatif (metil alkol içerisinde trimethan boyası), solüsyon 1 (ksantin boyası) ve solüsyon 2 (azine

A ve metilen mavisi)’den oluşmaktadır. Kuruyan preparatlar fiksatif konulmadan sırasıyla solüsyon 1 ve solüsyon 2’den geçirilip kurumaya bırakılmıştır. Görüntülenmesi ışık mikroskobunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.7.1.1: DNA fragmentasyon analiz işlemi.

5.7.2. Kromatin Yapı Analizi

Sperm kromatin yapısı Toluidine Mavisi boyama ile analiz edilmiştir. 1:1 oranında aseton ve %100'lük etanol solüsyonu hazırlanmıştır. Önceden hazırlanan sperm yayma preparatları hazırlanan bu solüsyon içerisinde +4°C’de 1 saat boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi takiben preparatlar +4°C’de 0,1 N HCl (Merck K50227117 818, Almanya) içerisinde 5 dakika hidrolize edilmiştir. Ardından preparatlar distile su ile yıkanıp %0.05 Toluidine mavisi ile oda ısısında 5 dakika boyunca boyanmaya bırakılmıştır. Boyanma gerçekleştikten sonra preparatlar hava ile

kurumaya bırakılmıştır. (Şekil 5.7.2.1) Preparatlar kuruduktan sonra ışık mikroskopunda immersion yağı yardımıyla 100X objektifte görüntülenmiştir.



Şekil 5.7.2.1: Toluidin mavisi boyama işlemi sonrası sperm yaymaları.

5.7.2.1. Solüsyon Hazırlığı

0,1 N HCl Hazırlığı

500 mL'lik hazırlık yapılmıştır. Çeker ocağında 125 mL distile suyun üzerine piyasada bulunan %37'lik HCl'den 4,106 mL eklenmiştir. Karışım distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

5.8. cAMP Bağımlı PKA Yolağı Analizleri

5.8.1. cAMP Analizi

Sperm seminal plazmasındaki cAMP analizi, ticari olarak satın alınan cAMP Direct Immunoassay Kitinin (abcam ab65355, İngiltere) protokolüne bağlı kalarak ELISA yöntemi yardımıyla gösterilmiştir. Kitin içerisinden çıkan standartlar protokole uygun dilüsyonlarda hazırlanmıştır. Semen örnekleri kitin içerisinde yazan dilüsyon oranlarına göre hazırlanmıştır (1:20 – 1:50 – 1:100). Çalışmayı stabilize etmek içinde çift tekrarlı çalışılmıştır. Semen örnekleri için en uygun değer 1:100 görülerek bu

dilüsyonla çalışmaya devam edilmiştir. Mikrosantrifüj tüplerine (ISOLAB, 07803021, Türkiye) kitte belirtilen protokole uygun olarak standartlar hazırlanmıştır. Her hastanın semen örneğinden 100 µL mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur. Kitin içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan Neutralizing Buffer'dan 50 µL bütün standartlara ve semen örneklerine eklenmiştir. Asetile edici reaksiyon için taze olarak hazırlanmış karışımdan 5'er µL bütün standart ve semen örneklerine eklenmiştir. Her bir mikrosantrifüj tüpüne eklendikten sonra 2-3 saniye vortekslenmiş ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Önceden hazırlanmış olan 1X Assay Buffer'dan 845 µL bütün standart ve semen örneklerine eklenmiş ve karıştırılmıştır. Her bir karışımdan 50 µL Protein G coated 96-well plate'e sırayla konulmuştur. 8. Standart hariç bütün kuyucuklara 10 µL önceden hazırlanmış olan cAMP antikoru eklenmiştir. 8. Standarta ise 10 µL 1X Assay Buffer konulmuştur. Numuneler oda sıcaklığında 1 saat boyunca hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Her bir kuyucuğa 10 µL kitte hazır halde bulunan cAMP – HRP solüsyonu eklenip yavaşça pipetle al-ver yapılarak karışması sağlanmıştır ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra numunelere yavaş bir şekilde 5 kere 200 µL 1X Assay Buffer eklenerek yıkanmaları sağlanmıştır. Kitte hazır halde bulunan HRP Developer'dan her bir kuyucuğa 100 µL eklenip 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kuyucuklardaki karışımın renginin maviye döndüğü görülmüştür. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 100 µL 1M HCl eklenmiştir ve karışımların renginin maviden sarıya döndüğü gözlenmiştir. Örnekler spektrofotometrede (Spectramax i3 + SofMaxPro 6.4 Programı, Molecular Devices, Amerika) 450 nm'de okutulmuştur. Sonuçların analizi kitte belirtildiği gibi uygulanmıştır.

Tablo 5.8.1.1: Semen Örneği Dilüsyon Hazırlığı

Dilüsyon	Semen Örneği	0,1 M HCl
1:20	5 µL	95 µL
1:50	2 µL	98 µL
1:100	1 µL	99 µL

Tablo 5.8.1.2: Solüsyon Hazırlığı

Solüsyon	Malzemeler	
1 M HCl	20,75 mL HCl	229,25 mL distile su
1X Assay Buffer	10X cAMP Assay Buffer	225 mL ultra distile su
Stok standart cAMP	1 mL 0,1	standart cAMP
Working Solution	25 µl stok standart cAMP	975 µL 0,1 M HCl
Asetile Edici Solüsyon	1X Reagent A	2X Reagent B
cAMP Antikoru	1,1 mL 1X Assay Buffer	Rabbit Anti-cAMP pAb

Tablo 5.8.1.3: Standart Hazırlama

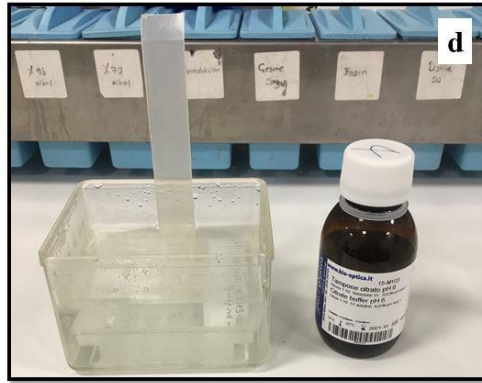
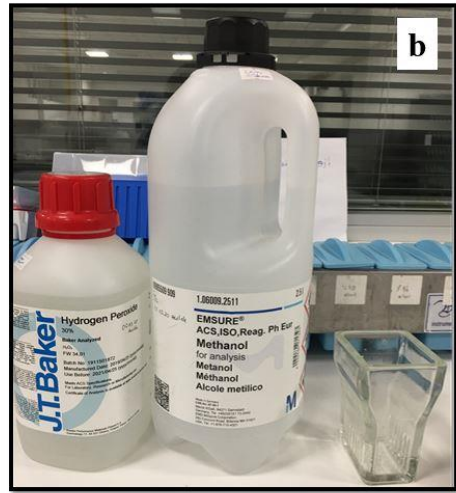
Standart	Çalışma Solüsyonu	0,1 M HCl	Kuyucuktaki Son Miktar
1	200 µl	0	100 µL
2	std 1' den 100 µL	100 µL	100 µL
3	std 2' den 100 µL	100 µL	100 µL
4	std 3' den 100 µL	100 µL	100 µL
5	std 4' den 100 µL	100 µL	100 µL
6	std 5' den 100 µL	100 µL	100 µL
7	0	100 µL	100 µL
8	0	100 µL	100 µL

5.8.2. Proteinlerin (PKA ve p-PKA) İmmünohistokimyasal Analizi

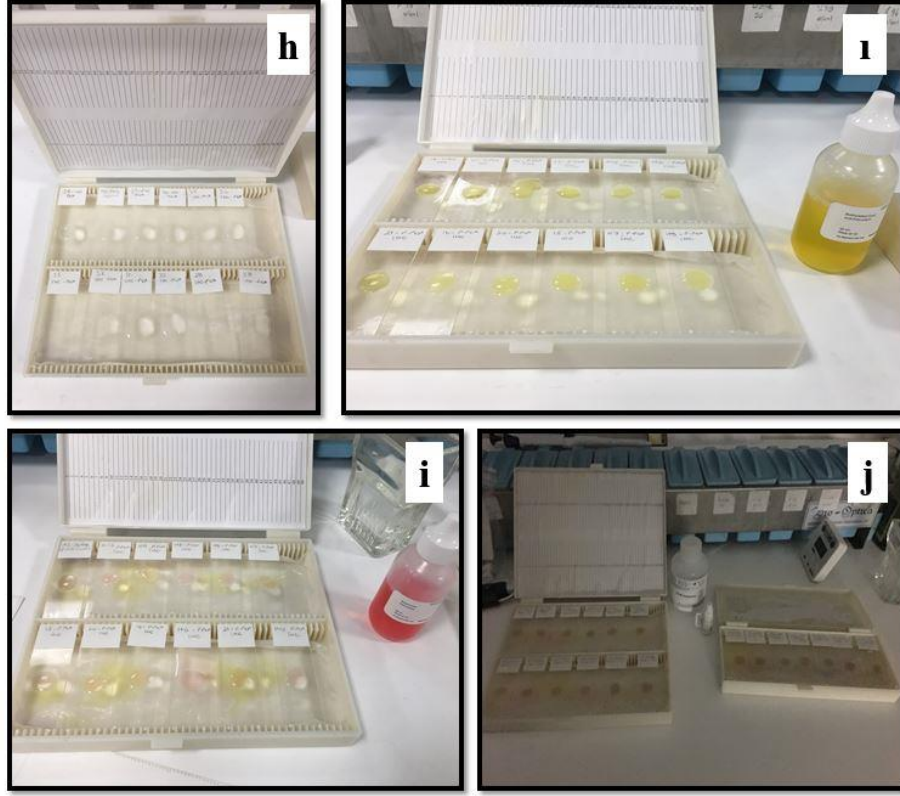
İmmünohistokimya yöntemiyle, Mouse and Rabbit Specific HRP (ABC) Detection IHC Kit (abcam, ab93677, İngiltere) yardımı ile proteinlerin ekspresyonu ve lokalizasyonları gösterilmiştir. Önceden yaymaları yapılmış semen örneklerinin preparatları %4'lük PFA ile oda sıcaklığında 20 dakika fikse edilmiştir (Şekil 5.8.2.1.a). PBS ile cam şale içinde 5'er dakika boyunca 3 kere hafifçe sallayıp bekletilerek yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivasyonunu inhibe etmek amacıyla preparatlar %3'lük hidrojen peroksit ve metanol solüsyonu içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Şekil 5.8.2.1.b). Preparatlar inkübasyon sonrası 5'er dakika süre ile 3 kere PBS ile yıkanmıştır. Antijen geri kazanımı amacıyla, preparatlar 800 watt'ta kaynayan kadar Citrate buffer solüsyonu (Bio Optica 15M-103, İtalya) ile inkübe edilip, sonrasında 200 watt'lık mikrodalgada içerisinde 20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 5.8.2.1.c). Mikrodalgadan çıkarılan preparatlar 20 dakika boyunca soğumaya bırakılmıştır (Şekil 5.8.2.1.d). Oda sıcaklığında ıslak peçetelerle nemli bir ortam oluşturulan humidified chamber içerisine alınan preparatlara, spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla 10 dakika boyunca kitin içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan protein blocking solüsyonu uygulanmıştır (Şekil 5.8.2.1.e). Uygulamanın ardından preparatlar 5'er dakika süre ile 3 kez PBS (Sigma-Aldrich P4417-100, Amerika) ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası preparatlara 1 gece boyunca +4⁰C'de bekletilmek üzere istenilen dilüsyonda hazırlanan primer antikoru eklenmiştir (Şekil 5.8.2.1.f-g). Preparatlar 16 – 18 saatlik inkübasyon sonrası (Şekil 5.8.2.2.h) PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkanan preparatlar nemli bir ortam oluşturan humidified chamber içine alınıp kitin içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan biotinlenmiş goat anti-polyvalent 10 dakika boyunca uygulanmıştır (Şekil 5.8.2.2.ı). Preparatlar yine üç defa 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından kitin içerisinde bulunan streptavidin peroksidaz, humidified chamber içine alınan preparatlara 10 dakika boyunca uygulanmış (Şekil 5.8.2.2.i) ve ardından yine 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. İmmünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla 10 dakika boyunca Scytek DAB (Diaminobenzidin) Chromogen / Substrate kit (Scytek ACK125, Amerika) uygulanmış (Şekil 5.8.2.2.j) ve ardından yine 3 defa 5'er dakika PBS ile

yıkanmıştır. Yıkama sonrası karşıt boyama için Mayer's hematoksilen ile 3 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunun altında 10 dakika mordanlama işlemi uygulanmıştır. Mordanlama işleminin ardından preparatlar ksilen içerisine daldırılıp çıkarıldıktan sonra hava ile kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar Mounting Medyum kullanılarak lamel ile kapatılıp ışık mikroskobu altında incelenmiştir.





Şekil 5.8.2.1: İmmünohistokimyasal analiz basamakları.



Şekil 5.8.2.2: İmmünohistokimyasal analiz basamakları.

5.8.2.1. Kimyasal Hazırlığı

PBS Hazırlığı

80 gr NaCl, 2 gr KCl, 2 gr KH_2PO_4 , 21,6 gr Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Amerika) 1 litre distile su içerisinde çözülmüştür ve pH'ı 7,4'e ayarlanmıştır. Elde edilen 10X PBS distile su ile 1X PBS'e seyreltilerek kullanılmıştır.

%4' lük PFA Hazırlığı

800 mL 1X PBS içerisine 40 gr PFA konulmuştur. Çözünmeyi ve karışımı sağlayabilmek için içerisine NaOH eklenip berraklık sağlanana kadar 60°C 'de manyetik karıştırıcı üzerinde bırakılmıştır. Berraklık sağlandıktan sonra solüsyon soğumaya bırakılmış ve ardından filtreden geçirilmiştir. Ardından 1X PBS ile 1 litreye tamamlanıp pH'ı 6,9 olarak ayarlanmıştır.

%3' lük H₂O₂ Hazırlığı

Piyasada satılan Hidrojen Peroksit (Fisher Scientific JT Baker, Amerika) %30'luk olduğu için %3'e metanol (Merck 10600925, Almanya) ile seyreltilmiştir.

Citrate Buffer Hazırlığı

Piyasada bulunan Citrate Buffer'ın (Bio Optica 15M-103, İtalya) kullanımı için 1:10 oranında distile su ile dilüe edilmiştir.

Primer Antikor Hazırlığı

Anti-PKA (Sigma Aldrich, SAB4502337, Çin) ve Anti- Phospho-PKA (Sigma Aldrich, sab4503969, Çin) antikorlarının dilüsyon oranları 1:50 ve 1:100 olarak verilmiştir. Yapılan dilüsyon denemesi sonucunda Anti-PKA antikorunun 1:200 oranında, Anti-Phospho-PKA antikorunun 1:100 oranında kullanılmasına karar verilmiştir. Antikorlar PBS ile dilüe edilmiştir.

DAB Kromojen / Substrat Hazırlığı

Ticari olarak satın alınan DAB Kromojen/Substrat kitinin (Scytek, ACK125, A.B.D.) prosedürüne uygun olarak karışım 1:50 oranında hazırlanmıştır.

5.9. Sperm Parametrelerinin Analizi

Semen örnekleri, en az 2 günlük (2-5 gün) cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla steril bir kaba alınmıştır. Yaklaşık 20 dakikalık likefaksiyon sürecinden sonra alınan semen örneğinin Dünya Sağlık Örgütü' nün kriterlerine göre (DSÖ, 2010) semen parametrelerine bakılmıştır.

Sperm hacim ölçümü: Hastadan alınan semen örneğinin ilk olarak hacmi (mL) ve pH değeri ölçülmüştür.

Sperm konsantrasyon ölçümü: Makler sayma kamarasına 10 µL semen örneği koyulmuştur ve faz kontrast mikroskopunda 20X objektif altında 100 kare sayılmıştır ve konsantrasyonu mil/ mL olarak verilmiştir.

Sperm motilitesi: Işık mikroskopunda (Nikon, Japonya) 40X objektif altında 100 sperm sayılıp spermeler 4 gruba ayrılmıştır. 1. Grup A motilite progresif motil yani ileri hızlı hareketli spermeleri, B motilite yavaş hareketli spermeleri, C motilite yerinde hareketli spermeleri, D motilite hareketsiz spermeleri temsil etmektedir. Grupların sonuçları yüzde (%) olarak verilmiştir. Toplam motiliteyi A, B ve C motilite oranları toplamı sonucu elde edilmiştir. Progresif motil sperm oranını da A motilite oranı vermiştir.

Sperm vitalite analizi: 10 µL semen örneği ile 10 µL Eosin-Y boyası (Bio Optica 05-10003, İtalya) lam üzerinde karıştırılmıştır. Görüntüleme 40X objektif altında gerçekleştirilmiştir. Sperm örneğinden 100 sperm sayılmıştır ve kırmızı ile boyanan spermeler non-vital, kırmızı ile boyanmayan spermeler ise vital olarak ayrılmıştır. Sonuçlar yüzde (%) olarak verilmiştir.

Sperm morfolojik değerlendirme: Morfolojik boyama işleminde sperm yaymalar öncelikle setin içerisindeki fiksatif ile fikse edilmiş, daha sonra iki farklı boyama solüsyonunda 30 saniye bekletilerek boyanmıştır. Hava ile kuruması sağlandıktan sonra 100X objektif altında Kruger's strict criteria kullanılarak analiz edilmiştir. En az 100 sperm hücresi sayılmış ve morfolojik olarak normal spermeler ile anormal spermeler ayrılıp, sonuç yüzde (%) normal sperm oranı olarak verilmiştir.



Şekil 5.9.1: Sperm Diff-Quick boyama. (Ok başları normal sperm hüresini, oklar anormal kafa morfolojisine sahip sperm hüresini göstermektedir.)



Şekil 5.9.2: Sperm Diff-Quick boyama. (Ok başı normal sperm hücrecini, yıldız akrozom defektine sahip sperm hücrecini göstermektedir.)

Akrozomal indeks oranları: 100 sperm hücrecinin akrozomu değerlendirilmiştir. Spermilerin akrozomları morfolojik olarak normal akrozomlar ve anormal akrozomlar diye ayrılmıştır ve sonuç yüzde (%) normal akrozomal indeks oranı olarak verilmiştir.

Semen örneğinde bulunabilecek lökosit ve diğer hücrelerin konsantrasyonu: 10 µL semen örneği Makler sperm sayma kamarasına koyulmuştur. Faz kontrast mikroskopunda (Hoffman Modülasyonu eklenmiş ZEISS AXIO, Almanya) 20X objektif altında 100 karedeki yuvarlak hücreler sayılmış ve sonuç mil/ mL olarak verilmiştir. Ardından 10 µL semen örneği ve 10 µL Leucoscreen boyası lam üzerinde karıştırılmıştır, 40X objektif altında 100 sperm hücresi sayılmış ve kahverengi boyanan yuvarlak hücreler lökosit hücresi, kırmızı boyanan yuvarlak hücreler ise diğer hücreler (spermatogenik seri hücreleri, epitel hücreleri vs.) olarak adlandırılmıştır. Lökosit konsantrasyonu toplam yuvarlak hücre konsantrasyonu ile lökosit yüzdesinin çarpılması ile bulunmuştur.

