ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DÜŞÜK YA DA ATMOSFERİK OKSİJEN SEVİYESİNDE İNKÜBASYONUN SEMEN ÖRNEKLERİNDEKİ OKSİDATİF STRES YANITLARINA ETKİSİ

Ezgi GÜNEŞ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ ANABİLİM DALI

ANKARA
2015

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

28.12.2015

Ezgi GÜNEŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DÜŞÜK YA DA ATMOSFERİK OKSİJEN SEVİYESİNDE İNKÜBASYONUN SEMEN ÖRNEKLERİNDEKİ OKSİDATİF STRES YANITLARINA ETKİSİ

Ezgi GÜNEŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Eş Danışman: Doç. Dr. Sinan ÖZKAVUKCU

Farklı oksijen seviyelerinde bekletilen semen örneklerinin Glutatyon peroksidaz (GPx), Süperoksit dismutaz (SOD) ve Katalaz enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon düzeylerini belirlemek için malondialdehit (MDA) ölçümleri yapılmıştır. Farklı oksijen seviyelerinde bekletilen örneklerin enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Farklı oksijen seviyelerinde inkübasyonun seminal oksidatif stres sonuçlarına bir etkisi olmadığını gösterdi. Grupların kendi aralarındaki farklılığını değerlendiriğimizde ise; GPx enzim aktivitesinde normozoospermik, oligozoospermik ve azoospermik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. SOD enzim aktivitesinde normozoospermik, oligozoospermik ve azoospermik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Katalaz enzimi aktivitesi, %20 oksijen seviyesinde bekletilen semen örneklerinde,normozoospermik grupta oligozoospermik gruba göre daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Lipid peroksidasyon sonuçları, normozoospermik, oligozoospermik ve azoospermik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Seminal MDA seviyesi oligozoospermik ve azoospermik gruplarda normozoopsermik gruba göre daha yüksek bulundu. Sperm sayısı ve MDA seviyesi arasında negatif ilişki olduğunu belirledik.

Aralık 2015, 62 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glutatyon peroksidaz, Katalaz, Oksidatif stres, Semen, Süperoksit dismutaz, TBARS

ABSRACT

Master Thesis

OXİDATIVE STRESS RESPONSES OF SEMEN SAMPLES INCUBATED IN LOW OR ATMOSPHERIC OXYGEN CONCENTRATIONS

Ezgi GÜNEŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
CO-Supervisor: Doç. Dr. Sinan ÖZKAVUKCU

Incubation at different oxygen levels of semen samples for Glutathione peroxidose (GPx), Superoxide dismutase (SOD) and Catalase enzyme activity and lipid peroxidation by taken measurements to determine the level of malondialdehyde (MDA). In the results of lipid peroxidation and enzyme activities of samples at different oxygen held there was not found a statistically significiant difference. It was observed that seminal oxidative stress had no effect on a results of incubation at different oxygen levels. When we consider the differences between the group; GPx enzyme activity,the groups normozoospermic, oligozoospermic and the groups azoospermic there is no statically significiant differences. There is no statically significiant differences SOD enzyme activity of normozospermic, oligozoospermic and azoospermic groups. Catalase enzyme activity were found compared to the group oligozoospermic and normozoospermic groups were statically significiant. Lipid peroxidation results showed that there was a statically significiant difference between groups normazoospermic oligazoospermic and azoospermic. Seminal MDA levels in groups of azoospermic and in groups oligozoospermic were found higher than normozoospermic groups. It was observed that there is negative relationship between the level of MDA and sperm count.

December 2015, 62 pages

Key Words: Catalase, Glutathione peroxidase, Oxidative stress, Semen, Superoxide dismutase, TBARS

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince yardımlarından ve bilimsel katkılarından dolayı öncelikle danışman hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), Eş Danışmanım Doç. Dr. Sinan ÖZKAVUKCU'ya (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı) ve bu süreçte gösterdikleri anlayış ve sabır için aileme teşekkür ederim.

Ezgi GÜNEŞ

Ankara, Aralık 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK……..i
ÖZET……...….ii
ABSRACT……...iii
TEŞEKKÜR……iv
SİMGELER DİZİNİ……..…..viii
ŞEKİLLER DİZİNİ……...……..x
ÇİZELGELER DİZİNİ……..... xi
1. GİRİŞ...…….…1
2. GENEL BİLGİLER……2
2.1 İnfertilite ve İnfertilite Tedavilerinin Tarihçesi…….2
2.1.1 İnfertilitenin değerlendirilmesi…….....3
2.1.2 Erkekte infertilite nedenleri……...…4
2.2 Erkek Üreme Sistemi……..…5
2.2.1 Testisler……...….5
2.2.1.1 Sertoli hücreleri……...6
2.2.1.2 Spermatogenik hücreler…….....7
2.2.1.3 Leydig hücreleri……...7
2.2.2 Epididimis……...….8
2.2.3 Ductus deferens (vas deferens)……..…8
2.2.4 Ejakülatör kanal ……...….8
2.2.5 Prostat…….....9
2.2.6 Bulboüretral bezler…….....9
2.2.7 Penis ……..…..9
2.2.8 Semen……10
2.3 Spermatogenez……..…...11
2.3.1 Spermatogonial faz……...11
2.3.2 Spermatosit fazı (Mayoz)……...…..13
2.3.3 Spermatid fazı (Spermiyogenez) ……...….14
2.3.4 Spermin yapısı……...16
2.4 Semen Analizi (Spermiyogram)……...…..18

2.4.1 Semen örneğinin alınması ……...18
2.4.2 Semen örneğinin değerlendirilmesi…….....18
2.4.2.1 Semen örneğinin makroskobik incelemesi ……19
2.4.2.2 Semen örneğinin mikroskobik incelemesi……...19
2.5 Serbest Radikaller……..…….21
2.5.1 Serbest radikallerin kaynakları……..22
2.5.2 Serbest radikallerin etkileri……23
2.5.2.1 Membran lipidlerine etkileri ……...23
2.5.2.2 Proteinlere etkileri ……25
2.5.2.3 Nükleik asitlere etkileri……25
2.5.2.4 Karbohidratlara etkileri……...25
2.6 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)…….....26
2.6.1 Süperoksit anyonu……26
2.6.2 Hidrojen radikali……..27
2.6.3 Hidroksi radikali …….….28
2.6.4 Singlet oksijeni……..28
2.7 Reaktif Oksijen Türleri ve Sperm Fizyolojisi……..….29
2.7.1 Semende ROT'nin üretiminde lökospermi'nin rolü…….31
2.8 Oksidatif Stres……...…...32
2.8.1 Oksidatif stres ve apoptozis……..…33
2.9 Antioksidan Savunma Sistemleri……..….34
2.9.1 Süperoksit dismutaz (SOD)…….35
2.9.2 Katalaz……...36
2.9.3 Glutatyon Peroksidaz (GPx)……..…..36
3. MATERYAL VE YÖNTEM……38
3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar……...38
3.2 Örneklerin Temin Edilmesi ve Gruplandırılması……..…..38
3.3 Semen Örneklerinde Protein Tayini……..…39
3.4 Semen Örneklerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Tayini……..…...40
3.5 Semen Örneklerinde Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Tayini…….....41
3.6 Semen Örneklerinde Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini……..…42

3.7 Semen Örneklerinde Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşiklerin (TBARS) Oluşumu Üzerine Olan Etkileri……..…..42
4. BULGULAR……...44
4.1 Yüzde 5 ve yüzde 20'lik Oksijen Seviyeleri İçin Genel Sonuçlar……...….44
4.2 Semen Örneklerinin Protein Tayini……...…45
4.2.1 BSA kalibrasyon eğrisi…….……45
4.2.2 Semen örneklerinin toplam protein miktarları…….46
4.3 Semen Örneklerinin Lipid Peroksidasyon Üzerinde Olan Etkileri……46
4.3.1 MDA kalibrasyon eğrisi……...46
4.3.2 Semen örneklerinin lipid peroksidasyon ölçümleri……...47
4.4 Semen Örneklerinin Katalaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri…….....48
4.4.1 H_2O_2 kalibrasyon eğrisi ……...…48
4.4.2 Semen örneklerinin katalaz ölçümleri……49
4.5 Semen Örneklerinin Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Üzerinde Olan Etkileri…….50
4.6 Semen Örneklerinin Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzimi Üzerinde Olan Etkileri……...52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……..54
KAYNAKLAR……...58
ÖZGEÇMİŞ……...…62