Sperm yıkama işlemi: Semen örnekleri dansite gradyan yöntemi ile yıkanmıştır. %90'lık ve % 45'lik olarak iki farklı yoğunlukta özel sperm yıkama solüsyonları (PureSperm, Nidacon, İsveç) hazırlanmıştır. Konik bir tüpe (Falcon 2095, Fisher Scientific, Amerika) önce %90'lık, daha sonra %45'lik solüsyon aralarında bir geçiş katmanı oluşturacak şekilde çok yavaş bir şekilde eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki karışımın üzerine 1 mL semen örneği eklenmiş ve 1300 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Dibe çöken pelletten 400 µL başka bir tüpe aktarılmış ve üzerine 2 mL PureSperm yıkama solüsyonu eklenip 2200 rpm'de 6 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Supernatan atılıp tekrar 2 mL yıkama solüsyonu eklenip 2200 rpm'de 6 dakika daha santrifüj edilmiştir. Böylelikle gradyanlardan tam olarak arınması sağlanmıştır. Son olarak 400 µL kalacak şekilde süpernatant alınmış ve sperm konsantrasyonu (mil/mL), toplam motilite ve progresif motilite oranları yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar değerlendirilmiştir. Yıkama öncesi ve yıkama sonrasında hesaplanan toplam motil sperm sayısı ve toplam progresif sperm sayısı hacim ile çarpılarak hesaplanmıştır.

5.10. ICSI Parametrelerinin Analizi

5.10.1. Oositin İndüklenmesi ve ICSI Prosedürü

Çalışmamıza katılan hastaların kadın partnerlere, GnRH antagonist protokolü ve rekombinant folikül uyarıcı hormon (FSH) uygulanarak ovulasyon indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Oosit-kümüls kompleks 36 saat sonra oosit toplama işlemiyle edilmiştir. Oosit, çevrelendiği kümülüs ve korona hücrelerinden enzimatik (Hyase 10-Vitrolife, İsveç) ve mekanik tekniklerle soyulmuş ve nükleer olgunlaşması takip edilmiştir. Oositler toplandıktan 4 saat sonra, metafaz II ve metafaz I oositlere hareketli bir sperm enjekte edilmiştir (ICSI).

5.10.2. Fertilizasyon ve Embriyo Gelişim Takibi

Mikroenjeksiyon yapılan oositler kültür ortamlarında (OVOIL, Vitrolife ve IVF, Vitrolife, İsveç) bekletilmiştir. 16–18 saat sonra iki farklı pronükleus (2PN) ve iki polar cismin görülmesi ile fertilizasyon gerçekleşmiştir. Mikroenjeksiyon sonrası 2.

ve 3. Gün embriyo gelişim takibi yapılmıştır. İyi kalite embriyo sayısı en az bir tane A kalitede olan 3. gün ve 5. gün embriyoları dahil edilmiştir. Hastalardan toplanan oosit sayısı, MII oosit sayısı, fertilizasyona uğrayan oosit sayısı, iyi kalite embriyo sayısı, transfer edilen embriyo sayısı, gebelik ve yaş değerleri kaydedilmiştir.

5.10.3. Embriyo Transferi ve Gebelik Değerlendirmesi

Embriyo transferleri embriyo sayı ve kalitesine göre embriyoların 3. veya 5. gününde aynı klinisyen ve embriyolog tarafından gerçekleştirilmiştir. Embriyo transferinden 12 gün sonra kanda bakılan β -hCG değeri (≥ 15 mIU / mL) pozitif gebelik olarak değerlendirilmiştir ve gebelik bilgileri kayıt edilmiştir.

ICSI parametrelerinin hesaplanması ;

Fertilizasyon Oranı = Fertilizasyon gerçekleşen olgun oosit sayısı / MII (Metafaz 2) oosit sayısı

İyi kalitede embriyo oranı = (iyi kalitede embriyo sayısı / Fertilizasyon gerçekleşmiş embriyo sayısı) * 100

Blastosist Oranı = ICSI sonrası 5. Günde blastosiste gelişen embriyo sayısı / Fertilizasyon gerçekleşen embriyo sayısı



Şekil 5.10.1: Metafaz II evresinde 1 polar cisimciği ile olgun bir oosit izlenmektedir.



Şekil 5.10.2: ICSI işleminden 1 gün sonra, 2 pronükleus (çekirdek öncülü) ile fertilize olmuş bir zigot izlenmektedir.



Şekil 5.10.3: ICSI işleminden 2 gün sonra, 4 hücreli iyi kalitede (fragmentasyon yok, granülasyon yok, vakuolizasyon yok, hücreler eşit ve sitoplazmalar homojen) bir embriyo izlenmektedir.



Şekil 5.10.4: ICSI işleminden 3 gün sonra, 8 hücreli iyi kalitede (fragmentasyon yok, granülasyon yok, vakuolizasyon yok, hücreler eşit ve sitoplazmalar homojen) bir embriyo izlenmektedir.



Şekil 5.10.5: ICSI işleminden 5 gün sonra, blastosist evresinde, iyi kalitede (iç hücre kitlesi kompakt ve yoğun hücreli, dış hücre kitlesi yoğun hücreli ve iç görünümlü morfolojiye sahip hücrelerden oluşan, sıkı örülmüş, hatching başlamış) bir embriyo izlenmektedir.



Şekil 5.10.6: Mikroenjeksiyon işlemi sırasında holding pipet ile sabitlenmiş bir oosit ve pipet içerisinde immobilize edilmiş bir sperm izlenmektedir.

5.11. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 22.0 programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatiksel metodlar (ortalama, standart sapma) hesaplanmıştır. Verilerin dağılımı One Sample Kolmogorov- Smirnov testi ile belirlenmiştir. İlişki analizi için regresyon analizi uygulanmıştır. Normal dağılımlar için Pearson korelasyonu, normal dağılım göstermeyenler için Spearman ilişkisi kullanılmıştır. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.



6. BULGULAR

6.1. Oksidatif Stres Parametreleri

Oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS ve OSI) sonuçları, Tablo 6.1.1, 6.1.2 ve Şekil 6.1.1’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her parametrenin altında belirtilmiştir.

Tablo 6.1.1: Oksidatif stres parametreleri istatistiksel analizi. (TAS: Total antioksidan seviyesi, TOS: Total oksidan seviyesi, OSI: Oksidatif stres indeksi, MDA: Malondialdehit). Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ	TAS (mmol Trolox eq.)	TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	OSI	MDA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
Ort \pm SS	1,39 \pm 0,56	13,12 \pm 3,06	1,08 \pm 0,48	0,94 \pm 0,33

Tablo 6.1.2: Tüm hastaların oksidatif stres parametre değerleri

HASTALAR	TAS	TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	OSI	MDA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
1	9,46	13,53	1,43	0,87
2	10,18	11,18	1,10	2,12
3	11,61	19,41	1,67	1,37
4	8,04	11,18	1,39	1,27
5	5,71	10,59	1,85	0,96
6	10,36	12,35	1,19	1,16
7	14,64	11,18	0,76	0,92
8	10,18	14,71	1,44	1,20
9	28,93	11,76	0,41	1,45
10	13,93	13,53	0,97	1,24
11	9,82	10,59	1,08	0,90
12	12,68	9,41	0,74	1,43
13	9,64	14,12	1,46	0,84
14	26,96	10,59	0,39	1,16
15	9,82	11,18	1,14	0,72
16	11,43	14,71	1,29	0,86
17	14,46	10,59	0,73	0,40
18	10,00	10,00	1,00	1,08
19	9,82	11,18	1,14	0,78
20	16,43	10,59	0,64	1,09
21	23,57	11,76	0,50	1,18
22	7,32	20,59	2,81	0,81
23	7,68	8,82	1,15	1,08
24	9,29	17,06	1,84	0,70
25	21,43	11,76	0,55	0,65
26	9,82	16,47	1,68	0,42
27	12,32	11,18	0,91	0,66
28	17,50	14,71	0,84	1,12
29	21,25	18,24	0,86	0,72
30	9,29	14,12	1,52	0,80
31	13,57	18,24	1,34	0,98
32	21,61	17,06	0,79	1,10
33	9,46	10,00	1,06	0,76
34	15,36	14,12	0,92	0,39
35	13,39	12,35	0,92	1,16
36	17,32	11,76	0,68	0,68
37	16,07	12,35	0,77	0,62
38	21,43	10,00	0,47	0,58
39	19,11	12,35	0,65	0,64
40	15,36	19,41	1,26	0,84

6.1.1. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Çalışmamızda, oksidatif stres indeksinin araştırılan diğer parametreler ile ilişkisi Tablo 6.1.1.1, 6.1.1.2, 6.1.1.3 ve 6.1.1.4'te gösterilmiştir.

Tablo 6.1.1.1: Oksidatif stres indeksinin, oksidatif stres parametreleri ve DNA-kromatin parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

OSİ	TAS (mmol Trolox eq.)	TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	MDA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	DNA Fragmentasyonu (%)	Kromatin Bütünlüğü (%)
İlişki Analizi	- 0,75**	0,56	- 0,05	0,21	0,02
<i>p</i> Değeri	0,00	0,00	0,76	0,19	0,89

Tablo 6.1.1.2: Oksidatif stres indeksi ile cAMP bağımlı PKA yolu parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz.

OSİ	cAMP (pmol/mL)	PKA	p-PKA
İlişki Analizi	- 0,14	0,17	0,18
<i>p</i> Değeri	0,39	0,31	0,28

Tablo 6.1.1.3: Oksidatif stres indeksi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

OSİ	Gebelik	Fertilizasyon Oranı	İyi Embriyo Oranı	Blastosist Oranı
İlişki Analizi	- 0,04	- 0,06	0,04	0,21
<i>p</i> Değeri	0,82	0,72	0,82	0,20

Tablo 6.1.1.4: Oksidatif stres indeksi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

OSI	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu ($\times 10^6/\text{mL}$)	Toplam Motilite (%)	Progresif Sperm Sayısı ($\times 10^6/\text{mL}$)
İlişki Analizi	0,05	0,01	0,24	0,08
<i>p</i> Değeri	0,78	0,98	0,14	0,61

6.1.2. Malondialdehit Analizi

Çalışmamızın, Malondialdehit analizinin diğer parametreler ile ilişkileri, Tablo 6.1.2.1, 6.1.2.2, 6.1.2.3 ve 6.1.2.4’te gösterilmiştir.

Tablo 6.1.2.1: Malondialdehit analizinin oksidatif stres parametreleri ve DNA-kromatin parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

MDA ($\mu\text{mol/L}$)	TAS (mmol Trolox _{eq.})	TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	OSİ	DNA Fragmentasyonu (%)	Kromatin Bütünlüğü (%)
İlişki Analizi	0,02	- 0,11	- 0,05	- 0,33**	0,09
<i>p</i> Değeri	0,90	0,50	0,76	0,04	0,61

Tablo 6.1.2.2: Malondialdehit analizi ile cAMP bağımlı PKA yolu parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

MDA ($\mu\text{mol/L}$)	cAMP (pmol/ml)	PKA	pPKA
İlişki Analizi			
p Değeri	- 0,46	0,42	0,04
	0,003	0,008	0,80

Tablo 6.1.2.3: Malondialdehit analizi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

MDA ($\mu\text{mol/L}$)	Gebelik	Fertilizasyon Oranı	İyi Embriyo Oranı	Blastosist Oranı
İlişki Analizi	- 0,07	- 0,08	0,01	0,10
p Değeri	0,70	0,64	0,94	0,55

Tablo 6.1.2.4: Malondialdehit analizi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

MDA ($\mu\text{mol/L}$)	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu ($\times 10^6/\text{mL}$)	Toplam Motilite (%)	Progresif Sperm Sayısı ($\times 10^6/\text{mL}$)
İlişki Analizi	0,12	0,25	- 0,26	0,002
p Değeri	0,46	0,11	0,10	0,99

6.1.3. Total Oksidan Seviyesi

Çalışmamızda total oksidan seviyesi ile diğer parametrelerin ilişkileri Tablo 6.1.3.1, 6.1.3.2, 6.1.3.3 ve 6.1.3.4’te gösterilmiştir.

Tablo 6.1.3.1: Total oksidan seviyesinin, oksidatif stres parametreleri ve DNA-kromatin parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	TAS (mmol Trolox eq.)	OSİ	MDA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	DNA Fragmentasyonu (%)	Kromatin Bütünlüğü (%)
İlişki Analizi	- 0,04	0,56**	- 0,11	0,11	- 0,11
<i>p</i> Değeri	0,83	0,00	0,50	0,49	0,48

Tablo 6.1.3.2: Total oksidan seviyesi ile cAMP bağımlı PKA yolağı parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	cAMP (pmol/mL)	PKA	p- PKA
İlişki Analizi	0,09	- 0,11	0,08
<i>p</i> Değeri	0,59	0,50	0,61

Tablo 6.1.3.3: Total oksidan seviyesi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	Gebelik	Fertilizasyon Oranı	İyi Embriyo Oranı	Blastosist Oranı
İlişki Analizi	- 0,11	- 0,06	- 0,07	- 0,06
<i>p</i> Değeri	0,54	0,71	0,69	0,74

Tablo 6.1.3.4: Total oksidan seviyesi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu ($\times 10^6/\text{mL}$)	Toplam Motilite (%)	Progresif Sperm Sayısı ($\times 10^6/\text{mL}$)
İlişki Analizi	- 0,34	0,29	- 0,03	0,31
<i>p</i> Değeri	0,03	0,07	0,88	0,05

6.1.4. Total Antioksidan Seviyesi

Çalışmamızda total antioksidan seviyesi ile diğer parametrelerin ilişkileri Tablo 6.1.4.1, 6.1.4.2, 6.1.4.3 ve 6.1.4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 6.1.4.1: Total antioksidan seviyesinin, oksidatif stres parametreleri ve DNA-kromatin parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

TAS (mmol Trolox eq.)	TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{e}$ q.)	OSİ	MDA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	DNA Fragmentasyonu (%)	Kromatin Bütünlüğü (%)
İlişki Analizi	- 0,04	- 0,75**	0,02	- 0,04	- 0,11
p Değeri	0,83	0,00	0,90	0,80	0,50

Tablo 6.1.4.2: Total antioksidan seviyesi ile cAMP bağımlı PKA yolu parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

TAS (mmol Trolox eq.)	cAMP (pmol/mL)	PKA	p- PKA
İlişki Analizi	0,19	- 0,26	- 0,25
p Değeri	0,25	0,11	0,13

Tablo 6.1.4.3: Total antioksidan seviyesi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

TAS (mmol Trolox eq.)	Gebelik	Fertilizasyon Oranı	İyi Embriyo Oranı	Blastosist Oranı
İlişki Analizi	0,15	0,01	- 0,01	- 0,37
p Değeri	0,42	0,96	0,94	0,02

Tablo 6.1.4.4: Total antioksidan seviyesi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

TAS (mmol Trolox eq.)	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu (x10 ⁶ /mL)	Toplam Motilite (%)	Progresif Sperm Sayısı (x10 ⁶ /mL)
İlişki Analizi	- 0,06	0,17	- 0,32	0,12
<i>p</i> Değeri	0,70	0,29	0,05	0,47

6.2. Kromatin ve DNA Parametreleri

Çalışmamızın sonuçları Tablo 6.2.1. ve Tablo 6.2.2’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her parametrenin altında belirtilmiştir.

Tablo 6.2.1.: Kromatin ve DNA Parametreleri. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

KROMATİN VE DNA PARAMETRELERİ	DNA Fragmentasyonu (%)	Kromatin Bütünlüğü (%)
Ortalama Değer	34,60 ± 21,85	48,31 ± 16,62

Tablo 6.2.2.: Hastaların DNA fragmentasyon ve kromatin bütünlüğü inceleme sonuçları. (DF: DNA fragmentasyonu, KB: Kromatin bütünlüğü).

HASTALAR	DNA Fragmentasyonu (%)		Kromatin Bütünlüğü (%)	
	DF (+)	DF (-)	KB (+)	KB (-)
1	20	80	57	43
2	37	63	70	30
3	3	97	45	55
4	4	96	76	24
5	19	81	59	41
6	19	81	44	56
7	20	80	38	62
8	55	45	49	51
9	29	71	56	44
10	39	61	38	62
11	37	63	47	53
12	20	80	43	57
13	42	58	52	48
14	56	44	50	50
15	37	63	55	45
16	40	60	63	37
17	92	8	-	-
18	15	85	43	57
19	12	88	53	47
20	10	90	22	78
21	28	72	45	55
22	88	12	39	61
23	31	69	42	58
24	50	50	28	72
25	67	33	56	44
26	72	28	10	90
27	52	48	80	20
28	9	91	41	59
29	13	87	40	60
30	51	49	70	30
31	9	91	41	59
32	28	72	32	68
33	30	70	62	38
34	33	67	75	25
35	61	39	27	73
36	34	66	46	54
37	38	62	19	81
38	37	67	53	47
39	4	96	34	66
40	43	57	84	16

6.2.1. DNA Fragmentasyonu

Çalışmamızda DNA fragmentasyonu ile diğer parametrelerin ilişkileri Tablo 6.2.1.1, 6.2.1.2, 6.2.1.3 ve 6.2.1.4.' te gösterilmiştir. Geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi (Halosperm) Şekil 6.2.1.1 ile Şekil 6.2.1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 6.2.1.1: DNA fragmentasyonu analizinin oksidatif stres parametreleri ve kromatin bütünlüğü ile arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

DNA Fragmentasyonu (%)	TAS (mmol Trolox eq.)	TOS (umol/H ₂ O ₂ /eq)	OSI	MDA (umol/L)	Kromatin Bütünlüğü (%)
İlişki Analizi	- 0,04	0,11	0,21	- 0,33	- 0,03
<i>p</i> Değeri	0,80	0,48	0,19	0,04	0,86

Tablo 6.2.1.2: DNA fragmentasyonu analizi ile cAMP bağımlı PKA yolu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

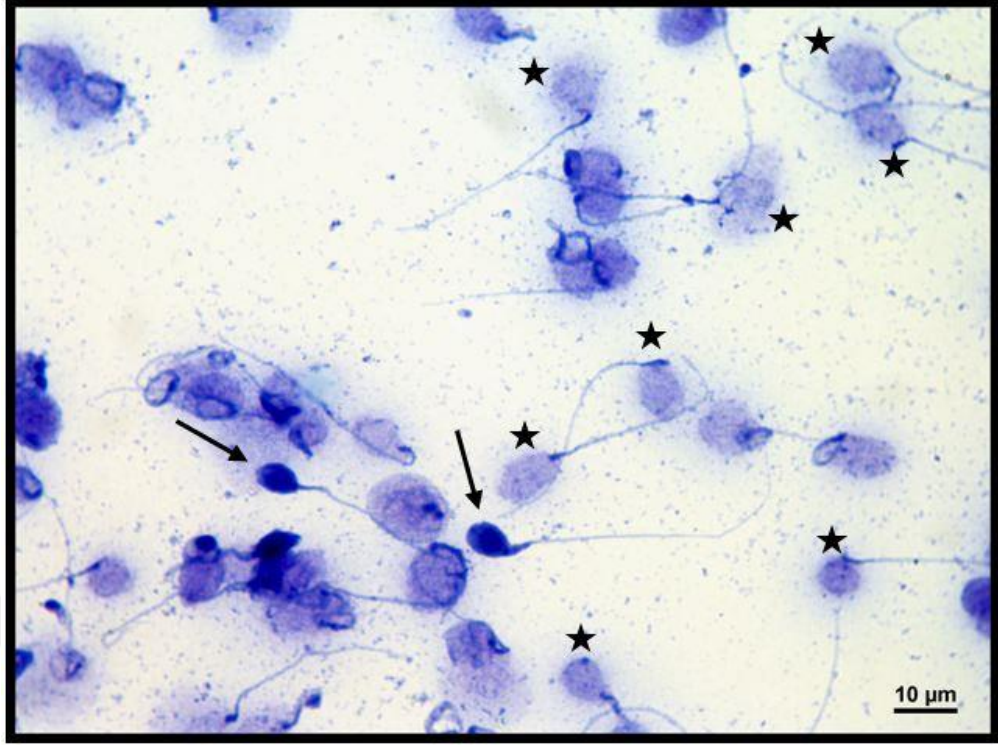
DNA Fragmentasyonu (%)	cAMP (pmol/ml)	PKA	p-PKA
İlişki Analizi	0,23	- 0,19	- 0,08
<i>p</i> Değeri	0,16	0,24	0,65

Tablo 6.2.1.3: DNA fragmentasyonu analizi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

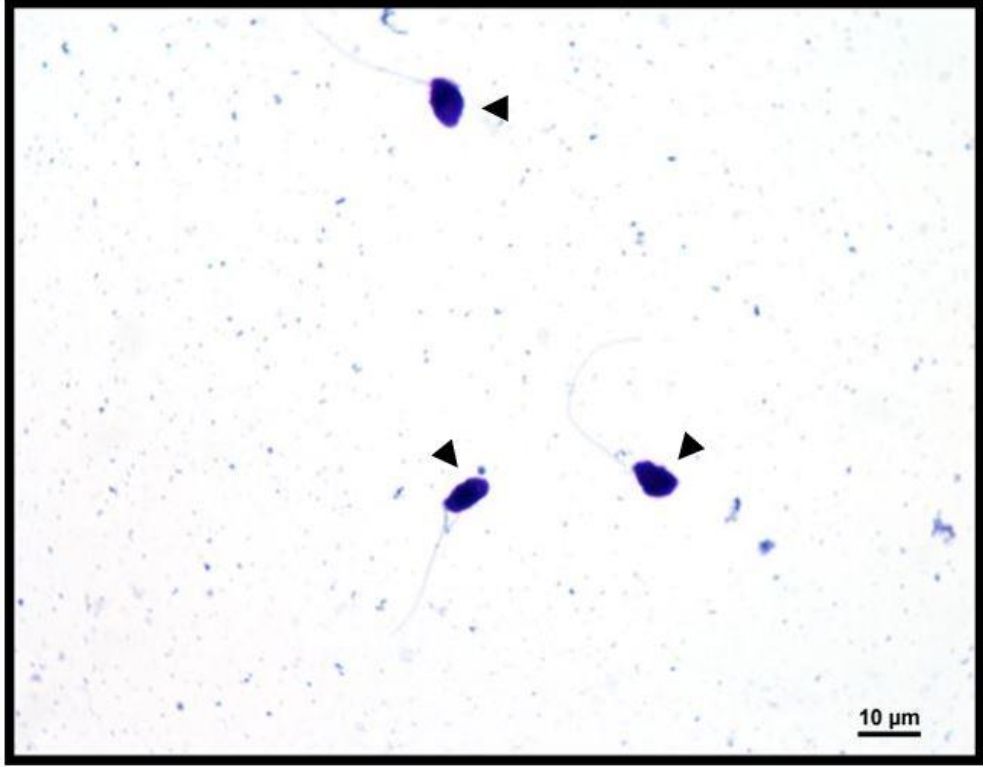
DNA Fragmentasyonu (%)	Gebelik	Fertilizasyon Oranı	İyi Embriyo Oranı	Blastosist Oranı
İlişki Analizi	- 0,02	- 0,15	0,10	- 0,14
<i>p</i> Değeri	0,92	0,36	0,57	0,41

Tablo 6.2.1.4: DNA fragmentasyonu analizi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

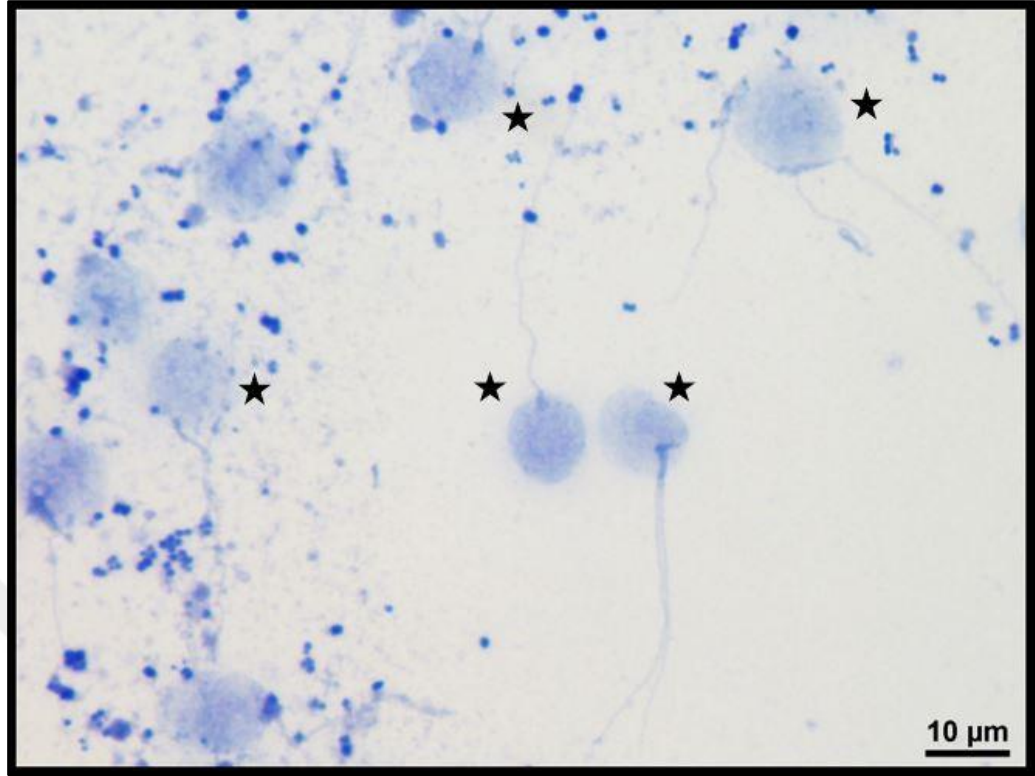
DNA Fragmentasyonu (%)	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu ($\times 10^6/\text{mL}$)	Toplam Motilite (%)	Progresif Sperm Sayısı ($\times 10^6/\text{mL}$)
İlişki Analizi	0,02	- 0,35	- 0,29	0,27
<i>p</i> Değeri	0,90	0,03	0,07	0,10



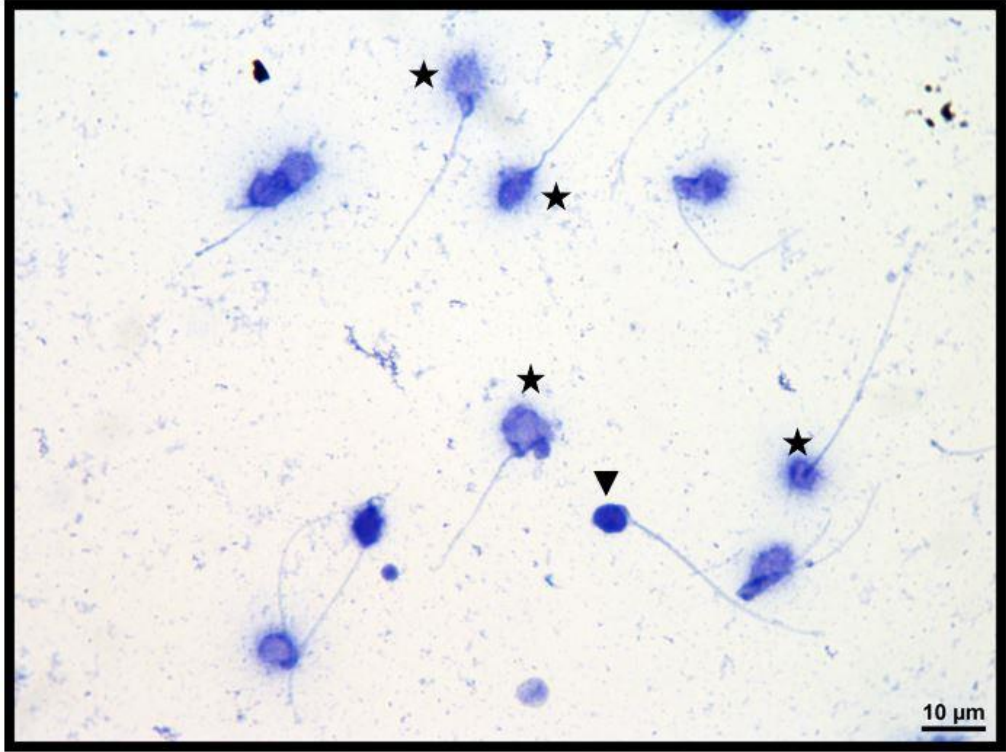
Şekil 6.2.1.1.: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (Halosperm kit) ile gösterilmiştir. Ok ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmektedir. Yıldız ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmemektedir. (DNA fragmentasyonu < %30 olan 39 numaralı hastaya ait ışık mikroskopik görüntü X100)



Şekil 6.2.1.2.: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (Halosperm kit) ile gösterilmiştir. Ok başı ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmektedir. (DNA fragmentasyonu > %30 olan 22 numaralı hastaya ait ışık mikroskopik görüntü X100)



Şekil 6.2.1.3: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (Halosperm kit) ile gösterilmiştir. DNA fragmentasyonu < %30 olan 3 numaralı hastaya ait ışık mikroskopik görüntü X100. Yıldız ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmemektedir.



Şekil 6.2.1.4: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (Halosperm kit) ile gösterilmiştir. DNA fragmentasyonu < %30 olan 31 numaralı hastaya ait ışık mikroskopik görüntü (X100) Ok başı ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmektedir. Yıldız ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmemektedir.

6.2.2. Kromatin Bütünlüğü

Çalışmamızda kromatin bütünlüğü ile diğer parametrelerin ilişkileri Tablo 6.2.2.1, 6.2.2.2, 6.2.2.3 ve 6.2.2.4'te gösterilmiştir. Kromatin bütünlüğü analizi için uygulanan Toluidin mavi boyama analizi sonuçları Şekil 6.2.2.1 ve Şekil 6.2.2.2 6.2.2.3, 6.2.2.4, 6.2.2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 6.2.2.1: Kromatin bütünlüğü analizinin oksidatif stres parametreleri ve DNA fragmentasyonu ile arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

Kromatin Bütünlüğü (%)	TAS (mmol Trolox eq.)	TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	OSI	MDA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	DNA Fragmentasyonu (%)
İlişki Analizi	- 0,11	- 0,12	0,02	0,09	- 0,30
<i>p</i> Değeri	0,49	0,48	0,89	0,61	0,86

Tablo 6.2.2.2: Kromatin bütünlüğü analizi ile cAMP bağımlı PKA yolu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

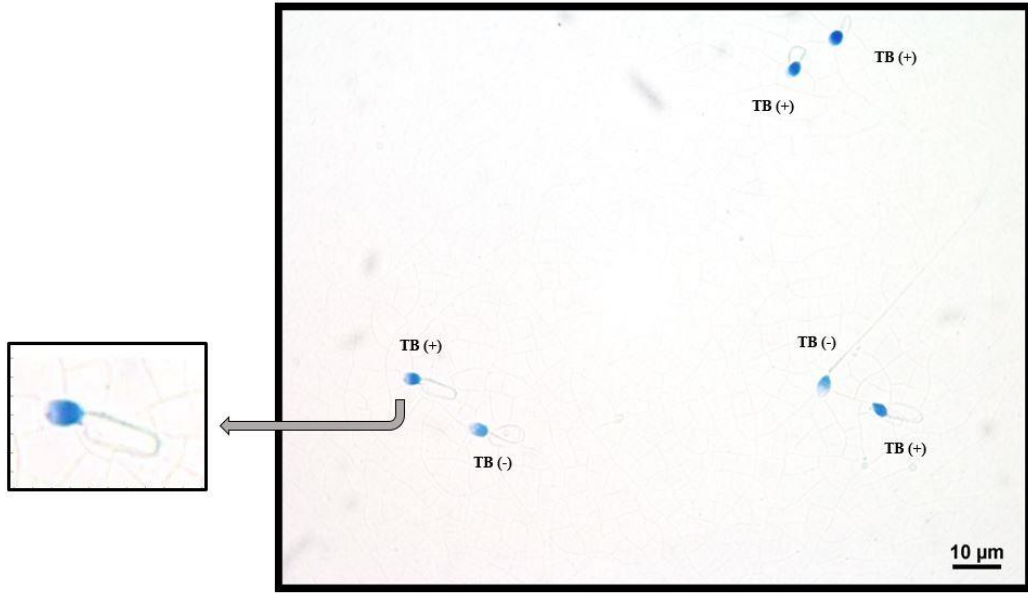
Kromatin Bütünlüğü (%)	cAMP (pmol/mL)	PKA	p-PKA
İlişki Analizi	- 0,07	0,07	0,14
<i>p</i> Değeri	0,67	0,67	0,40

Tablo 6.2.2.3: Kromatin bütünlüğü analizi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

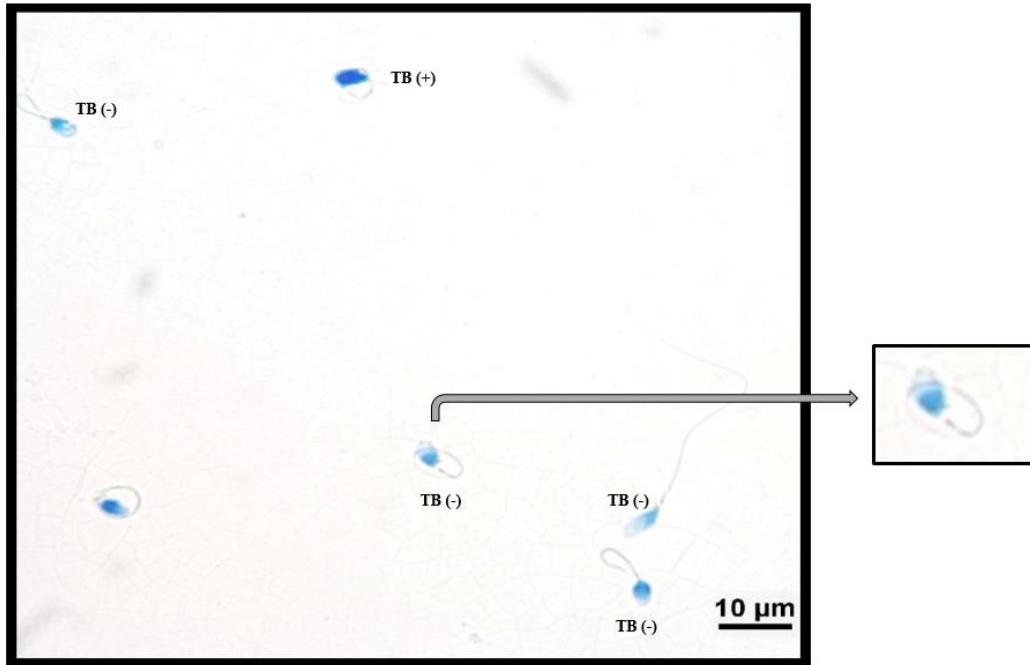
Kromatin Bütünlüğü (%)	Gebelik	Fertilizasyon Oranı	İyi Embriyo Oranı	Blastosist Oranı
İlişki Analizi	0,38	- 0,13	0,10	- 0,11
p Değeri	0,03	0,43	0,57	0,50

Tablo 6.2.2.4: Kromatin bütünlüğü analizi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

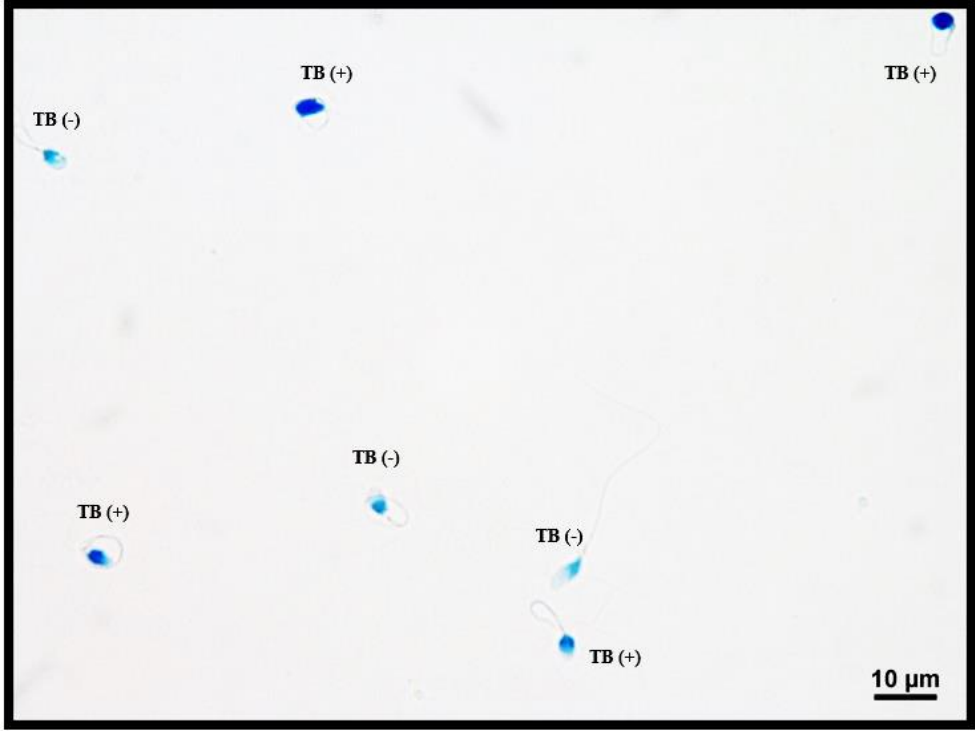
Kromatin Bütünlüğü (%)	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu (x10⁶/mL)	Toplam Motilite (%)	Progresif Sperm Sayısı (x10⁶/mL)
İlişki Analizi	0,18	- 0,30	- 0,13	- 0,22
p Değeri	0,29	0,06	0,43	0,18



Şekil 6.2.2.1: Sperm kromatin bütünlüğü Toluidin Mavisi boyama tekniği ile gösterilmiştir. Anormal kromatin bütünlüğüne sahip olanlar koyu mavi olarak boyanmış ve TB(+) olarak belirtilmiştir. Normal kromatin yapısına sahip sperm hücreleri açık mavi renge boyanmış ve TB (-) olarak belirtilmiştir. (ışık mikroskopik görüntü X100).