SİMGELER DİZİNİ

4-AP	4-Aminoantipirin
BSA	Bovine Serum Albumin
CO_2	Karbondioksit
CuOOH	Kumil Hidroperoksit
$CuSO_4$	Bakır Sülfat
DHBS	Sodyum 3,5 dikloro-2- hidroksi benzen
DNA	Deoksiribonükleik Asit
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GR	Glutatyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutatyon
GST	Glutatyon-S-Transferaz
GSSG	Okside Glutatyon
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HRP	Horseradish Peroksidaz
IVF	In vitro Fertilizasyon
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mtDNA	Mitokondryial Deoksiribonükleik Asit
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
Na-K tartarat	Sodyum-Potasyum tartarat

NaN_3	Sodyum Azid
NBT	Nitroblue Tetrazolium
nmol	Nanomol
NO^o	Nitrik Oksit
NO_2^{o-}	Nitrojen Dioksit
O_2^{o-}	Süperoksit Anyonu
$^1O_2$	Singlet Oksijeni
OD	Optik Dansite
$^{\cdot}OH$	Hidroksil
$ONOO^-$	Peroksinitrik
OS	Oksidatif Stres
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids (Doymamış Yağ Asitleri)
R^-	Lipid Radikali
RNA	Ribonükleik Asit
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
RONOO	Alkil Peroksinitrat
ROO^-	Lipid Peroksil Radikali
ROOH	Lipid Hidroperoksit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAC	Total Antioksidan Kapasitesi
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TCA	Trikoloroasetik Asit
ÜYT	Üremeye Yardımcı Teknikler
XOD	Ksantin Oksidaz
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Leeuwenhoek'un spermatozoa ile ilgili çizimleri……..2
Şekil 2.2 İnsan testis kesiti……6
Şekil 2.3 Erkek üreme sisteminin bileşenleri……..…10
Şekil 2.4 Spermatogenik hücrelerin üretimi……....12
Şekil 2.5 Seminifer epitelyum……...…..13
Şekil 2.6 Mikrotübül yapısı…….....15
Şekil 2.7 Spermiyogenez…….16
Şekil 2.8 Spermin yapısı…….…18
Şekil 2.9 Sperm defektleri……...21
Şekil 2.10 Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu…….24
Şekil 2.11 Spermatozoonda lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma sistemleri……31
Şekil 2.12 Oksidatif stres…….....33
Şekil 2.13 Reaktif oksijen türleri, antioksidanlar ve oksidatif stres……...….35
Şekil 2.14 Antioksidan savunma sistemleri……...…..37
Şekil 4.1 BSA kalibrasyon eğrisi……...…..45
Şekil 4.2 MDA kalibrasyon eğrisi……...……47
Şekil 4.3 Sperm örneklerinin lipid peroksidasyon sonuçları……...48
Şekil 4.4 H_2O_2 kalibrasyon eğrisi……..……..49
Şekil 4.5 Sperm örneklerinin katalaz miktarları…….....50
Şekil 4.6 Sperm örneklerinin SOD miktarları…….52
Şekil 4.7 Sperm örneklerinin GPx miktarları……..53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Erkekte infertilite nedenleri……..……4
Çizelge 2.2 Sperm morfolojisi……..20
Çizelge 4.1 Yüzde 5 ve yüzde 20'lik oksijen seviyeleri için genel sonuçlar……44
Çizelge 4.2 Sperm örneklerinin toplam protein miktarları……46
Çizelge 4.3 Sperm örneklerinin lipid peroksidasyon sonuçları…….49
Çizelge 4.4 Sperm örneklerinin katalaz miktarları……....48
Çizelge 4.5 Sperm örneklerinin SOD miktarları……..…….51
Çizelge 4.6 Sperm örneklerinin GPx miktarları……53

1. GİRİŞ

Yapılan çalışmalar, spermatozoanın reaktif oksijen türleri (ROT) meydana getirdiğini göstermiştir (Aitken ve Clarkson 1987, Alvarez vd. 1987). İnfertil bireylerde yapılan çalışmalar reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artış ile in vitro fertilizasyondaki başarı arasında negatif korelasyonun olduğunu göstermiştir (Sukcharoen vd. 1995). Çalışmalar, üremeye yardımcı teknikler (ÜYT) için sperm hazırlanırken kullanılan yöntemlerde yüksek miktarda reaktif oksijen türleri (ROT) açığa çıktığını göstermiştir (Agarwal vd. 1994).

Üremeye yardımcı tedaviler sırasında, erkekten alınan semen örneği çeşitli işlemlerden geçirilerek içeriğindeki spermatozoonlar oosite enjeksiyon için hazır hale getirilir. Bu işlemler kabaca sperm değerlendirme, seçme ve yıkama yöntemleridir ve öncesinde likefaksiyon denilen bir bekleme süresini içerir. Prostattan salgılanan amilaz ve proteolitik enzimler semenin likefiye olmasını yani çözünürlük kazanmasını sağlar. Bu süre 15 ile 60 dakika arasında değişir ve genellikle atmosferik oksijen şartlarında yapılır. Alınan semen örneğinin işlemler öncesinde düşük oksijen seviyesi sağlayan 'oksijen kontrollü inkübatörlerde' likefiye edilmesi, oksijen varlığına bağlı ortaya çıkan hasarları ortadan kaldırabilir ve infertilite tedavilerinde iyileşmeye neden olabilir.

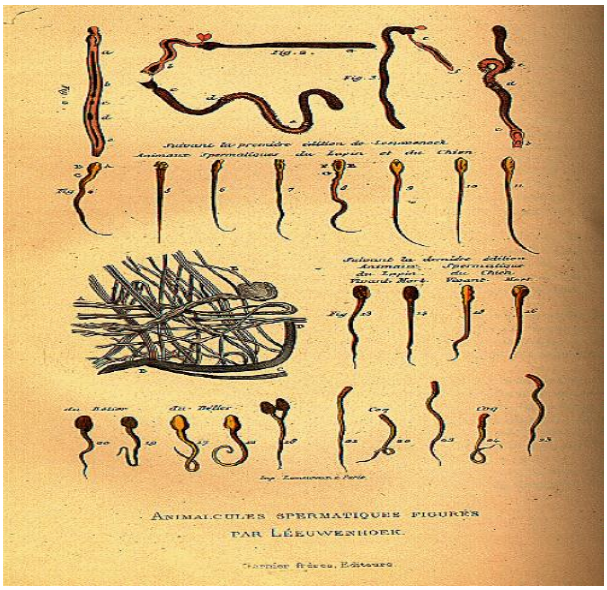
Çalışmamızın amacı, semen örneklerini atmosferik oksijen seviyesi ve düşük oksijen seviyesinde bekleterek antioksidan enzim analizlerini yapmak ve ortaya çıkan sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İnfertilite ve İnfertilite Tedavilerinin Tarihçesi

1677 yılında Antony Van Leeuwenhoek semende yaptığı incelemelerde kuyrukları olan küçük hayvanlar gördü. Leeuwenhoek, bu gözlemlerini London Royal Society'ye yazdığı mektupta bildirdi. Spermin insan vücudunda geliştiğine inanmaktaydı ve semenin içindeki spermin fosfat kristallerini ilk kez tanımladı (Ruestow 1982).

Leeuwenhoek, spermatozoanın insanın minyatür yapısını içerdiğini düşünmüştür. Bu fikir ilk oluşum teorisi (preformation theory) olarak bilinmektedir. Bu teoriye göre; spermatozoonun oosite girmesinden sonra minyatür insanın gelişimi gerçekleşecektir (Bras vd. 1996). 1775'te Spallanzani oosit ve spermatozoanın yeni bir insan gelişimi için gerekli olduğunu ispatlamıştır.