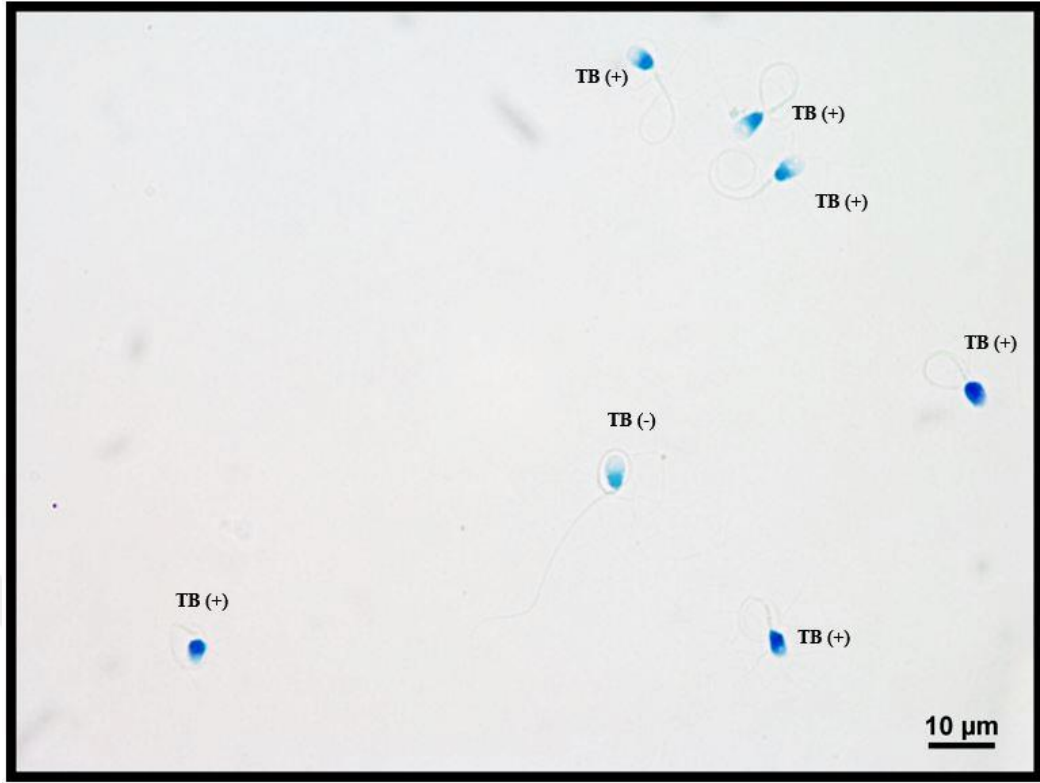
Şekil 6.2.2.2: Toluidin Mavisi boyama tekniği ile açık mavi renge boyanan TB (-) sperm hücresi. (ışık mikroskopik görüntü X100).



Şekil 6.2.2.3: 8 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100)



Şekil 6.2.2.4: 26 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100)



Şekil 6.2.2.5: 40 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100)

6.3. cAMP Bağımlı PKA Yolağı Parametreleri

Çalışmamızın sonuçları Tablo 6.3.1’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her parametrenin altında belirtilmiştir.

Tablo 6.3.1: cAMP bağımlı PKA yolağı ortalama ekspresyon oranı istatistiksel analizi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

cAMP BAĞIMLI PKA YOLAĞI PARAMETRELERİ	cAMP (pmol/mL)	PKA	p -PKA
Ortalama Değer	0,72 \pm 0,21	1,23 \pm 0,99	1,67 \pm 0,74

6.3.1. cAMP

Çalışmamızdaki cAMP analizi ile diğer parametrelerin ilişkileri Tablo 6.3.1.1, 6.3.1.2, 6.3.1.3 ve 6.3.1.4’te ve Şekil 6.3.1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 6.3.1.1: cAMP analizi ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

cAMP (pmol/mL)	TAS (mmol Trolox eq.)	TOS (umol/H ₂ O ₂ /eq.)	OSI	MDA(umol/L)
İlişki Analizi	0,19	0,09	- 0,14	- 0,46**
<i>p</i> Değeri	0,25	0,59	0,39	0,003

Tablo 6.3.1.2: cAMP analizinin DNA-kromatin parametreleri ve cAMP bağımlı PKA yolağı proteinleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

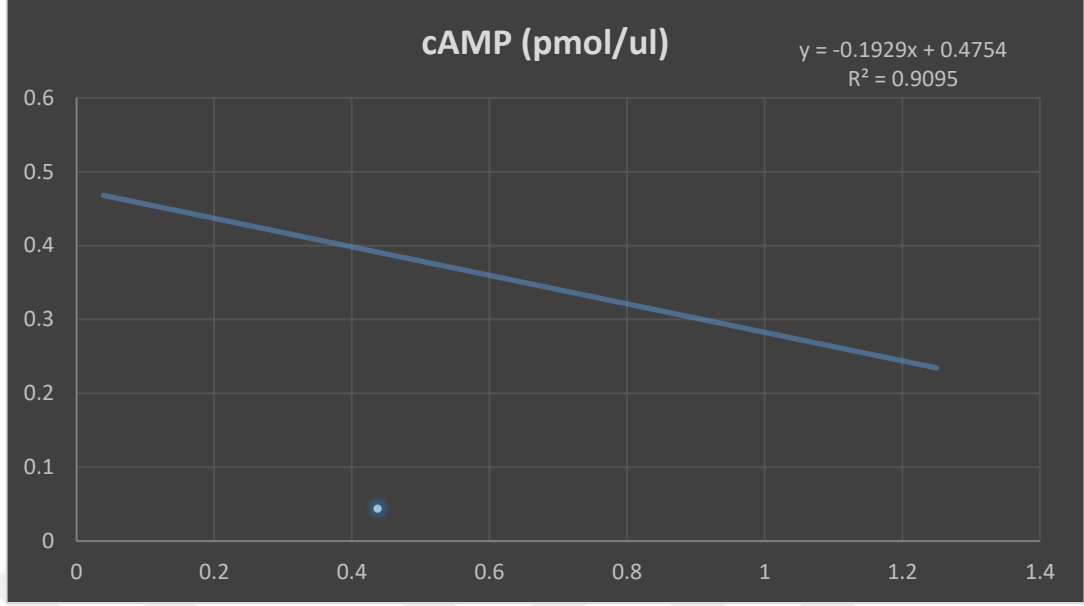
cAMP (pmol/mL)	DNA Fragmentasyonu (%)	Kromatin Bütünlüğü (%)	PKA	p-PKA
İlişki Analizi	0,23	- 0,07	- 0,46**	- 0,11
<i>p</i> Değeri	0,16	0,67	0,004	0,58

Tablo 6.3.1.3: cAMP analizi ile ICSI parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

cAMP (pmol/mL)	Gebelik	Fertilizasyon Oranı	İyi Embriyo Oranı	Blastosist Oranı
İlişki Analizi	- 0,02	- 0,08	0,08	- 0,24
<i>p</i> Değeri	0,91	0,64	0,63	0,15

Tablo 6.3.1.4: cAMP analizi ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

cAMP (pmol/mL)	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu (x10 ⁶ /mL)	Toplam Motilite (%)	Progresif Sperm Sayısı (x10 ⁶ /mL)
İlişki Analizi	- 0,13	- 0,09	0,19	0,11
<i>p</i> Değeri	0,43	0,60	0,24	0,50



Şekil 6.3.1.1.: cAMP standart kalibrasyon eğrisi.

6.3.2. PKA ve p-PKA

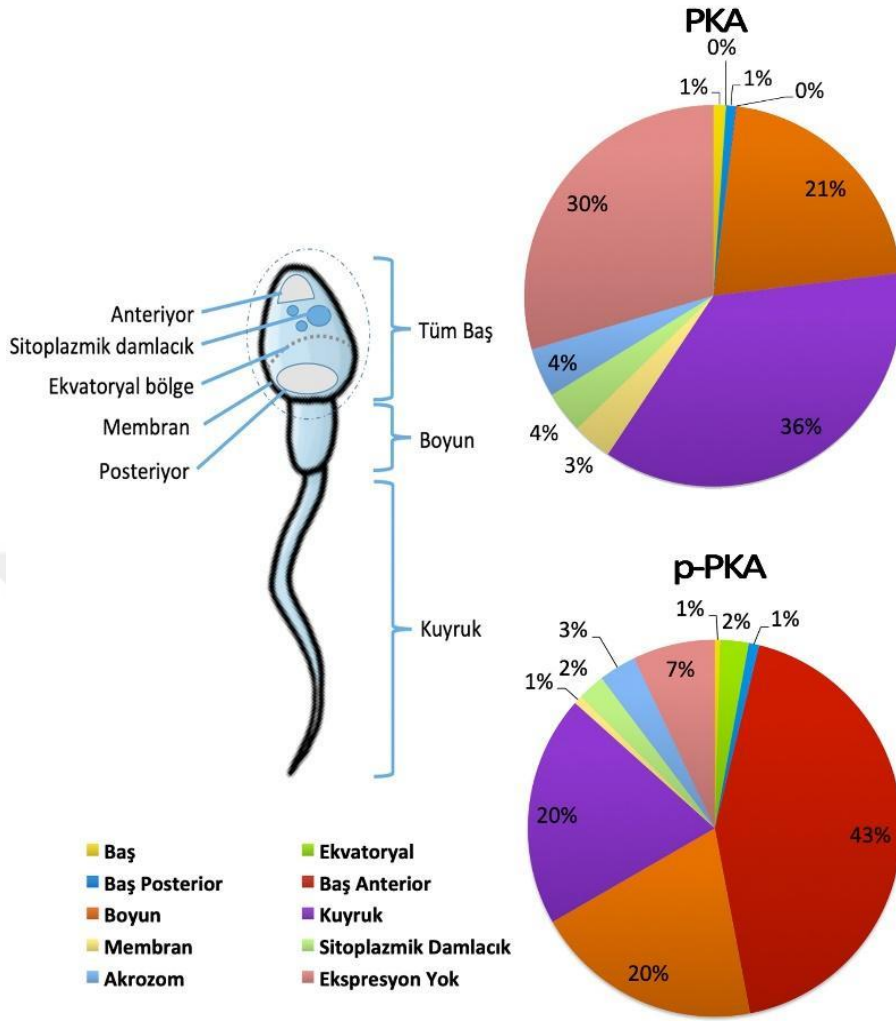
Çalışmamızdaki cAMP bağımlı PKA yolağı proteinleri ile diğer parametrelerin ilişkileri Tablo 6.3.2.1, Tablo 6.3.2.2 ve Şekil 6.3.2.1’de gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal analiz sonuçları Şekil 6.3.2.2, Şekil 6.3.2.3, Şekil 6.3.2.4, Şekil 6.3.2.5, Şekil 6.3.2.6, Şekil 6.3.2.7, Şekil 6.3.2.8, 6.3.2.9 ve 6.3.2.10, 6.3.2.11, 6.3.2.12, 6.3.2.13’de gösterilmiştir.

Tablo 6.3.2.1: cAMP bağımlı PKA yolağının diğer parametrelerle ilişkinin değerlendirildiği analiz

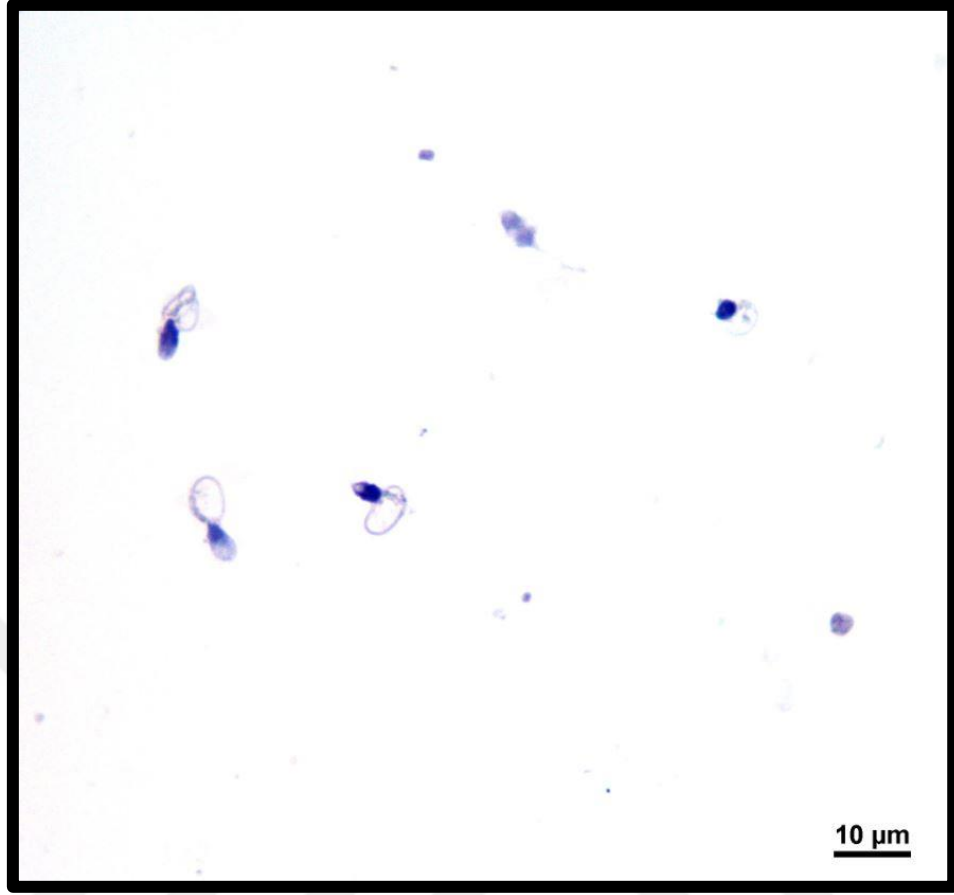
Parametreler	PKA		pPKA	
	İlişki Analizi	pDeğeri	İlişki Analizi	pDeğeri
TAS (mmol Trolox eq.)	- 0,26	0,11	- 0,25	0,13
TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$)	- 0,11	0,50	0,08	0,61
OSI	0,17	0,31	0,18	0,28
MDA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	0,42**	0,008	0,04	0,80
DNA Fragmentasyonu (%)	- 0,19	0,24	- 0,08	0,65
Kromatin Bütünlüğü (%)	0,07	0,67	0,14	0,40
cAMP(pmol/ml)	- 0,46**	0,004	- 0,11	0,51
PKA	-	-	0,47**	0,002
pPKA	0,47**	0,002	-	-
Gebelik	- 0,25	0,16	- 0,14	0,43
Fertilizasyon Oranı	0,16	0,34	0,37	0,02
İyi Embriyo Oranı	- 0,17	0,31	- 0,17	0,32
Blastosist Oranı	0,07	0,68	0,05	0,77
Sperm Hacmi(mL)	0,22	0,17	0,10	0,53
Toplam Motilite (%)	0,11	0,51	- 0,15	0,35
Progresif Sperm Sayısı ($\times 10^6/\text{mL}$)	0,31	0,06	0,11	0,50

Tablo 6.3.2.2: cAMP bağımlı PKA yolağı proteinlerinin (PKA ve p-PKA) ekspresyon bölgelerinin ortalama oranları. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir

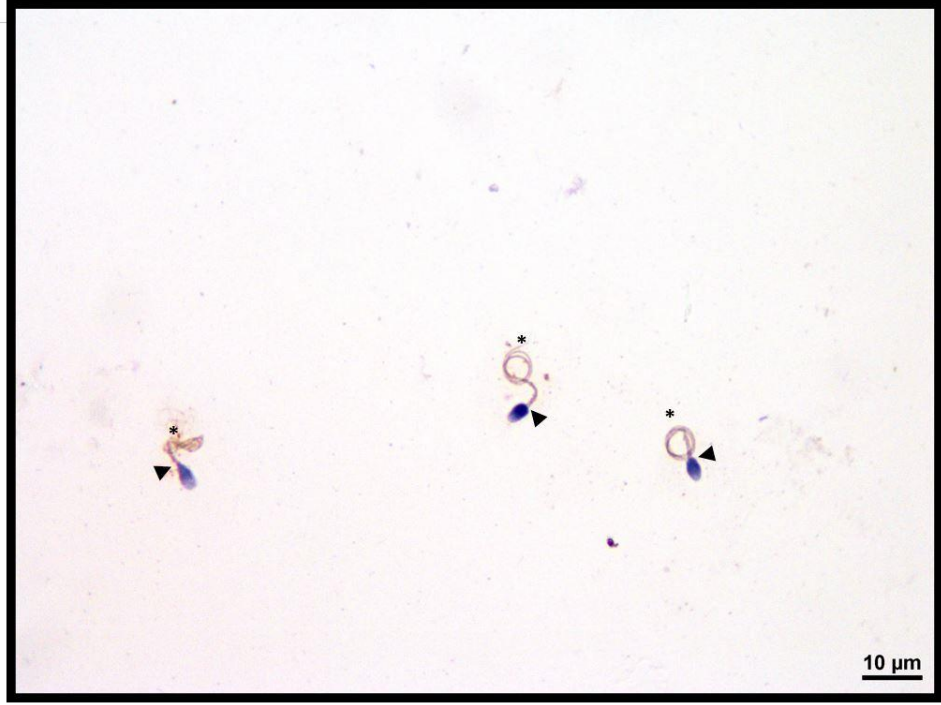
Ekspresyon Bölgeleri	PKA	pPKA
	Ortalama (%)	Ortalama (%)
Baş	1,00 \pm 2,26	0,84 \pm 1,62
Ekvatoryal	0,06 \pm 0,31	4,40 \pm 9,81
Baş Posterior	0,81 \pm 1,89	1,59 \pm 3,10
Baş Anterior	0,05 \pm 0,19	77,10 \pm 29,27
Boyun	20,60 \pm 15,79	35,28 \pm 11,07
Kuyruk	35,40 \pm 17,85	35,46 \pm 10,96
Membran	3,28 \pm 6,96	1,32 \pm 2,63
Sitoplazmik Damlacık	3,43 \pm 4,00	4,20 \pm 4,55
Akrozom	4,05 \pm 5,48	5,79 \pm 6,54
Ekspresyon Yok	28,81 \pm 31,00	12,70 \pm 21,91



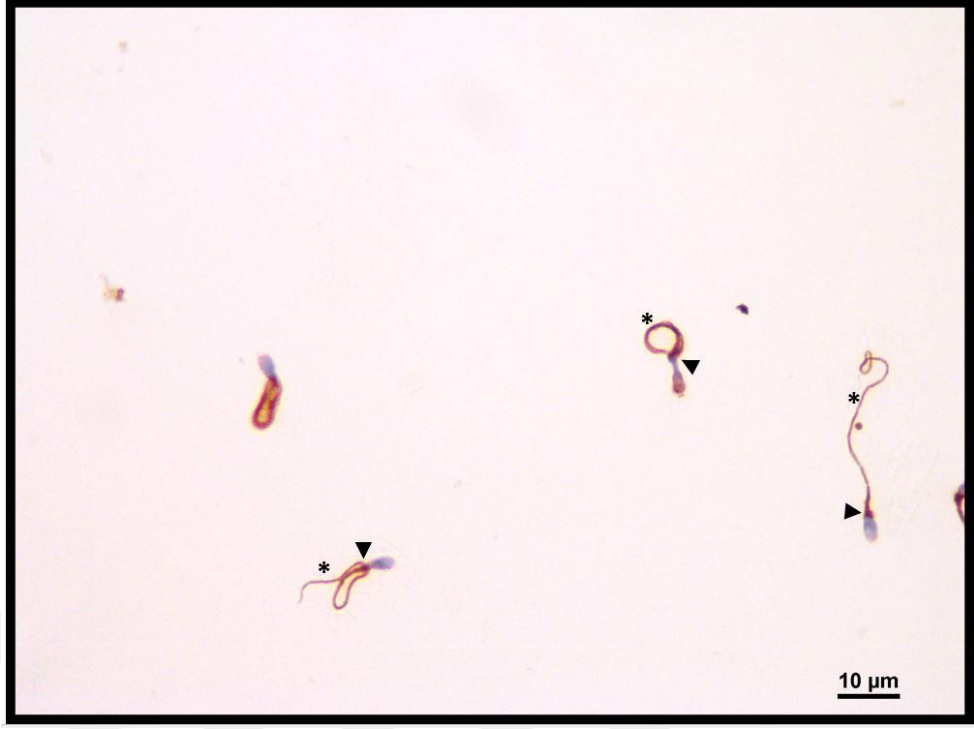
Şekil 6.3.2.1: cAMP bağımlı PKA yolağı proteinlerinin (PKA ve p- PKA) ekspresyon oranlarının bölgesel dağılımı.