Şekil 2.1 Leeuwenhoek'un spermatozoa ile ilgili çizimleri
(http://knarf.english.upenn.edu/Gifs/buffons1.html)

İnsanoğlu, türünün devamı için üremenin önemini tarihinin ilk dönemlerinden itibaren benimseyerek kısırlığa çareler aramaya devam etmiş ve uzunca bir süre kendilerinden

daha güçlü gördükleri yaratıklara, yatırlara, kısacası kutsal saydıkları nesnelere dileklerde bulunmuş, adaklar adamıştır (Delilbaşı 2008).

Kısırlık (infertilite) her geçen gün daha fazla çifti etkileyen bir sorun olarak gündemde kalmaya devam ederken bir yandan da dünya nüfusu hızla artmaya devam etmekte. Kısırlığın sadece kadından kaynaklanmadığı, erkekte de kısırlık sorunu olabileceği gerçeği ise; modern tıpta infertilite tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanılmasıyla mümkün olmuştur (Delilbaşı 2008).

Spermin tanımlanıp semen analiz tekniklerinin kullanıma girmesi özellikle infertilite araştırmaları konusunda önemli bir çığır açmıştır. In vitro fertilizasyon tekniklerinin geliştirilmesine öncülük eden, IVF'in duayeni Robert Edwards, çalışmalarını yönlendiren, kendine esin kaynağı olan kişinin Pincus olduğunu belirtmektedir. Pincus ve arkadaşları, kültür ortamında tavşan oositlerinin 12 saat sonra germinal vezikülün dağılımı ve mayotik kromozomların şekillenmesiyle olgunlaşmalarını tamamladıklarını göstermişlerdir. Araştırmacılar, insan oositlerinin de in vitro olarak olgunlaşmalarının 12 saatte tamamladığını belirtmişlerdir (Delilbaşı 2008, Pincus 1930).

Dünyadaki ilk IVF gebeliği 1973 yılında Avustralya Monash Üniversitesi Hastanesi'nde Wood ve ekibi tarafından bildirilmiş, ancak bu gebelik düşükle sonuçlanmıştır. IVF gebeliği ile 1978 yılında İngiltere Royal Oldham Hastane'sinde Dünyaya gelen ilk bebek Louise Joy Brown olmuştur. Türkiye'de ilk tüp bebek merkezi ise 1988 yılında Ege Üniversitesi'nde açılmıştır (Delilbaşı 2008).

2.1.1 İnfertilitenin değerlendirilmesi

İnfertilite, bir yıl süre ile herhangi bir kontrasepsiyon yöntemi kullanmadan ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik oluşmaması olarak tanımlanmaktadır (Monga 2004). Dünya'da infertilite oranı %13-18 arasında, Türkiye'de ise bu oran evli çiftlerde %10-20 arasındadır (www.sağlıkplatformu.com).

Pek çok çevresel, fiziksel ve genetik faktör semen kalitesinde düşüklüğe ve infertiliteye sebep olabilir. Semendeki peroksidatif ve oksidatif maddeler arasındaki dengesizliğin, erkek üreme hücrelerinde yapısal ve metabolik bozukluklara sebep olduğu ve infertilitenin başlıca sebeplerinden olduğu belirlenmiştir.

Son yıllarda, reaktif oksijen türlerinin sperm kalitesi ve yapısı üzerinde yüksek seviyede toksik etkilerinin olduğunun tespit edilmesi ile erkek üreme sisteminde reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ile ilgilenilmeye başlanmıştır. İnsan sperminin aerobik metabolizması farklı reaktif oksijen türleri üretir. İnfertil erkeklerin %40'ında seminal ROT seviyesinde artış olduğu belirtilmiştir (Shiva 2011, Sharma 2012).

2.1.2 Erkekte infertilite nedenleri

Çizelge 2.1 Erkekte infertilite nedenleri (www.andrologyaustralia.org/your-health/male-infertility/)

Sperm üretim sorunları	Kromozomal ya da genetik nedenler İnmemiş testis Testis torsiyonu Enfeksiyon Varikosel İlaçlar ve kimyasallar Alkol Radyasyon Kabakulak
Sperm taşınmasında tıkanıklık	Enfeksiyon Prostat problemleri Vas deferens yokluğu Vazektomi
Ereksiyon ve ejakülasyon sorunları	Prematür ejakülasyon Retrograd ejakülasyon (mesaneye ters ejakülasyon) Ejakülasyonu gerçekleştirememe Erektil disfonksiyon Omurilik hasarları Seyrek cinsel ilişki Prostat cerrahisi Bazı ilaçlar
Hormonal bozukluklar	Hipofiz tümörleri Doğuştan LH/FSH eksikliği Androjenik steroidlerin yanlış kullanımı
Sperm antikorları	Vazektomi Epididimiste enfeksiyon ya da hasar Açıklanamayan nedenler

2.2 Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi;

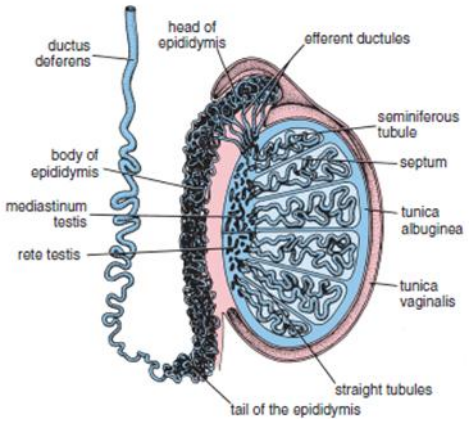
1. Sperm üreten ve androjenleri salgılayan testisler,
2. Dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanal sistemini oluşturan epididimis, duktus deferens, ejakülatuar kanal,
3. Seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretral bezlerden oluşan aksesuar bezler ve
4. Penisten oluşur (Kierszenbaum 2002).

2.2.1 Testisler

Testisler, vücut dışında lokalize olmuş, skrotum içinde bulunan bir çift organdır. Skrotum; testisleri ve epididimisi içinde bulunduran torba şeklinde yapıdır (Pawlina ve Ross 2011). Skrotum içindeki sıcaklık normal vücut sıcaklığının 2-3°C altındadır. Bu, spermatogenez için gerekli olan sıcaklıktır. Bu sıcaklık hormon üretimi yani steroidogenez için gerekli değildir. Steroidogenez, normal vücut sıcaklığında gerçekleşebilir. Testisler ise daha yüksek sıcaklıkta kalırsa (örneğin, yüksek ateş) sperm üretilemez (Pawlina ve Ross 2011).

Testisin posterior yüzü epididimis ile ilişkilidir. Her bir testis, beyaz renkte olan ve 'tunica albuginea' denilen fibröz bir kılıfla sarılmıştır. Bu kılıftan bezin içine doğru giren ince uzantılar (septula testis) testisi 250-300 lobçuğa böler. Her bir lobta 3-4 tane 'tubuli seminiferi contorti' denilen kanalcık bulunur (Kierszenbaum 2002).

Kanalcıklar arası gevşek bağ doku ile doldurulmuştur. Seminifer tübüller arasındaki boşluk kan damarları, lenfatik kanallar, makrofajlar ve androjen üreten Leydig hücre grupları ile doldurulmuştur. Seminifer tübül, 2 belirgin hücre popülasyonunu içerir; somatik Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler.



Şekil 2.2 İnsan testis kesiti (Pawlina ve Ross 2011)

Testisin iki temel işlevi vardır; spermatogenez (erkek gameti olan spermin üretimi) ve steroidogenez (cinsiyet hormonu denilen androjenlerin sentezi).

2.2.1.1 Sertoli hücreleri

Uzun, silindirik, replikasyon yapmayan epitel hücreleridir. Seminifer epitelyumun bazal laminası üzerinde dinlenme halinde bulunur.

Sertoli hücreleri, puberteye kadar seminifer epitelyumun dominant hücre tipidir. Puberteden sonra seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. İleriki yaşlarda, erkekte spermatogenik hücre sayısı düştüğü zaman, Sertoli hücreleri tekrar ana eleman haline gelir (Pawlina ve Ross 2011).