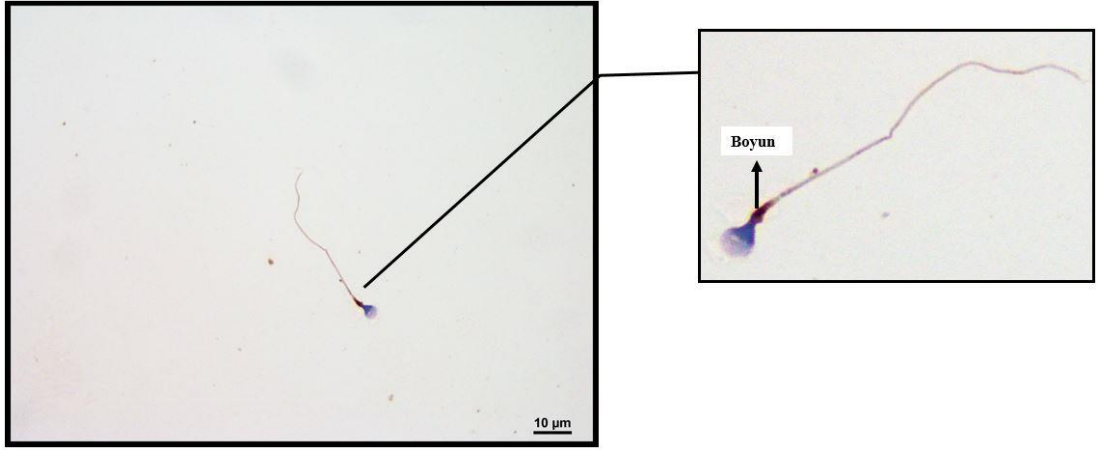
Şekil 6.3.2.2: PKA proteinin immünohistokimyasal analizi. (negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)



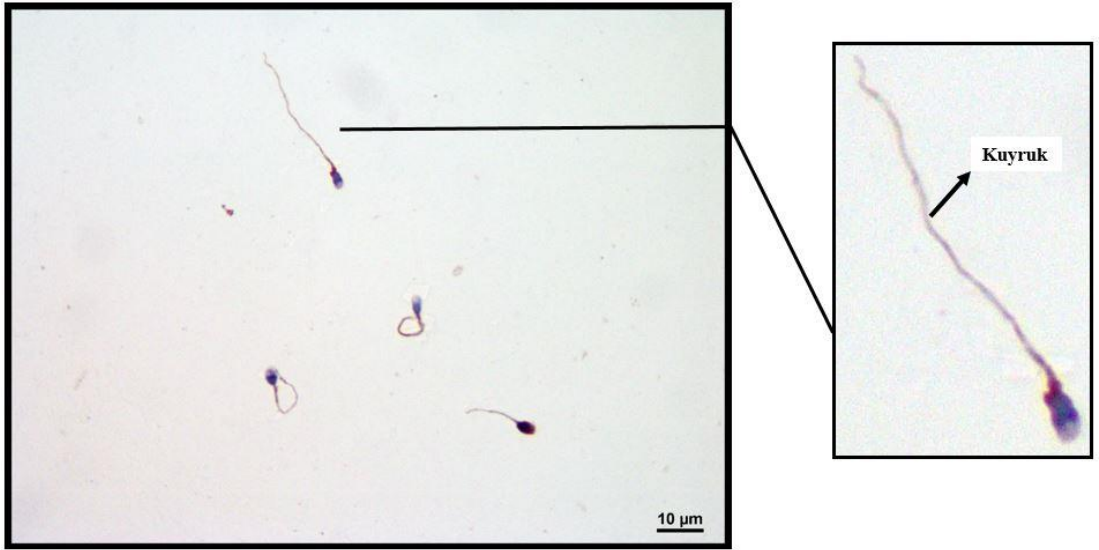
Şekil 6.3.2.3: PKA proteinin immünohistokimyasal analizi. Ok başı boyun, yıldız ise kuyruk bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir.(ışık mikroskopik görüntü X100)



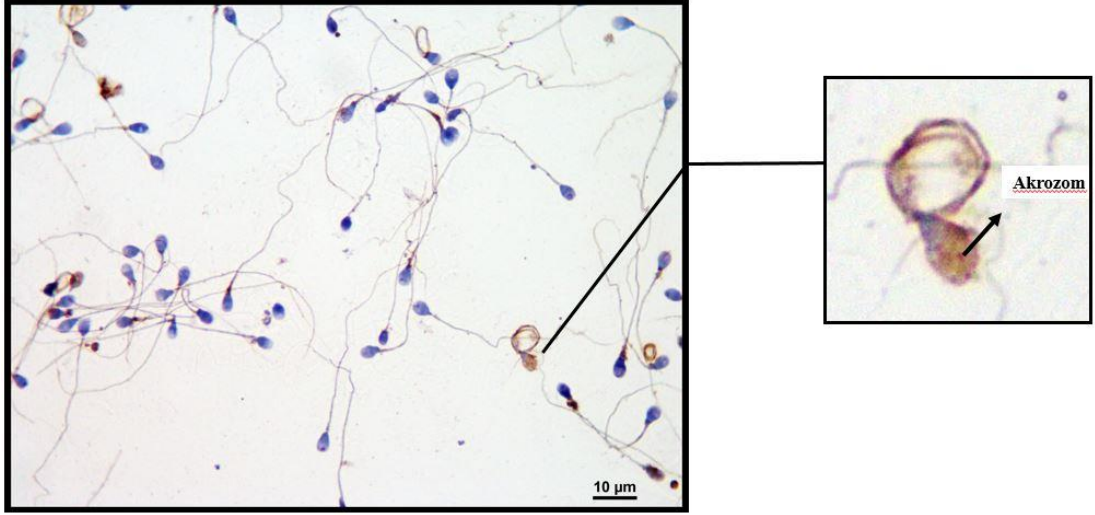
Şekil 6.3.2.4: PKA proteinin immünohistokimyasal analizi. Ok başı boyun, yıldız ise kuyruk bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir. (ışık mikroskopik görüntü X100)



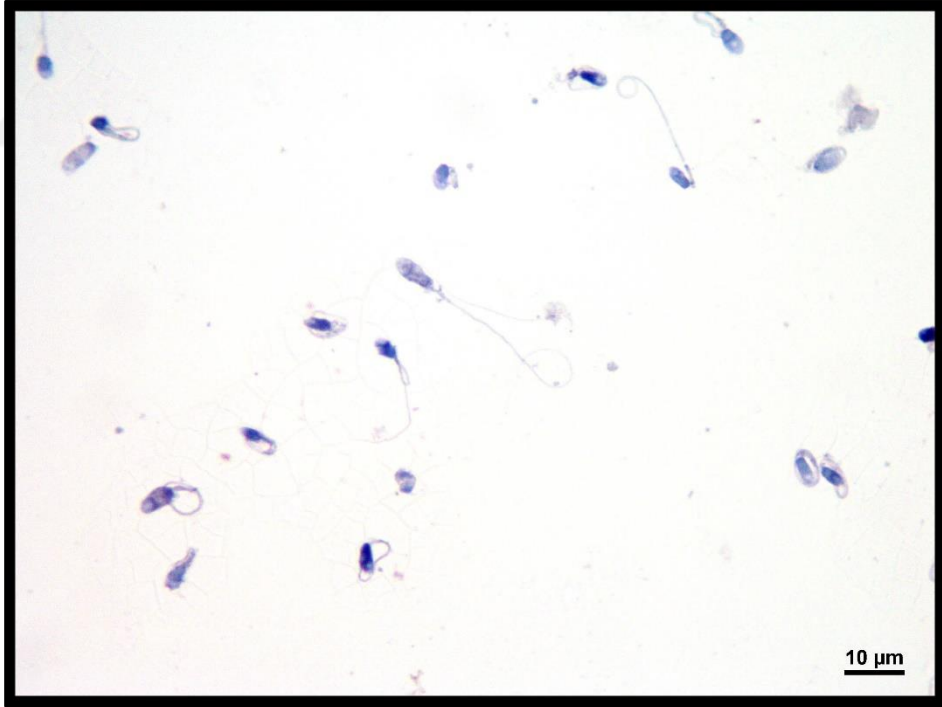
Şekil 6.3.2.5: Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PKA protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100.



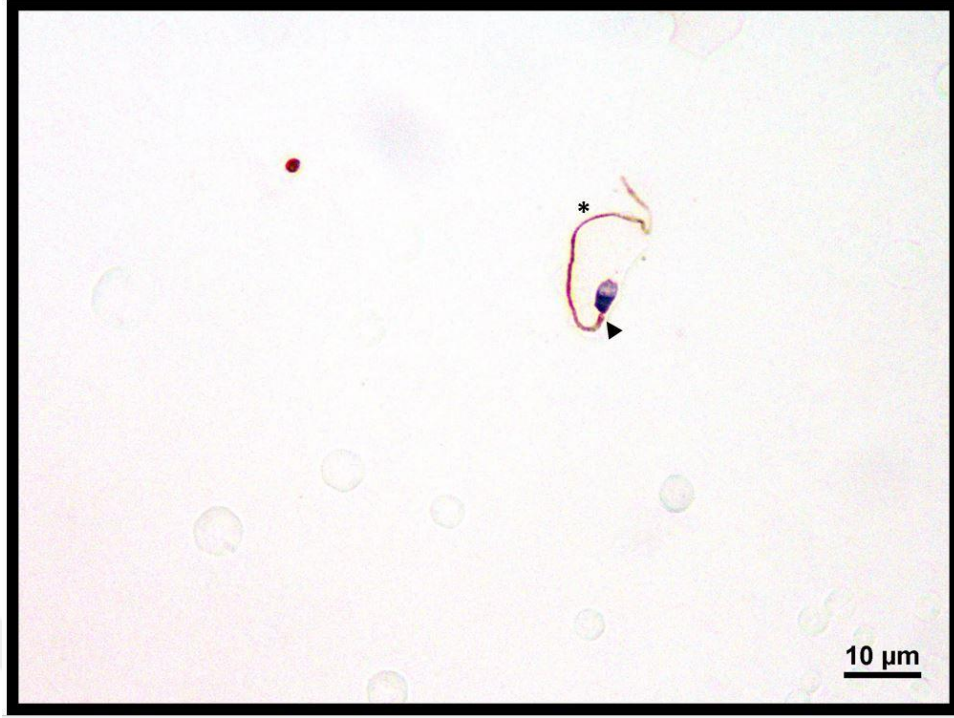
Şekil 6.3.2.6: Sperm hücresinin kuyruk bölgesindeki PKA protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100



Şekil 6.3.2.7: Sperm hücresinin akrozom bölgesindeki PKA protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100



Şekil 6.3.2.8: p-PKA proteinin immünohistokimyasal analizi. (negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)



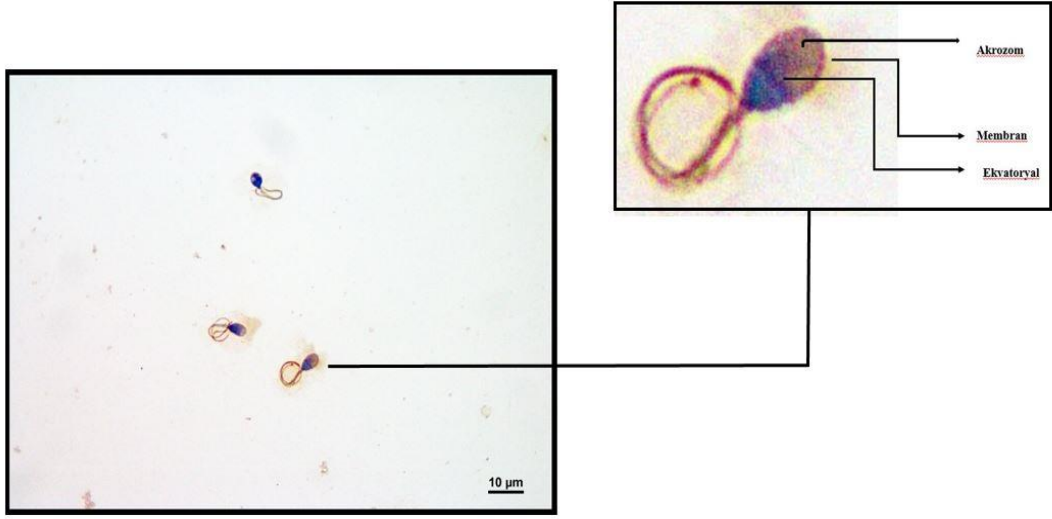
Şekil 6.3.2.9: p-PKA proteinin immünohistokimyasal analizi. Ok başı boyun, yıldız ise kuyruk bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir. (ışık mikroskopik görüntü X100)



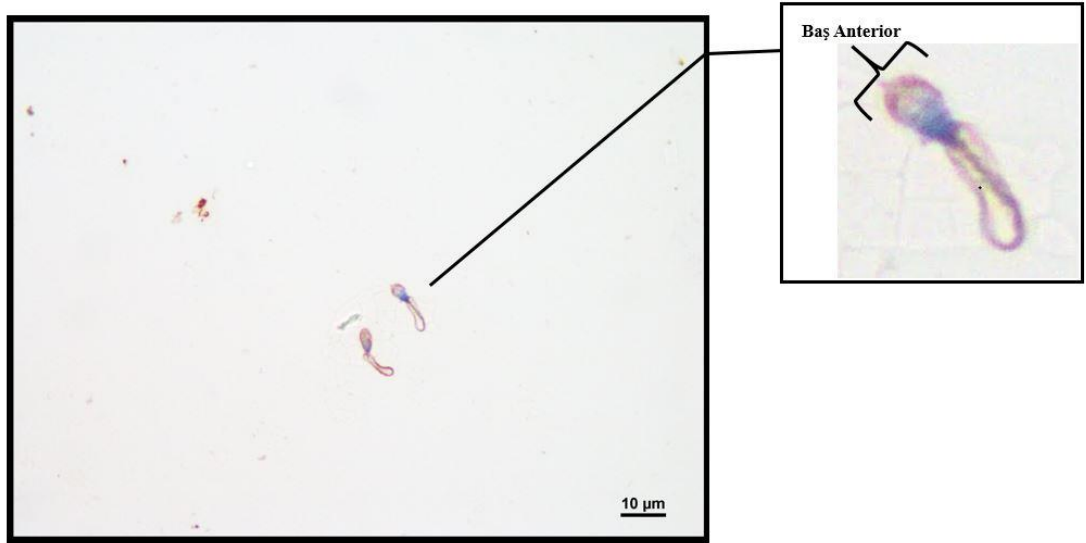
Şekil 6.3.2.10: p-PKA proteinin immünohistokimyasal analizi. Ok başı boyun, yıldız kuyruk, ok ise akrozom ve başın ön membran bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir. (ışık mikroskopik görüntü X100)



Şekil 6.3.2.11: p-PKA proteinin immünohistokimyasal analizi. Ok başı boyun, yıldız ise kuyruk bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir. (ışık mikroskopik görüntü X100)



Şekil 6.3.2.12: Membran, ekvatoryal ve akrozom bölgelerindeki p-PKA proteinin ekspresyon görüntüsü.



Şekil 6.3.2.13: Baş anterior bölgesindeki p-PKA protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü x100.

6.4. ICSI Parametreleri

Çalışmamızın sonuçları Tablo 6.4.1 ve 6.4.2’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her parametrenin altında belirtilmiştir.

Tablo 6.4.1: ICSI Parametrelerinin istatiksel analizinin değerlendirilmesi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

ICSI Parametreleri	Ortalama (%)
MII oosit Sayısı	6,00 \pm 3,92
Toplanan Oosit Sayısı	7,90 \pm 4,94
Fertilizasyona uğrayan oosit sayısı	5,44 \pm 3,57
İyi Kalite Embriyo Sayısı	3,42 \pm 2,40
Fertilizasyon Oranı	92,61 \pm 10,53
İyi Kalite Embriyo Oranı	65,32 \pm 22,80
Blastosist Oranı	43,29 \pm 38,37
Transfer Edilen Embriyo Sayısı	1,39 \pm 0,55
Gebelik	0,79 \pm 0,99
Yaş	33,03 \pm 6,25

Tablo 6.4.2: ICSI parametrelerinin birbirleri ile ilişkinin değerlendirildiği analiz

İlişki Analizi <i>p</i> Değeri	Gebelik	Fertilizasyon Oranı	İyi Embriyo Oranı	Blastosist Oranı
Gebelik	-	- 0,46	0,17	0,22
		0,007	0,36	0,22
Fertilizasyon Oranı	- 0,46	-	0,29	- 0,14
	0,007		0,08	0,42
İyi Embriyo Oranı	0,17	0,29	-	- 0,09
	0,36	0,08		0,58

6.5. Sperm Parametreleri

Çalışmamızın sonuçları Tablo 6.5.1 ve 6.5.2’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her parametrenin altında belirtilmiştir.

Tablo 6.5.1: Sperm Parametrelerinin istatistiksel analizinin değerlendirilmesi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Sperm Parametreleri	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu ($\times 10^6$ /mL)	Toplam Motilite Oranı (%)	Progresif Sperm Sayısı ($\times 10^6$ /mL)
Ortalama Değer	3,24 \pm 1,30	30,78 \pm 27,79	55,08 \pm 16,44	9,73 \pm 12,87

Tablo 6.5.2: Sperm parametrelerinin birbirleri ile arasındaki ilişkinin değerlendirildiği analiz

İlişki Analizi <i>p</i> Değeri	Sperm Hacmi (mL)	Sperm Konsantrasyonu (x10 ⁶ /mL)	Toplam Motilite Oranı (%)	Progresif Sperm Sayısı (x10 ⁶ /mL)
Sperm Hacmi (mL)	-	- 0,13	0,09	- 0,19
		0,44	0,56	0,22
Sperm Konsantrasyonu (x10 ⁶ /mL)	- 0,13	-	0,26	0,82**
	0,44		0,11	0,00
Toplam Motilite Oranı (%)	0,09	0,26		0,44**
	0,56	0,11	-	0,005

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, seminal plazmada belirlenen oksidatif stres parametrelerinin sperm hücreleri üzerine hücresel, genetik ve fonksiyonel etkilerini ve bu spermler kullanılarak yapılan bir tüp bebek (ICSI) tedavisinde, tedavinin başarı ölçütlerine etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla, semende oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS, OSİ, MDA değerleri), cAMP aracılı PKA sinyal yolağı bileşenleri ekspresyon seviyeleri ve hücresel lokasyonları (cAMP, PKA, p-PKA), genetik yapı parametreleri (DNA fragmentasyonu, Kromatin bütünlüğü), semen parametreleri (konsantrasyon, motilite progresif motilite), ICSI parametreleri (fertilizasyon oranı, embriyo gelişme oranı, iyi kalite embriyo oranı, blastosist gelişme oranı, iyi kalite blastosist oranı, gebelik oranı) araştırılmış ve bu parametrelerin birbiri ile ilişkisi analiz edilmiştir.

Çalışmamıza, sonuçları etkileyebilecek tüm diğer parametrelerin etkisini minimize edebilmek ve oksidatif stresin etkilerini direkt olarak analiz edebilmek için sperm parametrelerinde problem belirlenmemiş normozoospermik (DSÖ,2010 kriterlerine göre), aynı yaş grubunda ve kadın faktörlü infertilite nedeniyle ICSI tedavisine alınmış vakalar dahil edilmiştir.

Seminal plazmada oksidatif durumun belirlenmesi için 4 farklı parametre kullanılmıştır:

1) Oksidatif stres indeks (OSİ): TOS ve TAS'nin birbirine oranı alınarak hesaplanan ve oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengeyi ortaya koyan,

2) Malondialtehit (MDA) seviyesi: Oksidatif hasara bağlı olarak sperm membranında ortaya çıkan lipid peroksidasyonunun bir yan ürünü olan ve seminal plazmadaki oksidatif stres seviyesini belirlemek için etkili bir belirteç olarak kullanılan malondialtehit seviyesi,

3) Toplam oksidan miktarı (TOS): Seminal plazmadaki tüm oksitleyici radikallerin toplam miktarı,

4) Toplam antioksidan miktarı (TAS): Seminal plazmadaki tüm nötralize edici antioksidanların toplam miktarı.

Sözü edilen oksidatif stres parametrelerinin (TOS, TAS, OSI, MDA);

- 1) Sperm hücrelerinin kromatin yapısı ve DNA bütünlüğüne etkileri,
- 2) Tüm hücrelerde önemli işlevlere sahip olan (glikojen, şeker ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi, vd.) sinyal yollarından biri olan 'cAMP aracılı PKA yolağı' proteinlerinin (cAMP, PKA, p-PKA) lokalizasyonları ve ekspresyon seviyelerine etkileri,
- 3) Semen parametrelerine (konsantrasyon, motilite, progresif motilite) etkileri,
- 4) Tüp bebek (ICSI) parametrelerine (fertilizasyon oranı, embriyo gelişme oranı, embriyo kalitesi, blastosiste gitme oranı, blastosist kalitesi, gebelik) araştırılmıştır.

Tüm bu bulgular birbirleri ile ilişkilendirilerek, oksidatif stresin sperm hücrelerine etkileri, bu etkileri hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği ve bu etkilerin klinik sonuçları üzerine bütüncül bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Böylece, erkek infertilite patogenezinde önemli rolü olan seminal oksidatif stresin etkilerinin kapsamlı olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır. Araştırılan tüm parametreler, aşağıda alt başlıklar halinde tartışılmıştır.

7.1. Oksidatif Stres Parametreleri

7.1.1. Oksidatif Stres İndeksi

Çalışmamızda seminal plazmada belirlenen TOS ve TAS' in birbirine oranı alınarak hesaplanan ve oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki oksidatif dengeyi ortaya koyan oksidatif stres indeks (OSİ) değeri ile araştırılan diğer parametreler arasında ilişki belirlenmemiştir. Çalışmamızda OSİ değerleri ortalama 1,08 olarak bulunmuştur.

OSİ ile sperm ve ICSI parametreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çok az sayıda çalışmadan birinde [156], çalışmamızın bulguları ile benzer şekilde nitro bazlı bir kolorimetrik test olan mavi tetrazolium (NBT: OxiSperm, Halotech DNA®)

kullanılarak belirledikleri seminal oksidatif stres seviyesi ile semen parametreleri ve gebelik oranları arasında ilişki bulamamışlardır. Bu bulgu bize, (OSİ değerleri ile analiz edilen parametreler arasında ilişki bulunmaması) oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengeyi ifade eden OSİ değerinin, normozoospermik vakalarda çok yüksek olmaması nedeniyle elde edildiğini düşündürmüştür. Oksidasyon redüksiyon potansiyeli (ORP), oksidatif stresi doğrudan ölçmek için kullanılan alternatif tekniklerden biridir. MiOXSYS kullanarak oksidasyon-redüksiyon potansiyellerinin (ORP) ölçüldüğü bir başka çalışmada ise [157], ORP düzeylerindeki artışla birlikte sperm konsantrasyonu ve motilitesinde de artış gösterilmiştir. İnfertil ve fertil hasta grubunun semendeki ORP düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada [8], ORP seviyesi ile sperm parametreleri (konsantrasyon, toplam sperm sayısı, motilite ve morfoloji) arasında negatif ilişki gösterilmiştir. Bu çalışmada da, aynı yaklaşımla infertil hastaların çalışmaya dahil edilmesi nedeniyle bu sonuçların elde edileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda dikkate değer noktalardan biri ise hasta popülasyonumuzda TOS miktarlarının yüksek olduğu vakalarda bu yükselişin TAS seviyeleri ile kompanse edildiğinin gözlemlenmesidir. Bu gözlem doğrultusunda, normozoospermik vakalarda oksidatif dengenin iyi korunduğu, buna bağlı olarak da sperm parametrelerinin normal sınırlar içinde kaldığı ileri sürülebilir.

7.1.2. Lipit Peroksidasyonu (MDA Analizi)

Sperm plazma membranı, metilen grupları arasında konjuge edilmemiş çift bağlara sahip PUFA'lar şeklinde yüksek seviyelerde lipitlere sahiptir. Metil, karbon-hidrojen bağının gücünü azaltmakta ve hidrojeni oksidatif hasara karşı duyarlı hale getirmektedir. Hücre içi ROT seviyeleri kontrolsüz bir şekilde artması, plazma zarı yağ asitlerinin yaklaşık % 60' ının kaybolduğu ve zar akışkanlığının azaldığı ayrıca iyonların, membran reseptörlerinin ve enzimlerin etkilerinin inhibe edildiği lipit peroksidasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle LPO, anormal döllenmeye yol açan otokatalitik, kendiliğinden ilerleyen kimyasal bir reaksiyondur ve bu oksidatif hasarın mekanizması başlatma, yayılma ve sonlanma olarak üç ana adımda gerçekleşmektedir

[152,158,159]. Başlatma, karbon-karbon çift bağlarından hidrojen atomlarının ayrılmasını içermektedir, böylece serbest radikalleri iter, bu da daha sonra lipit radikalleri oluşturmaktadır ve daha sonra peroksil radikallerini oluşturan oksijen ile reaksiyona girmektedir [158]. Peroksil radikalleri, özellikle bakır ve demir gibi metaller bulunduğunda, otokatalitik reaksiyon zincirini ilerleterek tekrar lipitlerden hidrojen atomları oluşturabilmektedir. Oksidatif hasarın yayılma aşaması, hidroperoksitin bozunması nedeniyle sitotoksik aldehytler üreten ve ardışık lipitlerle reaksiyona giren radikallerle devam etmektedir [158,160]. Peroksil ve alkil radikallerinin oluşumu, reaksiyon zinciri sona erene kadar ve malondialdehit (MDA) olan kararlı bir nihai ürün oluşana kadar bu adımda döngüsel bir şekilde sürer [158]. Bu nedenle MDA, sperm hücrelerini etkileyen peroksidatif hasar seviyesini belirlemek ve izlemek için kullanılabilen bir biyokimyasal belirteçtir.

Çalışmamızda oksidatif stres belirteçlerinden biri olan MDA seviyesi ile sperm ve ICSI parametreleri arasında herhangi bir ilişki belirlenmemesine rağmen, cAMP bağımlı PKA yolağı arasında pozitif bir ilişki gözlenmiştir.

İnfertil ve fertil erkek hastaların TAS ve MDA seviyelerini değerlendiren bir çalışmada bir antioksidan olan çinko ile in vitro inkübasyondan sonra sadece infertil hastalarda TAS seviyesinde önemli bir artış bulunmuştur. Buna karşılık hem fertil hem de infertil hastaların lipit peroksidasyon değerleri üzerinde bir etkisi bulunmamıştır [161]. Bu çalışmanın bulguları, bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir. IUI işlemi uygulanan subfertil (normozoospermi, teratozoospermi oligoteratozoospermi) ve fertil hastaların dahil edildiği bir başka çalışmada, ROT ve TAS değerleri ölçülüp semen parametreleri ile karşılaştırılmış ve oligoteratozoospermisi olan hastalarda anlamlı derecede düşük TAS seviyeleri ile yüksek MDA düzeyleri ve seminal MDA düzeyleri ile sperm konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi arasında negatif ilişki gösterilmiştir [162]. Çalışma sonuçlarımızın benzer bulunmaması, bu çalışmada subfertil hastaların kullanılması ve IUI adı verilen farklı bir yardımla üreme tekniğinin kullanılıyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

MDA ile cAMP düzeyinin ilişkisinin değerlendirildiği güncel bir çalışmada, bir oksidan olan merkürük klorür ile muamele edilen keçi spermünde, artan merkürük klorür konsantrasyonunun etkisi ile TAS miktarının azaldığını, MDA seviyesinin ve cAMP düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir [163]. Bu sonuçlar çalışmamızın bulgularını destekler niteliktedir. Seminal plazma ile bu konuda yapılmış başka bir çalışma bulunmamasına rağmen, sıçan kalbinde yapılan ve BU-XIN RUAN-MAI granülünün miyokard iskemisini doza bağlı bir şekilde iyileştirdiğini gösteren bir çalışmada, serum MDA içeriği ile cAMP düzeyinin negatif ilişkili olduğu bildirilmiştir [164].

7.1.3. Toplam Oksidan Seviyesi

Ortalama TOS seviyesinin 13,12 $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq}$. çıktığı çalışmamızda, seminal plazmadaki TOS seviyesi ile sperm motilitesinin ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Literatürde, artan ROT seviyeleri, sperm hareketliliğindeki azalma ile ilişkilendirilmiş çalışmalar mevcuttur [165 – 167] ancak arasındaki bağlantı tam olarak anlaşılammıştır. Bunu açıklamak için ileri sürülen hipotezlerden biri, H_2O_2 ' in hücre zarı boyunca sitoplazmaya yayılabilmesi ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) gibi enzimlerin aktivitesini inhibe edebilmesidir. Bu enzim, heksoz monofosfat şant yoluyla glikoz akış hızını kontrol edebilmekte ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) hücre içi kullanılabilirliğini kontrol etmektedir. Bu da NADPH oksidaz olarak bilinen bir enzim sistemi ile ROT oluşumunu beslemek için sperm hücresi tarafından bir elektron kaynağı olarak kullanılmaktadır [168]. G6PD' ın inhibisyonu, NADPH' ın mevcudiyetinde bir azalmaya ve eş zamanlı olarak oksitlenmiş glutatyon birikimine yol açmaktadır. Bu sperm hücresinin antioksidan savunma sistemini azaltabilmekte ve membran fosfolipit peroksidasyonunu artırabilmektedir [169]. Başka bir hipotez ise aksonemal protein fosforilasyonunda bir azalmaya neden olan ve sperm hareketliliğini azaltan, her ikisi de membran akışkanlığında ve sperm-oosit füzyonunda bir azalma ile ilişkili olan bir dizi kaskad kimyasal reaksiyonu içermektedir [170].

Çalışmamızda TOS ile ICSI parametreleri arasında bir ilişki bulunmamıştır. Sperm hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT; H₂O₂, O₂⁻), akış sitometrisi kullanılarak değerlendirildiği bir çalışmada, yüksek düzeyde hücre içi ROT' nin, intrasitoplazmik sperm enjeksiyon tedavisinden sonra embriyo pronükleer oluşumunu olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Ancak hasta grubu, ICSI tedavisine alınan infertil erkeklerden oluştuğundan dolayı bizim çalışmamızdan farklılık gösterdiği düşünülmektedir [18].

7.1.4. Toplam Antioksidan Seviyesi

Çalışmamızda total antioksidan durumu ile araştırılan sinyal yolağı proteinleri arasında bir ilişki belirlenmemiştir. İnsan sperm hücresindeki TAS miktarı ile cAMP/PKA sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi inceleyen literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle bulgumuz ilktir. Ancak, keçi sperm hücresi ile yapılan bir çalışmada, artan merkürük klorür konsantrasyonu ile TAS miktarının azaldığını buna karşın cAMP seviyesinde bir artış olduğunu ve muhtemelen artan cAMP seviyesi ile PKA ekspresyonunun da artabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca yüksek konsantrasyondaki merkürük klorürün tirozin fosforilasyonunu inhibe ettiği ve bunun sonucunda sperm hücresi kapasitasyona uğramadan spontan bir akrozomal reaksiyonunu indükleyerek infertiliteye neden olabileceğini bildirmişlerdir [163]. Çalışmamızla bu çalışmanın bulgularının benzerlik göstermemesinin nedeni türler arasındaki farklılıktan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan otoimmün bir bozukluk olan Multiple skleroz ile ilgili yapılan bir çalışmada bir flavonoid olan Luteolin' in sıçanda oluşturulan multiple sklerozdaki terapötik rolüne bakıldığında, luteolin ile tedavi edilen grupta TAS seviyesiyle paralel olarak cAMP seviyesinin de arttığı bildirilmiştir [171]. Yine luteolinin sıçan adrenal feokromositoma hücre dizisi olan PC12 hücrelerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada luteolin tedavisi ile PKA ekspresyonunun arttığını, mikroRNA-132'nin (miR-132) cAMP / PKA- ve ERK-bağımlı CREB sinyal yollarının aktivasyonu ile nörit büyümesini modüle ettiğini göstermişlerdir [172]. Bizim sonuçlarımızla karşılaştırdığımızda, farklı sistemlerdeki oksidan ve antioksidan miktarlarındaki

farklılıkların veya oluşabilecek oksidatif stres hasarlarının cAMP/PKA sinyal yoluna etki mekanizmasının değişkenlik gösterebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda total antioksidan durumu ile kromatin yapısı (DNA fragmentasyonu ve kromatin bütünlüğü) ile ilişkisi bulunmamıştır. Literatürde, normal ve anormal sperm parametrelerine sahip 102 infertil hastadan oluşturulan iki grubun oksidatif stres, TAS ve DNA fragmentasyonu incelendiğinde, süperoksit anyonu ve antioksidan kapasiteli peroksinitrit arasında oluşan dengesizliğin sonucunda anormal sperm parametrelerine sahip hastalarda normal sperm parametrelerine sahip hastalara oranla düşük TAS seviyesi ve yüksek sperm DNA fragmentasyonunun oluştuğunu bildirmişlerdir [173]. Bu çalışmada normal sperm parametrelerine karşı anormal sperm parametrelerinin karşılaştırıldığını göz önüne alırsak bizim çalışmamızda normal sperm parametrelerine sahip infertil hastalarda DNA fragmentasyonu ile anlamlı bir ilişki görülmemesi beklenebilmektedir. Boğa spermine kriyoprezervasyon sonrası bir antioksidan olan selenyum nano - partiküllerinin (Se-NP) farklı dozlarda ilave edilmesinin etkilerinin araştırıldığı farklı bir çalışmada belirli bir doza kadar eklenen selenyum nano-partiküllerinin kriyoprezervasyon sonrası kromatin bütünlüğünü ve sperm progresif hareketliliğini önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir. Ancak en yüksek konsantrasyonda Se-NP eklenen grupta kontrole kıyasla daha zararlı bir etki de görülmüştür [174]. Ancak bu çalışmada kriyoprezervasyonun boğa spermi üzerinde oluşturabileceği oksidatif hasarın sonucu olarak kromatin yapısında meydana gelebilecek yapısal bozuklukların belirli konsantrasyondaki selenyum nano partikülleri ile onarılabildiğini de düşünmek gereklidir. Çalışmamızda kullandığımız normal sperm parametrelerine sahip infertil hastalardaki oksidatif hasar ile kriyoprezervasyon sonucu oluşabilecek hasarlar farklılık gösterebilmektedir.

Total antioksidan seviyesinin sperm parametreleri ile ilişkisi incelendiğinde analiz edilen sperm parametrelerinden (sperm sayısı, sperm hacmi, toplam motilite ve progresif sperm sayısı) sadece sperm motilitesi ile anlamlı seviyede ilişki belirlenmiştir. İdiyopatik oligoastenoteratozoospermi (OAT) olan infertil erkeklerde, sperm parametreleri ve seminal plazma antioksidan durumu üzerine 3 ay boyunca 200 mg / gün ve 400 mg / gün dozlarda oral CoQ10'un etkisinin araştırıldığı bir çalışmada

sperm motilitesi ve antioksidan ölçümler arasında pozitif ilişki bulunmuştur [175]. İnfertil ve fertil hasta gruplarından oluşturulan farklı bir çalışmada seminal plazmadaki SOD ve GPx aktiviteleri ile sperm konsantrasyonu, motilite ve normal morfoloji arasında anlamlı pozitif ilişki gösterilmiştir [176]. Bu bulgular çalışmamızın bulgularını destekler niteliktedir. Ancak çalışmalarda diğer parametreler ile ilişki belirlenmesine rağmen bizde belirlenmemiş olması bu çalışmalarda seçilen ve karşılaştırılan hasta grupları normozoospermi değil OAT grubunun çalışılmış olması ve infertil hasta grubunda farklı sperm parametrelerine sahip hastaların olabileceği düşünülmektedir. Başka bir çalışmada 2014-2016 yılları arasında 20-40 yaş arası erkeklerin rastgele örneklenmesi ile kontrol grup olarak kentsel ve vaka grubu olarak kırsal bölge erkeklerinin katıldığı ve oksidan özellikteki organofosfat bileşiklerine mesleki maruziyet sonucunda tarım işçilerinin üreme sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak organofosfat bileşiklerine maruz kalan kırsal kesimdeki hastaların seminal plazmasında total antioksidan seviyesinde bir azalma ve buna bağlı olarak sperm motilitesinde de azalma olduğunu göstermişlerdir [177]. Balb/c erkek farelerde Ghrelin'in, siklofosfamidinin neden olduğu hasarlara karşı etkisini değerlendirdiği bir çalışmada, siklofosfamidinin sperm parametrelerinde (sperm sayısı, motilite ve canlılık) meydana getirdiği hasarı ghrelin tedavisi ile ortadan kaldırılabileceğini göstermişlerdir. Ancak Ghrelin tedavisinin sperm morfolojisinde hiçbir etki göstermediğini de bildirmişlerdir [178]. IUI işlemi uygulanan subfertil (normozoospermi, teratozoospermi, oligoteratozoospermi) ve fertil erkek hastaların çalışmaya alındığı araştırmada, TAS seviyeleri ile semen parametreleri arasında pozitif ilişki görüldüğü bildirilmiştir [179]. Total oksidan seviyesi yüksek ve düşük olarak sınıflandırılan fertil erkek hastalar arasında yapılan başka bir çalışmada progresif sperm motilitesi, yüksek total oksidan seviyesi olan grupta düşük oksidan seviyeli gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur [180]. Sonuç olarak total oksidan seviyesi ile progresif sperm motilitesi arasındaki gösterilen negatif ilişki bizim sonuçlarımızı da desteklemektedir.