Bir ilâ iki adet belirgin çekirdekçik içerir. Çekirdeklerin sahip oldukları karakteristik çekirdekçikler bu hücrelerin spermatogenik hücrelerden ayırt edilmesinde oldukça önemli bir kriterdir.

Sertoli hücreleri destekleyici hücreler olarak da bilinir. Görevleri;

1. Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek,

2. Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan, rezidual cisimcikler olarak adlandırılan hücre kısımlarını fagositoz ile elimine etmek,
3. Birbirleriyle yaptıkları sıkı bağlantılarla spermatogenetik hücreleri içlerinde muhafaza ederek kandaki savunma hücrelerinin otoimmünitesinden korumak (Kan Testis Bariyeri). Bu bariyer kandan gelen tüm maddelerin hücreler arasına geçerek seminifer tübül lümenine geçişini engellediğinden sadece seçilmiş moleküller intratübüler sıvıya erişebilir (Delilbaşı 2008),
4. Olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak (spermiyasyon),
5. Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlar bakımından zengin sıvı salgılamak. Androjen bağlayıcı proteinler (ABP), Sertoli hücrelerinin salgıladığı önemli bir maddedir. ABP Sertoli hücreleri içinde androjenleri bağlayarak, lümen içine ve buradan da epididime taşır. Ayrıca spermiumların hareketini engelleyen inhibin salgılar (Setchell 1994).

2.2.1.2 Spermatogenik hücreler

Seminifer tübülü döşeyen çok katlı epiteli oluştururlar. Seminifer epitelde birçok hücre jenerasyonunu aynı anda görmek olasıdır. Farklılaşmaya başlamış spermatogoniumlardan oluşan en genç hücreler tübülün periferinde bulunurken, spermatidlerin oluşturduğu en yaşlı jenerasyon lümende yer alır (Delilbaşı 2008).

2.2.1.3 Leydig hücreleri

Leydig hücre toplulukları testisin interstisiyel hücreleridir ve embriyonik gelişimin 8. haftasında interstisiyel mezenşimden farklılaşmaya başlarlar. Farklılaşmayı izleyen dönemde Leydig hücre popülasyonu steroid salgılayan hücrelerin özelliklerini kazanırlar (Delilbaşı 2008).

2.2.2 Epididimis

Her iki testisin arka kenarı ve üst kutbuna tutunan, kanallardan oluşan bir organdır. Kanalların duvarları epitel hücreleri ile döşelidir. Epididimis virgül biçiminde bir yapılanma gösterir.

En önemli görevi, testiste üretilen spermleri depo etmek ve ductus deferense geçirmektir. Epididimis içindeki spermler, tüyler tarafından ileri götürülürken diğer taraftan salgıların etkisiyle olgunlaşır. Olgunlaşan spermler, epididimisin kuyruk kısmına gelir. Spermler epididimis salgılarının asit reaksiyonu ve oksijen yetersizliği nedeniyle hareketsiz halde durur. Bir ejakülasyon durumunda, epididimis kuyruğundaki kaslar kasılarak depolanan spermler ileri doğru itilir ve ductus deferense geçirilir (Setchell 1994, Kierszenbaum 2002, Pawlina ve Ross 2011).

2.2.3 Ductus deferens (vas deferens)

Epididimisin kuyruğundan başlayıp idrar kesesi arka alt yüzünden seminal veziküllerle birleşen boruya ductus deferens denir. Sağ ve solda olmak üzere iki tanedir. Görevi, epididimiste depo edilen spemleri üretraya doğru taşımaktır (Setchell 1994, Kierszenbaum 2002, Pawlina ve Ross 2011).

2.2.4 Vesicula seminalis

Pelvis içinde, mesane ile rektum arasında sperm kanallarının dış yanında ve prostat tabanının hemen üstünde bulunur. Görevi, spermlerin dışarıya atımını kolaylaştıran, canlılığını koruyan ve hareketliliğini arttıran sıvıyı salgılamaktır (Setchell 1994, Kierszenbaum 2002, Pawlina ve Ross 2011).

2.2.4 Prostat

Erkek üreme sistemindeki en büyük aksesuar bezdir. Pelvis tabanının üstünde, mesanenin altında ve rektumun önünde bulunan tek bir bezdir. Prostat salgısı spermlerin beslenmesi için gerekli olan maddeleri içerir. Prostat, proteince zengin alkali bir sıvı salgılar. Bu salgı vajinadaki pH'ı nötralize ederek spermlerin hareketliliğini kolaylaştırır ve canlılığını korur (Setchell 1994, Kierszenbaum 2002, Pawlina ve Ross 2011).

2.2.6 Bulboüretral bezler

Bulboüretral bezler ürogenital diyafram'da lokalize olmuş bezelye büyüklüğünde bir çift bezdir. Seminal sıvı salgılar. Salgı; berrak, yapışkan ve muközdür. Galaktoz, galaktozamin, galaktronik asit, sialik asit ve metilpentoz bakımından zengindir (Setchell 1994, Kierszenbaum 2002, Pawlina ve Ross 2011).

2.2.7 Penis

İdrar ve spermanın dışa atıldığı organdır. Dıştan içe doğru; cutis penis (deri), tunica dartos (kas doku), tunica albugenia (sert zar), sertleşebilen iki corpus cavernosum (kavernöz) ve şişebilen corpus spongiosum (spongioz) cisimden oluşur.

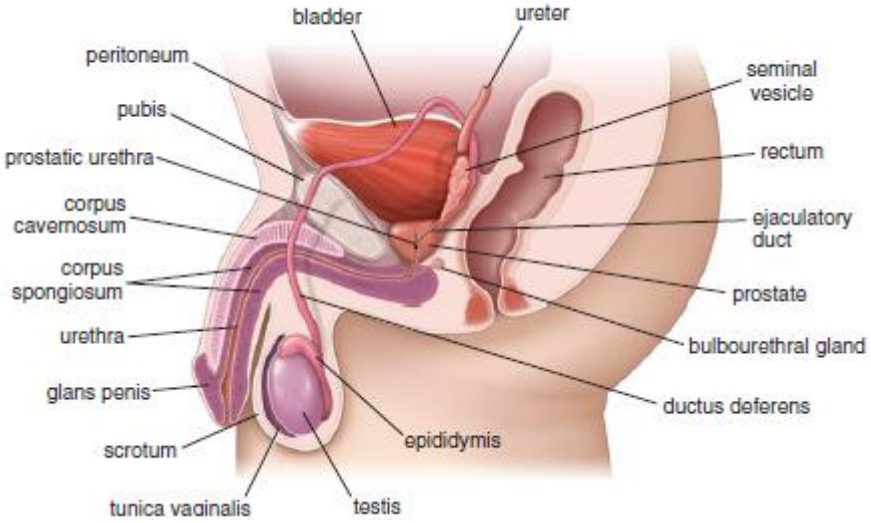
Penisin sertleşmesine ereksiyon denir. Çiftleşme için gerekli olan ereksiyon, vücudun belli yerlerindeki duyu sinirlerinin uyarılması sonucu bir refleks olarak gerçekleşir. Bu refleksi parasempatik sinirler sağlar. Uyarılma sonucu, arteryal kan kavernöz cisim boşluklarına dolar. Buna karşılık venöz kan boşalımı engeller. Bu sırada penis gövdesindeki düz kaslar gevşer ve sonuçta kavernöz cisimler içinde kan birikmesi olur. Biriken kan penisi büyütür. Büyüme, tunica albugineanın gerilmesine neden olur. Sertleşme ile birlikte spongioz cisme de kan dolar ancak spongioz cisim etrafında sert zar bulunmadığından burada sertleşme olmaz. Spongioz cismin sertleşmemesi üretra kanalının açık tutulmasını sağlar. Açık tutulan kanaldan spermlerin dışarı atımı gerçekleşir

Spermlerin penisten dışarı atılmasına ejakülasyon denir. Ejakülasyon sempatik sinir sistemi tarafından kontrol edilir (Setchell 1994, Kierszenbaum 2002, Pawlina ve Ross 2011).

2.2.8 Semen

Testisten gelen sıvıları ve spermatozoonları, epididimis, ductus deferens, prostat, seminal keseler ve bulboüretral bezlerden gelen salgı ürünlerini içerir. Normal semen hacminin %10'unu spermatozoa, %90'ını seminal plazma oluşturur. Alkalidir (pH 7.2-8). Vajina ve üretranın asidik ortamının nötralize edilmesini sağlar (Bras vd. 1996).

Semen, spermatozoanın konsantre süspansiyonundan oluşturulur, iki epididimde depolanır, aksesuar cinsel organlardan gelen sıvı salgılarla karışır ve seyreltilir. Semen hacminin yaklaşık % 90'ının aksesuar bezlerden (Weiske, 1994), esas olarak prostat ve seminal keselerden, önemsiz miktarlarda da bulboüretral bezler (Cowper bezi) ve epididimislerden gelen salgılardan oluştuğunu göstermektedir (WHO).



Şekil 2.3 Erkek üreme sisteminin bileşenleri (Pawlina ve Ross 2011)

2.3 Spermatogenez

Spermatogenez, sperm üretilmesi sürecidir. Bu süreç ergenlikten hemen önce başlar, hipofiz gonadotropinlerin yükselen seviyelerinin etkisi altında yaşam boyu devam eder (Kierszenbaum 2002).

Spermatogenez 3 ayrı aşamada gerçekleşir;

1. Spermatogonial faz: Spermatogoniumun mitoz bölünmelerle kendilerini yenilemenin yanı sıra, sonuçta primer spermatosite farklılaştığı fazdır.
2. Spermatosit fazı (mayoz): Primer spermatositlerin 2 mayoz bölünmeyle, spermatid denilen haploid kromozomlu hücreleri oluşturduğu süreçtir.
3. Spermatid faz (spermiogenezis): Spermatidlerin olgun sperm hücrelerine farklılaştığı fazdır.

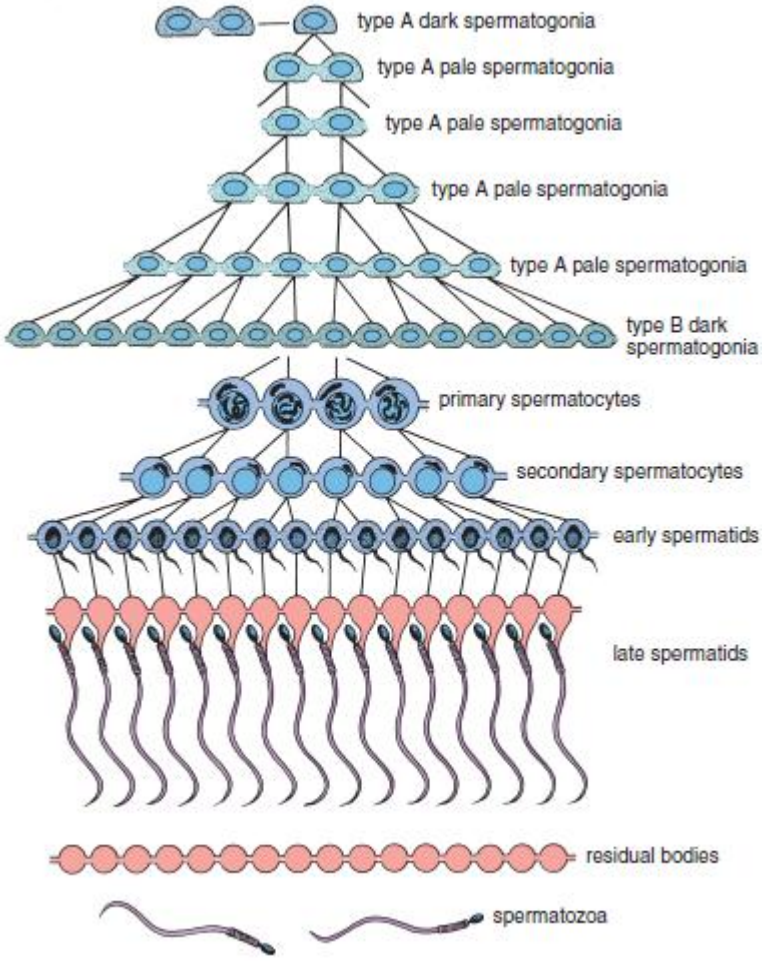
2.3.1 Spermatogonial faz

Spermatogoniumun mitoz bölünmeler sonucu primer spermatositleri oluşturduğu fazdır. Spermatogoniumlar, bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid (2n) spermatogenik hücrelerdir. İnsanda 3 tip spermatogonium tarif edilmiştir;

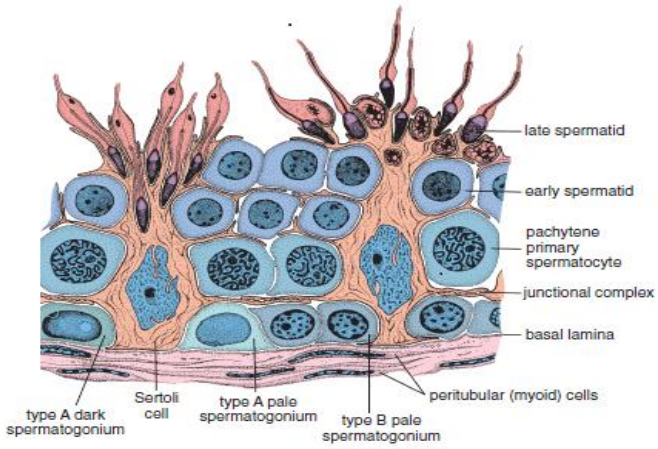
- Tip A koyu spermatogoniumlar (Ak): Yoğun bazofilik ovoid çekirdekleri vardır. Kök hücresi olarak görev yaparlar. Seminifer tübüllerdeki kök hücre rezervini oluştururlar ve mitozla bölünerek diğer tip A koyu spermatogoniumları oluşturma yeteneğindedir. Bu hücreler düzensiz aralıklarla bölünerek kök hücre olarak kalabilecekleri gibi, tip A koyu spermatogoniumları ya da tip A açık (Aa) spermatogoniumları oluşturabilirler (Gartner ve Hiatt 1997, Pawlina ve Ross 2011).
- Tip A açık spermatogoniumlar (Aa): Açık boyanan ovoid çekirdekleri vardır. Granüllü endoplazmik retikulum (GER), mitokondri ve çok az miktarda Golgi aygıtı içerir. Aa spermatogoniumlar, proliferasyon aşamasında testesteronla

uyarılır. Ardışık mitoz bölünmeler geçirerek sayılarını arttırarak tip A ve tip B spermatogoniumları oluştururlar (Gartner ve Hiatt 1997, Pawlina ve Ross 2011).

- Tip B spermatogoniumlar: En çok bulunan spermatogonium tipidir. Nüklear membran boyunca koyu boyanmış kromatin yığınları içeren küresel çekirdekleri vardır. Sitoplazmasında A tiplerine göre daha fazla ribozom bulunur. Oval yerine yuvarlak olan nükleusları dışında tip A açık spermatogoniumlara benzerler. Tip B spermatogoniumların mitoz bölünmesiyle primer spermatositler oluşur. B tipi spermatogonia görünümü spermatogonial aşamasındaki son olayı temsil eder (Gartner ve Hiatt 1997, Pawlina ve Ross 2011).



Şekil 2.4 Spermatogenik hücrelerin üretimi (Pawlina ve Ross 2011)



Şekil 2.5 Seminifer epitelyum (Pawlina ve Ross 2011)

2.3.2 Spermatosit fazı (Mayoz)

Tip B spermatogoniumların mitotik bölünmesiyle primer spermatositler oluşur. Bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye girer. Mitozdan hemen sonra DNA sentezindeki S fazını tamamlar ve mayoz bölünmenin profaz aşamasına geçer. Birinci mayoz bölünme yaklaşık 22 gün süren uzun bir profaz evresi ile karakterizedir. Uzun olan bu profaz evresinden sonra kardeş kromatid çiftleri metafaz I, anafaz I, telofaz I evreleri geçirir ve sekonder spermatositlere dağılır (Kierszenbaum 2002).

Profaz evresinin; leptoten (ipliksi), zigoten (eşleşen), pakiten (kalınlaşan), diploten (çift görünen), diyakinez (uzaklaşan) olmak üzere 5 alt evresi vardır. Bu evreler 4 temel olayla karakterizedir.

- Zigoten-pakiten evresinde homolog kromozomların eşleşmesini ya da sinapsını kolaylaştıran sinaptonemal kompleks oluşması
- Homolog kromozomların eşleşmesi
- Krossing-over
- Eşleşmiş homolog kromozomların ayrılması.

Sekonder spermatositler hızlı bir interfaz aşaması ve ikinci mayoz bölünmeyi geçirirler. İkinci mayoz ile kardeş kromatidler spermatidlere dağılırlar. Birinci mayoz bölünme günlerce süren bir süreç olmasına rağmen ikinci mayoz bölünme dakikalar sürdüğünden seminifer tübüllerde primer spermatositler en çok gözlenen hücrelerdir (Kierszenbaum 2002).

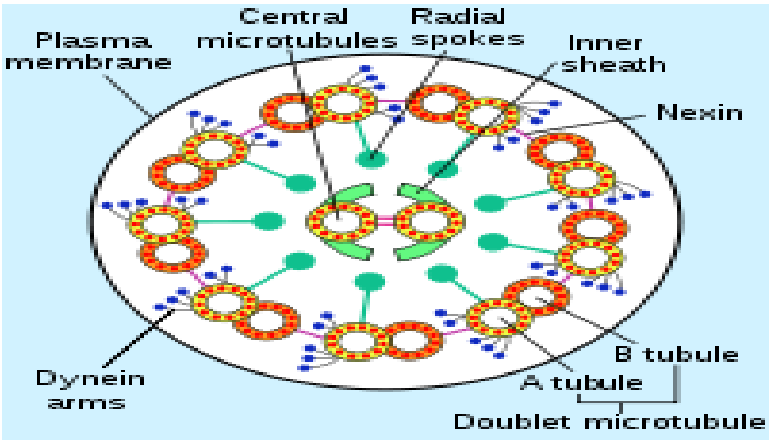
Birinci mayoz bölünmenin sonunda, primer spermatositin 4C DNA miktarı sekonder spermatositte 2C'ye düşer. İkinci mayozun sonunda ise 2C DNA miktarı 1C'ye düşer. Sonuçta oluşan spermatidler haploittir.

2.3.3 Spermatid fazı (Spermiyogenez)

Spermatidler, Sertoli hücreleri sitoplazması içinde gömülü olarak, seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmana yerleşmişlerdir.

Spermatidler haploid yapıdadır ve spermiyogenez denilen karmaşık bir farklılaşma süreci geçirirler. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır ve 3 fazda gerçekleşir.

1. Flagellumun gelişmesi: Flagellum, distal sentriyolden gelişir. Bir fibröz kılıf ile çevrili aksoneme sahiptir (eşmerkezli dizilimli 9+2 mikrotübül çiftleri). Mitokondriler kuyruğun orta parçasında sarmal benzeri bir kılıf oluşturur, spermatid olgunlaşma evresi sırasında gelişip, flagellum boyunca dizilimlerini tamamlarlar (Gartner ve Hiatt 1997).



Şekil 2.6 Mikrotübül yapısı (https://en.wikipedia.org/wiki/Axoneme)

2. Akrozom gelişmesi: Zona pellucida'nın eritilmesi ve oosite penetrasyon için gerekli olan hidrolitik enzimlerin depolanması ve sürekli sentezlendiği akrozomal kesenin oluşumudur. Akrozomun gelişmesi ardışık dört evreden oluşur; Golgi evresi, şapka evresi, akrozomal evre, olgunlaşma evresi.

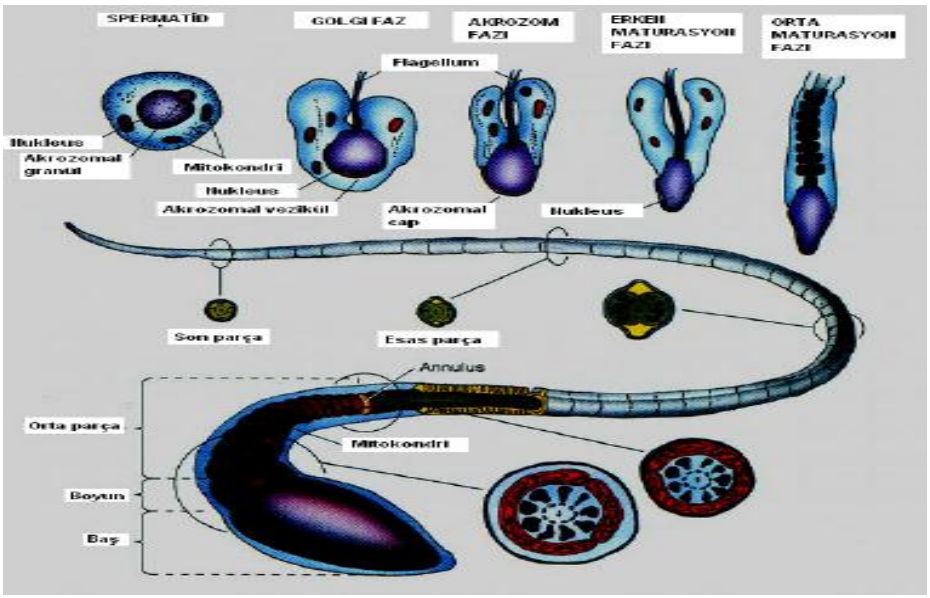
- Golgi evresi: Spermatidlerin sitoplazmasında nükleusun yanında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve endoplazmik retikulum bulunur.

- Başlık (cap) evresi: Akrozom vezikülü ve granülünden akrozom başlığı oluşur ve çekirdeğin tüm ön kısmını kaplar. Akrozom başlığı, akrozom içeriğini saracak şekilde iç ve dış akrozom zarlarını oluşturur (Gartner ve Hiatt 1997).

- Akrozomal evre: Spermatid çekirdeği ön kısmı, seminifer tübüllerin bazalına doğru döner. Spermatid sitoplazması, seminifer tübül epitelinin luminal bölgesine doğru yer değiştirir. Çekirdeğin akrozom bölgesi plazma zarına yakınlaşır, çekirdek progresif olarak yassılaşır ve uzar. Golgi kompleksi, akrozom büyümesini tamamlandığında çekirdeğin ön kutbundan sitoplazmanın bol olduğu bölgeye göç eder (Gartner ve Hiatt 1997).

- Olgunlaşma evresi: Bu evrede spermatid sitoplazması atılır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Daha sonra Sertoli hücreleri geç spermatidlerin tübül lümenine doğru serbest hale gelmesini sağlar (Gartner ve Hiatt 1997).

3. Nüklear yoğunlaşma: Somatik histonlar (H, H2A, H2B, H4) arjinin ve lizin bakımından zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nüklear yoğunlaşma (kromatin paketlenmesi) oluşur. Bu da spermatozoon DNA'sını stabilize eder ve korur. Histonların protaminlere dönüşümünden sonra nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yanyana dizilirler (Kierszenbaum 2002).



Şekil 2.7 Spermiyogenez (https://quizlet.com)

2.3.4 Spermin yapısı

Olgun bir insan spermi baş ve kuyruk olmak üzere iki parçadan oluşur ve yaklaşık 60 µm uzunluğundadır. Baş ile kuyruk bir bağlantı parçası ile bağlanır. Bağlantı parçası bir çift senriyol içerir.