Total antioksidan seviyesinin ICSI parametrelerine etkisini incelediğimizde incelenen parametreler içinde tedavi başarısı için önemli bir gösterge olarak kabul edilen 'blastosiste gitme oranı' ile aralarında anlamlı ilişki bulunmuştur. Bu konuda

yapılan çalışmalardan birinde, 117 infertil kadının katıldığı bir çalışmada, ICSI sonrası düşük döllenme oranı ve düşük kaliteli blastosist oranı olan hastalardaki TAS seviyesinin de düşük olduğunu göstermişlerdir [181]. Başka bir çalışmada PKOS (polikistik over sendromu) hastalarının ICSI sonuçlarında (oosit sayısı ve kalitesi, embriyo sayısı ve kalitesi, gebelik oranı) E ve D vitamini tedavisinin etkileri araştırılmıştır. D vitamini düzeyi ile implantasyon oranı ve artan klinik gebelik arasında zayıf bir ilişki olduğu gösterilmiştir [74]. ICSI uygulanan 138 kadının katıldığı, folikül sıvısındaki ROT, TAS ve ICSI sonrası gebelik arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada da yüksek TAS oranı ve düşük ROT oranı ile gebelik arasında ilişki bulunmuştur [182].

7.2. Kromatin ve DNA Parametreleri

Çalışmamızda kromatin yapısı ve DNA fragmentasyonu parametreleri ayrı olarak değerlendirilmiş ve araştırılan parametreler ile ilişkisi araştırılmıştır.

Sperm kromatin bütünlüğü ve DNA fragmentasyonu ile sperm parametreleri ve ICSI parametreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar farklı sonuçlar bildirmektedir. Bunun nedeni, çalışılan hasta gruplarının farklılığı ve DNA fragmentasyonu ya da kromatin yapının değerlendirilmesi için kullanılan tekniklerin çokluğundan kaynaklanabilir [183].

Çalışmamızda, geliştirilmiş SCSA (sperm kromatin yapı analizi) tekniği ile analiz ettiğimiz sperm DNA fragmentasyonu ile sperm parametrelerinden olan konsantrasyon ve toplam motilite parametreleri ile arasında negatif ilişki belirlenmiştir. Çalışmamızı destekler nitelikte; 150 fertil erkekte yapılan bir çalışmada DFI (DNA Fragmentasyon İndeksi), sperm genel motilitesi ve tip A motilitesi ile anlamlı derecede negatif ilişki göstermiştir [184]. Ayrıca [185] ve [186] çalışmaları da sonuçlarımızı destekler şekilde motilite ile DFI arasında – ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, [187] ve [188] çalışmaları bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte düşük konsantrasyon ile yüksek DFI arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, yapılan bir çalışmada, sperm değerleri ile DFI arasında ilişki

belirlenmesine rağmen, farklı DFI grupları arasında IVF veya ICSI sikluslarında klinik gebelik, erken abortus, oosit fertilizasyonu veya kaliteli embriyo oranlarında anlamlı farklılık saptanmadığı gösterilmiştir [189]. Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, erkekte üreme potansiyelinin belirlenmesi için gittikçe yaygınlaşan bir teknik olan sperm DFI' nin erkek fertilité değerlendirmesinde çok değerli olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, tüp bebek sikluslarında etkisi ve öneminin tam olarak ortaya koyulması için daha fazla araştırmaya gereksinim duyulmaktadır.

Çalışmamızda DNA fragmentasyonu ile oksidatif stres belirteçlerinden biri olan MDA seviyesi arasındaki pozitif ilişki bulunmuştur. Çalışmamızın bulgularını destekler nitelikte, fertil ve infertil erkeklerden oluşan bir çalışmada sperm DNA fragmentasyonu ile seminal plazmadaki MDA seviyeleri arasında anlamlı pozitif ilişki olduğunu bildirmişlerdir [176]. DNA fragmentasyonu ve MDA seviyesinin, hücrelerde apoptotik sürecin sonuçları olduğu bilindiğinden, birbirleriyle ilişkili bulunması, beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda DNA fragmentasyonu ve araştırılan cAMP bağımlı PKA sinyal yolağı proteinleri arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir. Literatürde, bu konuda yapılmış başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bulgumuz, DNA fragmentasyonunu tetikleyen yollardan birinin PKA yolağı olamayacağını düşündürmektedir.

DNA fragmentasyonu ve kromatin bütünlüğünün, ICSI parametrelerine etkisini incelediğimizde kromatin bütünlüğü ile blastosiste gitme oranı ve gebelik oranı arasında pozitif ilişki belirledik. Çalışmamızın bulgularını destekler nitelikte, tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftler ve fertil çiftlerin karşılaştırıldığı bir meta analizde tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan kadınların erkek partnerlerinin, fertil kontrol kadınlarının partnerlerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek sperm DNA fragmentasyonu oranına sahip olduğu bildirilmiştir [190]. Sperm DNA fragmentasyonunun ICSI tedavi sonuçları üzerindeki etkisini inceleyen başka bir çalışmada, düşük (%15), orta (%15-30) ve yüksek (>%30) sperm DNA fragmentasyonuna sahip 3 grup karşılaştırılmış, düşük ve orta dereceli sperm DNA fragmentasyonuna sahip gruplarda ICSI sonuçlarında fark bulamamalarına rağmen,

yüksek sperm DNA fragmentasyonuna sahip grupta gebelik elde edilemediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, semen hacmi, sperm morfolojisi ve fertilizasyon oranı, DNA fragmentasyonu ile ilişkili bulunmamış, ancak sperm konsantrasyonu ve motilitesi tüm gruplarda negatif ilişkili bulunmuştur [191]. Ancak, sağlıklı normozoospermik gönüllü grubu ile ICSI ile tedavi edilen infertil çiftlerin katıldığı bir başka çalışmada sperm kromatin bütünlüğünün, embriyo gelişimi ve gebelik oluşumu ile karşılaştırılması sonucunda sperm kromatin bütünlüğünün ICSI sonuçlarıyla ilişkili olmadığını bildirmişlerdir [192].

7.3. Sinyal Yolağı Parametreleri

Hücre biyolojisinde, protein kinaz A (PKA) aktivitesi siklik AMP' nin (cAMP) hücresel seviyelerine bağlı olan bir enzim ailesidir. PKA, cAMP' a bağımlı protein kinaz (EC 2.7.11.11) olarak da bilinir. Protein kinaz A, glikojen, şeker ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi dahil olmak üzere hücrede çeşitli işlevlere sahiptir.

Spermde, cAMP bağımlı PKA yolağı ve bu yolağın oksidatif stres ile ilişkisi ve diğer olaylara etkileri ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda cAMP – PKA sinyal yolağı ile oksidatif stres arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasına rağmen oksidatif stresin bir yan ürünü olan MDA seviyesi arasında pozitif ilişki belirlenmiştir. Domuz sperminin kullanıldığı bir çalışmada, reaktif bir serbest radikal olan peroksinitritin cAMP bağımlı protein kinaz 1 (PKA) substratlarının fosforilasyonunu indüklediğini, sperm lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde arttırdığını ve sperm canlılığını azaltmadan sperm motilitesini ve progresif motiliteyi azaltmış olduğunu bildirmişlerdir [193]. Sıçan modelinde brusella enfeksiyonu döneminde lipid peroksidasyonu, NO üretimi, antioksidatif sistem ve inflamasyonu ve hücre içi siklik AMP' in Brusella kaynaklı olaylarda rolünün araştırıldığı bir çalışmada, cAMP / PKA yolunun aktivasyonunun MDA analizi ile ölçülmüş olan lipid peroksidasyonunu ve B. melitensis' in neden olduğu yüksek NO konsantrasyonlarını baskıladığını göstermektedir [194].

Çalışmamızda beklenen bir sonuç olarak, cAMP ile PKA proteini arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Bu nedenle yolak cAMP bağımlı PKA yolağı olarak da adlandırılmaktadır. Sperm hücrelerinde de, adenilat siklazın etkisiyle ATP tarafından üretilen bir nükleotit olan cAMP konsantrasyonu arttığında PKA ' yı aktive ettiği bildirilmiştir [195].

Ayrıca PKA ve PKA nın fosforillenmiş yani aktive olmuş hali olan p-PKA proteinlerinin semen parametreleri ile bir ilişkisi bulunmamış olmasına rağmen PKA ekspresyonu ile sperm progresif motilitesi arasında ilişki bulunmuştur. Bu sonucumuzu destekler nitelikte, bir PKA inhibitörünün (H-89), fare sperm hücresinin glikoz aracılı motilite parametreleri üzerindeki modülatör etkilerinin araştırıldığı çalışmada, H89' un sperm motilitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir [196]. Semen kalitesinin hem serum hem de seminal plazma D vitamini düzeyleri ile ilişkilerinin incelendiği bir çalışmada, seminal plazma D vitamini, hem cAMP / PKA yolu üzerinden hem de hücre içi kalsiyum iyonlarındaki artışla ATP sentezini teşvik ederek sperm hareketliliğini arttırabileceğini bildirmişlerdir [197].

cAMP/PKA proteinlerinin ICSI parametreleri ile bir ilişkisi bulunmamış olmasına rağmen p-PKA ekspresyonu ile fertilizasyon oranı arasında ilişki bulunmuştur. Spermde PKA yolağının ICSI parametrelerine etkilerini inceleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak oosit ile yapılan bir çalışmada, Fosfodiesteraz 3 (PDE3) inhibitörleri, cAMP seviyesini azaltarak oositlerdeki mayozu baskıladığı gösterilmiştir, PDE3 inhibitörü olan silostazol de in vitro ve in vivo dişi fare modelinde oosit olgunlaşmasını baskılamıştır, tedavi ortadan kaldırıldığında yapılan ICSI prosedürü sonrası morfoloji, dölleme oranı, embriyo bölünmesi, blastosist oluşumu ve canlı yavruların sayısı kontrollerle karşılaştırıldığında normal değerler göstermiştir [198]. Bu bulgu ile birlikte sonucumuz değerlendirildiğinde oositte cAMP' ın oosit gelişim potansiyelini, dolayısıyla da embriyo gelişimini etkilediği ancak aynı etkinin spermdeki cAMP ile meydana gelmediğini iddia edebiliriz. Bunun nedeni olarak da spermin sitoplazmik protein ve habercileri çok az miktarda içermesi nedeniyle aynı etkiyi oluşturamaması gösterilebilir.

Bulgularımız sonucunda, oksidatif stresin ölçütlerinden biri olan MDA'nın, cAMP bağımlı PKA yolağı ile ve kromatin yapısı ve DNA fragmentasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. PKA'nın progresif sperm motilitesi ile ve p-PKA'nın ICSI sonrası fertilizasyon oranı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, TAS düzeyi ile sperm motilitesi ve blastosist oranı arasında, TOS düzeyi ile de progresif motilite arasında ilişki bulunmuştur.

Semedeki oksidatif stres ile, sperm DNA'sı ve kromatin yapının bozulduğu, cAMP aracılı PKA yolağının aktive olduğu, bu yolağın da sperm motilitesi ve ICSI sonrası fertilizasyon oranlarını düşürdüğü ileri sürülebilir. Konu ile ilgili yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Sadeghi MR. The 40th anniversary of IVF: Has ART's success reached its peak. *J Reprod Infertil.* 19(2);67-8, 2018.
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi p.7-115. 5.baskı, Çeviren: Kadioğlu A, Türk Üroloji Derneği, 2011.
3. de los Ríos J, Cardona WD, Berdugo JA, Correa C, Arenas A, Olivera Angel M, et al. Sperm parameters in 113 subjects after recent fatherhood did not correlate with WHO standards. *Archivos Españoles de Urología.* 57:147-52, 2004.
4. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained male infertility: diagnosis and management. *International Brazilian Journal Of Urology.* 38:576-94, 2012.
5. Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, Peng J, Vazquez Levin, M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive Biomedicine Online.* 29:32-58, 2014.
6. Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani, et al. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reproductive Biomedicine Online.* 25:300-6, 2012.
7. Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and Sterility.* 102:1518-27, 2014.
8. Agarwal A, Roychoudhury S, Sharma R, Gupta S, Majzoub A, Sabanegh E. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reproductive Biomedicine Online* 34:48-57, 2017.
9. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ. Jr, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril.* 86:878–85, 2006.

10. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human Reproduction Update*. 14:243-58, 2008.
11. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 23:2:12, 2004.
12. Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet*. 32:509–520, 2015.
13. Thompson A, Agarwal A, Du Plessis SS. Physiological role of reactive oxygen species in sperm function: a review. p. 69–89 In: Parekattil SJ, Agarwal A, editors. *Antioxidants in male infertility: a guide for clinicians and researchers*. New York, USA: Springer Science and Business Media, 2013.
14. Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*. 8(2);3600–3627, 2017.
15. Setti AS, Figueira RC, de Almeida F, Braga DP, Azevedo MC, Iaconelli A, et al. Oocytes with smooth endoplasmic reticulum clusters originate blastocysts with impaired implantation potential. *Fertility and Sterility*. 106:1718-1724, 2016.
16. Ioannou D, Miller D, Griffin DK, Tempest HG. 2016. Impact of sperm DNA chromatin in the clinic. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 33:157-66, 2016.
17. Van den Hoven L, Hendriks JC, Verbeet JG, Westphal JR, Wetzels AM. Status of sperm morphology assessment: an evaluation of methodology and clinical value. *Fertility and Sterility*. 103:53-8, 2015.
18. Ghaleno LR, Valojerdi MR, Hassani F, Chehrazi M, Janzamin E. High level of intracellular sperm oxidative stress negatively influences embryo pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection treatment. *Andrologia*. 46:1118-27, 2014.
19. Thoma ME, McLain AC, Louis JF, King RB, Trumble AC, Sundaram R, et al. Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertil Steril*. 99(5);1324–31e1, 2013.

20. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril.* 99(4);998–1007, 2013.
21. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 13:37.doi: 10.1186/s12958-015-0032-1, 2015.
22. Buffone MG. Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization p.1-13, Springer, 2016.
23. Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol.* 17(2);87-98, 2019.
24. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril.* 110:810–4, 2018.
25. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR et al Guidelines on male infertility. European Association of Urology, The Netherlands, 2015.
26. Salzano A, d'Assante R, Heaney LM, Monaco F, Rengo G, Valente P, et al. Klinefelter syndrome, insulin resistance, metabolic syndrome, and diabetes: review of literature and clinical perspectives. *Endocrine.* 61:194–203, 2018.
27. Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14:20–6, 2005.
28. Swerdlow AJ, Schoemaker MJ, Higgins CD, Wright AF, Jacobs PA. Cancer incidence and mortality in men with Klinefelter syndrome: a cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 97:1204–10, 2005.
29. Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br J Nurs.* 25(18);35-40, 2016.
30. Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril.* 95:116–23, 2011.
31. Chen SJ, Allam JP, Duan YG, Haidl G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Archives of Gynecology and Obstetrics,* 288:191–199, 2013.

32. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 108(16);1912-6, 2003.
33. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension: Clinical Implications and Therapeutic Possibilities. *Review Diabetes Care*. (Suppl 2):S170-80, 2008.
34. Fisher HM, Aitken RJ. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool*. 277(5);390-400, 1997.
35. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 93(5);1464-76, 1999.
36. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*. 78(6);1215-24, 2002.
37. Aitken J, Krausz C, Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev*. 39(3);268-79, 1994.
38. Agarwal A, Tvrda E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 12:45, 2014.
39. Hipler UC, Görnig M, Hipler B, Römer W, Schreiber G. Stimulation and scavestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. *Arch Androl*. 44(2);147-54, 2000.
40. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2. *Nat Rev Urol*. 10:26-37, 2013.
41. Potts JM, Pasqualotto FF. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Andrologia*. 35:304-08, 2003.
42. Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *Journal of Andrology*. 22:316-322, 2001.
43. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl*. 13:43-52, 2011.

44. Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive Biomedicine Online*. 9:338–347, 2004.
45. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*. 16(1);31-8, 2014.
46. Mayorga-Torres M, Camargo M, Cadavid AP, du Plessis SS, Cardona Maya WD. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? *Andrologia*. 49(5);1-7, 2017.
47. Villegas J, Schulz M, Soto L, Iglesias T, Miska W, Sanchez R. Influence of reactive oxygen species produced by activated leukocytes at the level of apoptosis in mature human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 83(3);808-10, 2005.
48. Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int. J. Dev. Biol*. 57:265-72, 2013.
49. Aitken RJ, Ma B, Nixon B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl*. 17:633–39, 2015.
50. Shamsi MB, Kumar R, Bhatt A, Bamezai RNK, Kumar R, Gupta NP. Mitochondrial DNA Mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J Urol*. 24(2);150–4, 2008.
51. Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol*. 17(2);87-97, 2019.
52. Lawson G, Fletcher R. Delayed fatherhood. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 40(4);283-8, 2014.
53. Agarwal A, Sharma R, Gupta S, Harlev A, Ahmad G, du Plessis SS et al. Oxidative stress in human reproduction: shedding light on a complicated phenomenon. P. 65-87. New York City, NY, USA: Springer Publishing, 2017.
54. Weir CP, Robaire B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *J Androl*. 28:229-40, 2007.

55. Jervis KM, Robaire B. The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging Brown Norway rat epididymis. *Biol Reprod.* 71:1088-95, 2004.
56. Vessey W, Perez-Miranda A, Macfarquhar R, Agarwal A, Homa S. Reactive oxygen species in human semen: validation and qualification of a chemiluminescence assay. *Fertil Steril.* 102:1576–83, 2014.
57. Roychoudhury S, Sharma R, Sikka S, Agarwal A. Diagnostic application of total antioxidant capacity in seminal plasma to assess oxidative stress in male factor infertility. *J Assist Reprod Genet.* 33:627–35, 2006.
58. Pasqualotto F, Sundaram A, Sharma R, Borges E, Jr Pasqualotto E, Agarwal A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertil Steril.* 89:602–607, 2008.
59. Marnett, L. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 424: 83–95, 1999.
60. Ahmad G, Agarwal A, Esteves SC, Sharma R, Almasry M, Al-Gonaim A, et al. Ascorbic acid reduces redox potential in human spermatozoa subjected to heat-induced oxidative stress. *Androlog.* 49(19);e12773, 2017.
61. Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, Bergmann M, Weidner W, Haidl G. Chronic orchitis: A neglected cause of male infertility? *Andrologia.* 40(2);84-9, 2008.
62. Oborna I, Wojewodka G, De Sanctis JB, Fingerova H, Svobodova M, Brezinova J et al. Increased lipid peroxidation and abnormal fatty acid profiles in seminal and blood plasma of normozoospermic males from infertile couples. *Human Reproduction.* 25(2);308–16, 2010.
63. Mohanty NK, Kumar S, Jha AK, Arora RP. Management of idiopathic oligoasthenospermia with lycopene. *Indian Journal of Urology,* 18(1);57-61, 2001.
64. Gupta NP, Kumar R. Lycopene therapy in idiopathic male infertility—A preliminary report. *International Urology and Nephrology.* 34(3);369–72, 2002.
65. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril.* 89(5);1183-90, 2007.

66. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl.* 49(2);83–94, 2003.
67. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum. Reprod.* 25(10); 2415–26, 2010.
68. Aitken RJ, de Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online.* 14(6);727-33, 2007.
69. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* 30(3);219-29, 2009.
70. Barratt CL, Aitken RJ, Bjorndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U, et al. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications-a position report. *Hum Reprod.* 25(4): 824–38, 2010.
71. Li L, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 23(9-10);367-76, 2006.
72. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril.* 89(4);823–31, 2008.
73. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 23(12);2663–8, 2008.
74. Bedaiwy MA, Elnashar SA, Goldberg JM, Sharma R, Mascha EJ, Arrigain S, et al. Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Gynecol Endocrinol.* 28(1);51-5, 2012.
75. Bedaiwy MA, Mahfouz RZ, Goldberg JM, Sharma R, Falcone T, Abdel Hafez MF, et al. Relationship of reactive oxygen species levels in day 3 culture media to the outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 94(6);2037-42, 2010.
76. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. *Moleküler Biyoloji.* 2. Baskı. Nobel Akademik Yayıncılık, 2010.

77. Güneş HV. Moleküler Hücre Biyolojisi. 5. Baskı. İstanbul Tıp Kitabevleri, 2018.
78. Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Molecular Biology Of The Cell 4th ed., 2006.
79. Küçükkaya B, Afrasyap L. Mitojenle etkinleşen protein kinazların heterotrimerik G proteinleri ile düzenlenmesi. Türk Biyokimya Dergisi. 37(2);218–228, 2012.
80. Yan K, LN Gao, Cui YL, Zhang Y, Zhou X. The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). Mol Med Rep. 13(5);3715–23, 2016.
81. Cheng X, Ji Zhenyu, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 40(7);651–62, 2016.
82. Sutherland EW, Rall TW Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J Biol Chem. 232(1958);1077–1091,1958.
83. de Rooij J, Rehmann H, vanTriest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. J. Biol. Chem. 275:20829–36, 2000.
84. Beshay E, Croze F, Prud'homme GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo. Clin Immunol. 98;272-79, 2001.
85. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression and targeting in cells of the cardiovascular system. Mol Pharmacol. 64;533-46, 2003.
86. Chang SY, Kim DB, Ryu GR, Ko SH, Jeong IK, Ahn YB, et al. Exendin-4 inhibits iNOS expression at the protein level in LPS-stimulated Raw264.7 macrophage by the activation of cAMP/PKA pathway. J Cell Biochem. 114(4); 844-53, 2013.
87. Burdyga A, Conant A, Haynes L, Zhang J, Jalink K, Sutton R, et al. cAMP inhibits migration, ruffling and paxillin accumulation in focal adhesions of

- pancreatic ductal adenocarcinoma cells: Effects of PKA and EPAC. *Biochim Biophys Acta*. 1833(12);2664-72, 2013.
88. Brown KM, Lee LC, Findlay JE, Day JP, Baillie GS. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase, PDE8A1, is activated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Lett*. 586(11);1631-37, 2012.
89. Jang IS, Kang UG, Kim YS, Ahn YM, Park JB, Juhn YS. Isoform-specific changes of adenylate cyclase mRNA expression in rat brains following chronic electroconvulsive shock. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 25(8);1571-81, 2001.
90. Enyeart JA, Enyeart JJ. Metabolites of an Epac-selective cAMP analog induce cortisol synthesis by adrenocortical cells through a cAMP-independent pathway. *PLoS ONE*. 4(6):e6088, 2009.
91. Baillie GS. Compartmentalized signaling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J*. 276(7);1790-9, 2009.
92. Liu X, Guo H, Sayed MD, Lu Y, Yang T, Zhou D, et al. cAMP/PKA/CREB/GLT1 signaling involved in the antidepressant-like effects of phosphodiesterase 4D inhibitor (GEBR-7b) in rats. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 12: 219-27, 2016.
93. Ramakrishnan SK, Zhang H, Takahashi S, Centofanti B, Periyasamy S, Weisz K, et al. HIF2 α Is an Essential Molecular Brake for Postprandial Hepatic Glucagon Response Independent of Insulin Signaling. *Cell Metab*. 23(3);505-16, 2016.
94. Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 50:355-75, 2010.
95. Costanzo V, Robertson K, Ying CY, Kim E, Avvedimento E, Gottesman M, et al. Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Mol Cell*. 6:649-59, 2000.
96. Costanzo V, Avvedimento EV, Gottesman ME, Gautier J, Grieco D. Protein kinase A is required for chromosomal DNA replication. *Curr Biol*. 9:903-906, 1999.
97. Gerits N, Mikalsen T, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U. Modulation of F-actin rearrangement by the cyclic AMP/cAMP-dependent

- protein kinase (PKA) pathway is mediated by MAPK-activated protein kinase 5 and requires PKA-induced nuclear export of MK5. *J Biol Chem.* 282:37232-43, 2007.
98. Smith A, Ward MP, Garrett S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17:3556-64, 1998.
99. Jackson EK, Dubey RK. Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F597-F612, 2001.
100. Seino S, Shibasaki T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev.* 85:1303-42, 2005.
101. Richards JS. New Signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol.* 15:209-18, 2001.
102. Wong CH, Cheng CY. Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: a review of recent data. *Dev Biol.* 286:1-15, 2005.
103. Chen WY, Ni Y, Pan YM, Shi QX, Yuan YY, Chen AJ, et al. GABA, progesterone and zona pellucida activation of PLA2 and regulation by MEK-ERK1/2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *FEBS Lett.* 579:4692-700, 2005.
104. de Lamirande E, Gagnon C. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol Hum Reprod.* 8:124-35, 2002.
105. Sun QY, Breitbart H, Schatten H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod Fertil Dev.* 1:443-50, 1999.
106. Aparicio IM, Gil MC, Garcia-Herreros M, Pena FJ, Garcia-Marin LJ. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase modifies boar sperm motion parameters. *Reproduction.* 129(3):283-89, 2005.
107. Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochemical Journal.* 436(3):687-98, 2011.

108. Pujianto DA, Curry BJ, Aitken RJ. Prolactin exerts a prosurvival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of AKT phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation. *Endocrinology*. 151(3);1269–79, 2010.
109. Hers Vincent EE, Tavare JM. AKT signalling in health and disease. *Cellular Signalling*. 23:1515–27, 2011.
110. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A family of CAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 282(5397);2275–79, 1998.
111. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 396(6710);474–77, 1998.
112. Ludwig J, Margalit T, Eismann E, Lancet D, Kaupp UB. Primary structure of CAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett*. 270(1-2);24–29, 1990.
113. Dessauer CW, Scully TT, Gilman AG. Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem*. 272(35);22272–77, 1997.
114. Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 96(1);79–84, 1999.
115. Geng W, Wang Z, Zhang J, Reed BY, Pak CY, Moe OW. Cloning and characterization of the human soluble adenylyl cyclase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 288(6);C1305–16, 2005.
116. Jaiswal BS, Conti M. Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem*. 276(34);31698–708, 2001.
117. Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J. Biol. Chem*. 278(18);15922–26, 2003.
118. Braun T, Dods RF. Development of a Mn²⁺-sensitive, “soluble” adenylate cyclase in rat testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 72(3);1097–101, 1975.

119. Battistone MA, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, et al. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol. Hum. Reprod.* 19(9);570–580, 2013.
120. Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krahlting M, et al. Strunker, The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J.* 31(7);1654–65, 2012.
121. Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, et al. The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev. Cell.* 9:249–259, 2005.
122. Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, et al. Soluble adenylyl cyclase (SAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev. Biol.* 296:353–62, 2006.
123. Buffone MG, Wertheimer EV, Visconti PE, Krapf D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochimica et Biophysica Acta.* 11:2610-20, 2014.
124. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* 168:697-98, 1951.
125. Austin C. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B.* 4:581-96, 1951
126. Austin C. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature.* 170:326-332, 1952.
127. Imai H, Niwa K, Iritani A. Penetration in vitro of zonafree hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 5:495-97, 1977.
128. Luconi M, Porazzi I, Ferruzzi P, Marchiani S, Forti G, Baldi E. Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate. *Biol. Reprod.* 72:22–32, 2005.
129. Lefievre L, Jha KN, de Lamirande E, Visconti PE, Gagnon C. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *J Androl.* 23:709–16, 2002.
130. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and

- capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 121(4);1139–50, 1995.
131. Tardif S, Lefievre L, Gagnon C, Bailey JL. Implication of cAMP during porcine sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation. *Mol. Reprod. Dev.* 69(4);428–35, 2004.
132. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl.* 19:434–43, 1998.
133. Aitken R, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine D. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J. Cell Sci.* 111:645–56, 1998.
134. Branham MT, Mayorga LS, Tomes CN. Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 281(13);8656–66, 2006.
135. Noguchi T, Fujinoki M, Kitazawa M, Inaba N. Regulation of hyperactivation of hamster spermatozoa by progesterone. *Reprod Med Biol.* 7:63-74, 2008.
136. Fujinoki M. Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction.* 142:255-66, 2011.
137. Ho HC, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol.* 250(1);208-17, 2002.
138. Fujinoki M, Suzuki T, Takayama T, Shibahara H, Ohtake H. Profiling of proteins phosphorylated or dephosphorylated during hyperactivation on hamster spermatozoa. *Reprod Med Biol.* 5:123-135, 2006.
139. Ren D, Xia J. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology.* 25:165-75, 2010.
140. Jensen LJ, Schmitt BM, Berger UV, Nsumu NN, Boron WF, Hediger MA, et al. Localization of sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein and messenger ribonucleic acid in rat epididymis. *Biol. Reprod.* 60:573–79, 1999.
141. Flesch FM, Wijnand E, Van de Lest CHA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation

- generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary affinity for the zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 60:107-115, 2001.
142. Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell Sci.* 114:3543–55, 2001.
 143. Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, et al. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod.* 61:76–84, 1999.
 144. Visconti PE, Ning XW, Forné's MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, et al. Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm: Cholesterol Release Signals an Increase in Protein Tyrosine Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation. *Developmental Biology.* 214:429–43, 1999.
 145. Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.* 127:2407–20, 2000.
 146. Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* 171(2);554–63, 1995.
 147. Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, et al. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation, *J. Biol. Chem.* 278:7001–09, 2003.
 148. Wang D, King SM, Quill TA, Doolittle LK, Garbers DL. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat. Cell Biol.* 5:1117–22, 2003.
 149. Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill TA, McLeroy P, Moe OW, et al. A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (SNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (SAC), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:9325–30, 2007.
 150. Jin SH, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget.* 8(2), 2016.

151. Griveau JF, Le L. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl.* 20:61–69, 1997.
152. Agarwal A, Virk G, Ong C, et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 32:1–17, 2014.
153. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 79:829–43, 2003.
154. Donà G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Brunati A, Ragazzi E, et al. Evaluation of correct endogenous reactive oxygen species content for human sperm capacitation and involvement of the NADPH oxidase system. *Hum Reprod.* 26(12);3264–73, 2011.
155. Ledwozyw A, Michalak D, Stepien A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 155:275-83, 1986.
156. Pujol A, Obradors A, Esteo E, Costilla B, García D, Vernaev V, et al. Oxidative stress level in fresh ejaculate is not related to semen parameters or to pregnancy rates in cycles with donor oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 33(4);529-34, 2016.
157. Agarwal A, Wang SM. Clinical relevance of oxidation-reduction potential in the evaluation of male infertility. *Urology.* 104:84-89, 2017.
158. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev.* 7:659–68, 1995.
159. Opuwari CS, Henkel RR. An Update on Oxidative Damage to Spermatozoa and Oocytes. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2016/9540142, 2016.
160. Baker MA, Krutskikh A, Aitken RJ. Biochemical entities involved in reactive oxygen species generation by human spermatozoa. *Protoplasma.* 221:145–51, 2003.
161. Ajina T, Sallem A, Haouas Z, Mehdi M. Total antioxidant status and lipid peroxidation with and without in vitro zinc supplementation in infertile men. *Andrologia.* 49(7);doi: 10.1111/and.12703, 2017.
162. Subramanian V, Ravichandran A, Thiagarajan N, Govindarajan M, Dhandayuthapani S, Suresh S. Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility. *Clin Exp Reprod Med.* 45(2);88-93, 2018.

163. Kushawaha B, Yadav RS, Swain DK, Rai PK, Garg SK. Mercury-Induced Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Sperm Proteins and Altered Functional Dynamics of Buck Spermatozoa: an In Vitro Study. Springer, 2020.
164. Yan D, Zhao LL, Yue BW, Qian H, Zhang ZH, Wang N, et al. Granule of BU-XIN RUAN-MAI Attenuates the Patients' Angina Pectoris of Coronary Heart Disease via Regulating miR-542-3p/GABARAP Signaling. Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2019/1808419>.
165. Lenzi A, Lombardo F, Gandini L, Alfano P, Dondero F. Computer assisted sperm motility analysis at the moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest.* 16(9);683-6, 1993.
166. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol.* 152(1);107-10, 1994.
167. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med.* 26(7-8);869-80, 1999.
168. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev.* 47(4);468-82, 1997.
169. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 103(1);17-26, 1995.
170. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl.* 13(5);379-86, 1992.
171. El-Deeb OS, Ghanem HB, El-Esawy RO, Sadek MT. The modulatory effects of luteolin on cyclic AMP/Ciliary neurotrophic factor signaling pathway in experimentally induced autoimmune encephalomyelitis. *IUBMB Life.* 71(9);1401-8, 2019.

- 172.Lin LF, Chiu AP, Wu MJ, Chen PY, Yen JH. Luteolin Induces microRNA-132 Expression and Modulates Neurite Outgrowth in PC12 Cells. *PLoS One*. 7(8): e43304, 2012.
- 173.Khosravi F, Valojerdi MR, Amanlou M, Karimian L, Abolhassani F. Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm DNA fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters. *Andrologia*. 46(1);17-23, 2014.
- 174.Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*. 126:121-27, 2018.
- 175.Alahmar AT. The impact of two doses of coenzyme Q10 on semen parameters and antioxidant status in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Clin Exp Reprod Med*. 46(3);112–18, 2019.
- 176.Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 49(10); doi: 10.1111/and.12762, 2017.
- 177.Ghafouri-Khosrowshahi A, Ranjbar A, Mousavi L, Nili-Ahmadabadi H, Ghaffari F, Zeinvand-Lorestani H. Chronic exposure to organophosphate pesticides as an important challenge in promoting reproductive health: A comparative study. *J Educ Health Promot*. 8:149, 2019.
- 178.Salimnejad R, Rad JS, Nejad DM, Roshangar L. Effect of ghrelin on total antioxidant capacity, lipid peroxidation, sperm parameters and fertility in mice against oxidative damage caused by cyclophosphamide. *Andrologia*. 50(2);doi: 10.1111/and.12883, 2018.
- 179.Dobrakowski M, Kasperczyk S, Horak S, Chyra-Jach D, Birkner E, Kasperczyk A. Oxidative stress and motility impairment in the semen of fertile males. *Andrologia*, 49(10);doi: 10.1111/and.12783, 2017.
- 180.Nishihara T, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in follicular fluid for human in vitro fertilization outcome. *Reprod Med Biol*. 17(4);481-86, 2018.
- 181.Fatemi F, Mohammadzadeh A, Sadeghi MR, Akhondi MM, Mohammadmoradi S, Kamali K. Role of vitamin E and D 3 supplementation in Intra-Cytoplasmic

- Sperm Injection outcomes of women with polycystic ovarian syndrome: A double blinded randomized placebo-controlled trial. *Randomized Controlled Trial Clin Nutr ESPEN*. 18:23-30, 2017.
- 182.Zhang Z, Zhu L, Jiang H, Chen H, Chen Y, Dai Y. Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 32(1);17-26, 2015.
- 183.Antonouli S, Papatheodorou A, Panagiotidis Y, Petousis S, Prapas N. The impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome in cases of donated oocytes. *Arch Gynecol Obstet*. 300(1);207-15, 2019.
- 184.Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Chahine H, Amar E, et al. Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet*. 31:527–32, 2014.
- 185.Rafighdoost H, Farsi MM, Javadi M, Khafri S. Relationship between sperm parameters and DNA fragmentation using a halosperm kit. *Anat Sci J*. 10:79–86, 2013.
- 186.Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken R. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 21(1);33-44, 2000.
- 187.Sheikh N, Amiri I, Farimani M, Najafi R, Hadeie J. Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Int J Reprod Biomed*. 6:13–18, 2008.
- 188.Yang H, Li G, Jin H, Guo Y, Sun Y. The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Transl Androl Urol*. 8(4);356–65, 2019.
- 189.McQueen DB, Zhang J, Robins JC. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta analysis. *Fertil Steril*. 112(1);54-60, 2019.
- 190.Basmah Al Omrani B, Al Eisa N, Javed M, Al Ghedan M, Al Matrafi H, Al Sufyan H. Associations of sperm DNA fragmentation with lifestyle factors and semen parameters of Saudi men and its impact on ICSI outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 16(1);49, 2018.

191. Gill K, Rosiak A, Gaczarzewicz D, Jakubik J, Kurzawa R, Kazienko A. The effect of human sperm chromatin maturity on ICSI outcomes. *Hum Cell.* 31(3);220-31, 2018.
192. Serrano R, Garrido N, Céspedes JA, González-Fernández L, García-Marín LJ, Bragado MJ. Molecular Mechanisms Involved in the Impairment of Boar Sperm Motility by Peroxynitrite-Induced Nitrosative Stress. *Int J Mol Sci.* 21(4);1208, 2020.
193. Erdogan S, Celik S, Aslantas O, Kontas T, Ocak S. Elevated cAMP levels reverse *Brucella melitensis*-induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats. *Res Vet Sci.* 82(2);181-6, 2006.
194. Dimitriadis F, Giannakis D, Pardalidis N, Zikopoulos K, Paraskevaïdis E, Giotitsas N, et al. Effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian J Androl.* 10(1);115-33, 2008.
195. Aitken RJ, Baker MA, Nixon B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl.* 17(4);633-9, 2015.
196. Chen YC, Pan LC, Lai CW, Chien YS, Wu TH. Silymarin and protein kinase A inhibitor modulate glucose-mediated mouse sperm motility: An in vitro study. *Rep. Bio.* 15(3);172-77, 2015.
197. Jueraitetibaïke K, Ding Z, Wang DD, Peng LP, Jing J, Chen L, et al. The effect of vitamin D on sperm motility and the underlying mechanism. *Asian J Androl.* 21(4);400-407, 2019.
198. Li M, Yu Y, Yan J, Yan L, Zhao Y, Li R, et al. The Role of Cilostazol, a Phosphodiesterase 3 Inhibitor, on Oocyte Maturation and Subsequent Pregnancy in Mice. *PLoS One.* 7(1): e30649, 2012.

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.14956
Konu : Etik Kurulu Kararı

06/05/2019

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seda KARABULUT

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Erkek infertilitesinde oksidatif stresin cAMP aracılı PKA yolağı proteinlerine ve ICSI parametrelerine etkisinin araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 06.05.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 53C35F8CX2 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr






İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Erkek infertilitesinde oksidatif stresin cAMP aracılı PKA yolağı proteinlerine ve ICSI parametrelerine etkisinin araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Seda KARABULUT			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		29/04/2019		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 355	Tarih: 03/05/2019		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İlkur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	CEREN	Soyadı	ERDEM ALTUN
Doğum Yeri	KADIKÖY	Doğum Tarihi	17.09.1991
Uyruğu	T.C. - SIRBİSTAN	TC Kimlik No	
E-mail	cerenmuric@gmail.com	Tel	05323766526

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ	2013
Lise	PENDİK FATİH ANADOLU LİSESİ	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. BİYOLOG	ÇAMLICA MEDICANA HASTANESİ, TÜP BEBEK MERKEZİ	2020 -
2. BİYOLOJİ ÖĞRETMENİ	ÖZEL MALTEPE DORA A.S.M.L.	2016-2017
3. BİYOLOJİ ÖĞRETMENİ	ÖZEL GEBZE DEVA A.S.M.L.	2015-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İNGİLİZCE	İYİ	ORTA	İYİ
BOŞNAKÇA	ZAYIF	İYİ	ORTA

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu							
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE

0000

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	67,97	70,44	72,03
YÖKDİL Puanı	56.25		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office programları	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirilir