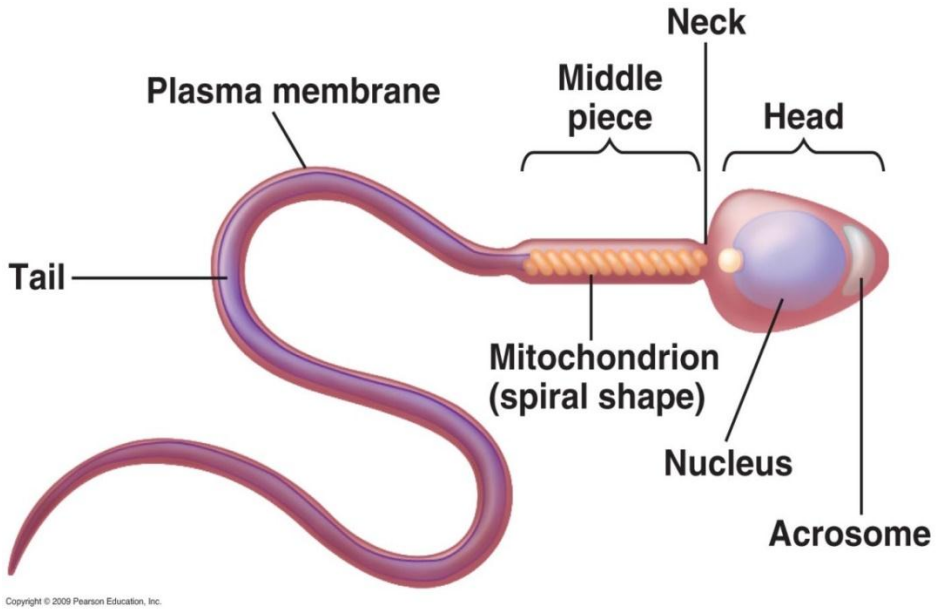
Baş: Akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek, hiyolüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi hidrolitik enzimler içerir. Bu akrozomal enzimler, spermin zona pellucidaya penetrasyonu için gereklidir. Bu enzimlerin salınımı akrozom reaksiyonunun ilk adımıdır. Bu süreç sperm penetrasyonunu ve fertilizasyonu kolaylaştırır ve oosite başka bir sperm girişini engeller (Pawlina ve Ross 2011).

Spermatozoon DNA'sı arginin ve sisteinden zengin oldukça bazik proteinler olan protaminlerle bir kompleks halinde bulunur. Sistein miktarı nedeniyle disülfit çapraz bağları fazladır. Bu, çekirdeğe sağlamlık ve dayanıklılık kazandırır. Çekirdek haploid sayıda kromozom içerir ve oosite girmeden ve protaminler ayrılmadan DNA aktive olmaz (Gartner ve Hiatt 1997, Pawlina ve Ross 2011).

Kuyruk: Orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 kısımdan oluşur.

Orta parça yaklaşık 7 μm uzunluğunda olup türe özgün sayıda mitokondriyonun arka arkaya dizildiği mitokondri kılıfını içerir. Mitokondri, kuyruğun hareketi için enerji sağlar, sperm motilitesinden sorumludur.

Esas parça en uzun kısımdır. Merkezi bir aksonem ve fibröz kılıftan oluşur. Fibröz kılıfın distal ucundan sonra son parça başlar. Kuyruğun ucuna doğru gelindikçe aksonemin mikrotübül yapısı sona erer (Gartner ve Hiatt 1997, Pawlina ve Ross 2011).



2.8 Spermin yapısı (http://www.biology.lifeeasy.org/)

2.4 Semen Analizi (Spermiyogram)

2.4.1 Semen örneğinin alınması

Örnekler 2-7 günlük cinsel perhizden sonra alınmalıdır. Hastalara steril şartlarda, steril plastik kutular verilerek bu amaçla düzelenmiş sperm verme odalarını kullanmaları sağlanır. Kullanılan steril kapların üzerine isimleri yazılır. Hastalar, mastürbasyon yoluyla örnek vermeleri gerektiği konusunda bilgilendirilir. Alınan örnekler embriyoloji laboratuvarına iletilir (DSÖ).

2.4.2 Semen örneğinin değerlendirilmesi

Semen örneğinin değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen kriterler esas alınır. Semen analizi makroskobik ve mikroskobik incelemeden oluşur.

2.4.2.1 Semenin makroskobik incelemesi

- **Likefaksiyon (Semenin çözünürlüğü)**

Semen örneği etüve alınarak 37 °C'de likefiye olana kadar bekletilir. Prostattan salgılanan amilaz ve proteolitik enzimler 10-30 dakika içerisinde semenin likefiye olmasını yani çözünürlük kazanmasını sağlar (DSÖ, Rrumbullaku 2010).

- **Görünüm**

Normalde semen sarı-gri renkte, parlak ve homojendir (DSÖ, Rrumbullaku 2010).

- **Volüm**

DSÖ kriterlerine göre semen hacmi 2 ml veya daha fazla olmalıdır. 1 ml'den daha az olması durumu hipospermik olarak isimlendirilir. Miktarı 6 ml'den fazla olan semen içeriği hiperspermik olarak adlandırılır (DSÖ, Rrumbullaku 2010).

- **pH**

Normal pH değeri 7.2-8 arasındadır. Akut enfeksiyonlarda pH değeri 8.0'in üzerine çıkabilir. pH'nin düşük olması sperm salınımının yetersizliği ve bu nedenle ejakülatın daha çok asidik prostat sıvısından oluştuğunu gösterebilir (WHO, Rrumbullaku 2010).

2.4.2.2 Semenin mikroskobik incelemesi

- **Konsantrasyon**

Sperm sayımı için en çok kullanılan cihaz Makler sperm sayım kamarasıdır. Sperm örneğinin incelendiği kameranın 10 μm derinliğinde olması spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketine olanak sağlamaktadır. Bir damla semen kamaranın

merkezine damlatılıp üzerine kapak camı kapatılır. Bir hat üzerinde yapılacak sayım 20x büyütme altında 10 karede motil ve non-motil sperm sayılarak yapılır ve 10^6 ile çarpılarak mililitredeki ($x10^6$/ml) sperm sayısı belirlenir (DSÖ 2010).

- **Motilite**

Konsantrasyon sayımında olduğu gibi x20 büyütme altında ve 10 karede yapılır. Motil spermlerin, total sperm sayısına oranı yüzde olarak motilitiyi verir.

WHO hareketliliği 3 sınıfta değerlendirmektedir:

a- hızlı doğrusal progresif hareket
b- progresif olmayan hareket
c- hareketsiz

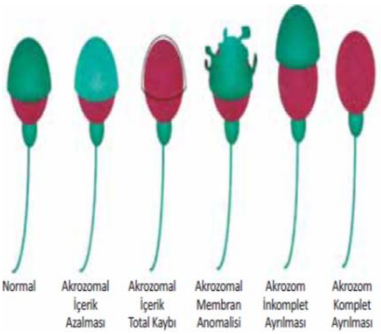
Normal sperm konsantrasyonunun >%50'si motil ve bu değerin %25'i progresif olmalıdır.

- **Morfoloji**

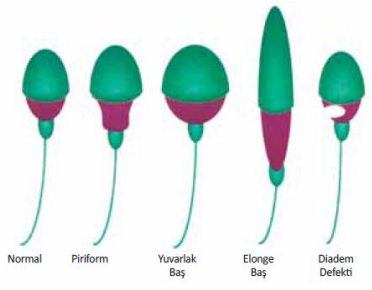
Morfolojik değerlendirme Kruger kriterlerine göre yapılmaktadır. Normal sperm morfolojisi >%14 olmalıdır.

Çizelge 2.2 Sperm morfolojisi

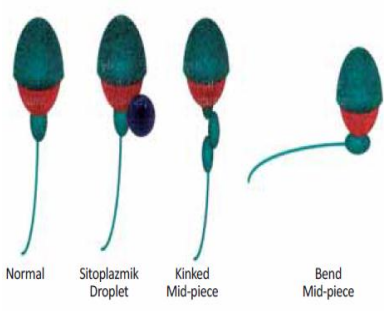
Baş	Uzunluk 5-6 mikron Genişlik 2.5-3.5 mikron
Akrozom	Başın %40-%70'ini oluşturmalıdır
Orta parça	Genişlik 1 mikron Uzunluk 1.5x baş uzunluğu
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
Sitoplazmik damlacık	Baş alanının %30-%70'inden az sadece orta parçada lokalize



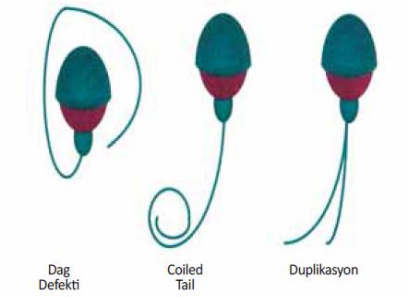
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 2.9 Sperm defektleri (http://www.uroturk.org.tr/)

a.Sperm baş defektleri b. Sperm baş defektleri c. Sperm boyun defektleri ve sitoplazmik damla d. Sperm kuyruk defektleri

2.5 Serbest Radikaller

Serbest radikal, kararlı olmayan ve atomik ya da moleküler yörüngesinde çiftleşmemiş bir veya birden fazla elektron bulunduran kimyasal bir ürün olarak tanımlanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1999). Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktiftirler. Radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlar da reaktif hale gelir ve bu reaksiyon zincirleme olarak devam ederken kontrolsüz bir durum oluşursa hücrede hasarlara neden olur.

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler (Cheeseman 1993):

1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi;

$$X : Y \rightarrow X^{\circ} + Y^{\circ}$$

2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturan her iki elektron, atomların birinde kalır;

$$X : Y \rightarrow X^{-} + Y^{+}$$

3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi;

$$X + e^{-} \rightarrow X^{\circ -}$$

2.5.1 Serbest radikallerin kaynakları

Biyolojik kaynakları:

- Aktive olmuş fagositler (Respiratory Burst)

- Antineoplastik ajanlar; nitrofurantoin, bleomisin,

- Radyasyon

- Alkol, uyuşturucular

- Çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar)

-Stres: Stres durumunda katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır (Akkuş 1995).

İntrasellüler kaynakları:

-Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler.

- Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan, dioksijenaz, hemoglobin.

- Mitokondrial elektron transportu.

-Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron tranport sistemleri (sitokrom P-450, sitokrom b3)

- Peroksizomlar: oksidazlar, flavoproteinler

-Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu (Akkuş 1995).

2.5.2 Serbest radikallerin etkileri

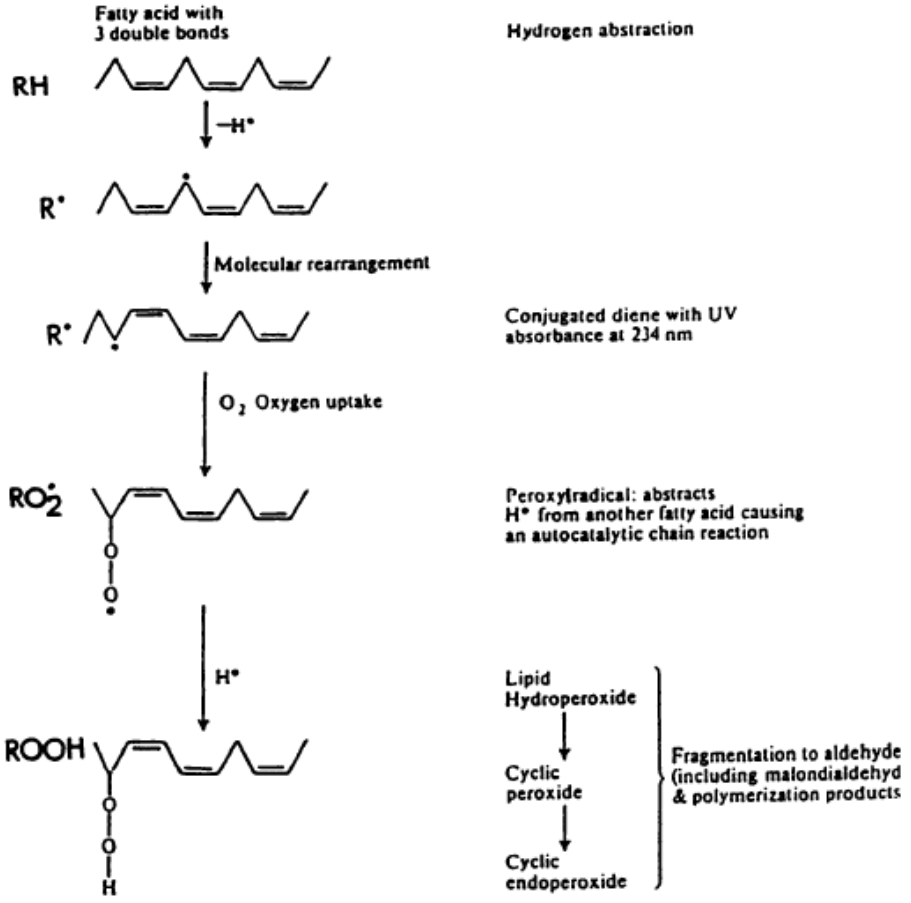
Serbest radikaller kendilerini kararlı hale getirmeye çalışırken, hücrelerdeki lipit, protein, DNA ve karbohidratlar ile reaksiyona girerek zincir reaksiyonlara yol açmaktadır. Bu reaksiyonlar, hücre bileşiklerinin bozulmasına, hücre fonksiyon kaybına ve sonuç olarak da hastalıklara neden olmaktadır (Valko vd. 2007).

2.5.2.1 Membran lipidlerine etkileri

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki en önemli etkileri lipidler üzerindedir. Serbest radikallerin, biyolojik dokularda, doymamış yağ asitlerine etkileri 'lipid peroksidasyonu' olarak bilinir. Doymamış yağ asitlerinin (polyunsaturated fatty acids-PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksit, alkol, etan, pentan ve malondialdehit gibi ürünlere yıkılma tepkimeleridir. Kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde devam eder ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Aitken 1995).

Serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar.

Hidroksil radikali lipid peroksidasyonunun güçlü bir başlatıcısıdır. (Aitken ve Fisher 1994). Hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile karbon atomu üzerinde eşleşmemiş e^- kalır ve bunun sonucunda yağ asidi bir lipid radikali (R^-) özelliği kazanır. Lipid radikali dayanıksızdır ve lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşimi sonucu lipid peroksil radikali (ROO^-) oluşur (Niki vd. 2005). Peroksil radikalleri, komşu yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendisi de açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipid hidroperoksitlerine (ROOH) dönüşür (Halliwell ve Gutteridge 1999).



Şekil 2.10 Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu (Gutteridge 1995)

Lipid peroksidasyonu oldukça zararlı bir zincir reaksiyonudur. Lipid peroksidlerinin hidrofobik yapıda olması nedeniyle reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran geçirgenliği ve mikroviskositesi ciddi şekilde etkilenir.

Membran yapısının bozulması sonucu malondialdehit oluşur (MDA). Peroksidasyonla oluşan MDA, 3 ya da daha fazla çift bağ içeren bir dialdehittir. Oksidatif durumun göstergesi olarak kullanılır. Hücre membranından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına sebep olur bu da iyon geçirgenliği, deformasyon ve enzim aktivitesini olumsuz etkiler (Masella vd. 2005).

2.5.2.2 Proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikal etkisine karşı, PUFA'dan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin, serbest radikallerin zararlarından etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (Gutteridge 1995).

2.5.2.3 Nükleik asitlere etkileri

Serbest oksijen grupları DNA üzerinde etki göstererek nükleik asitlerin yapısal değişikliklerine ve sonuçta kromozomlarda değişiklikler ile beraber mutasyonlara neden olur (Agarwal vd. 2003).

2.5.2.4 Karbohidratlara etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu şekilde kanser ve yaşlanmaya yol açarlar (Ceballos vd. 1992).

2.6 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Serbest radikaller iki ana gruba ayrılmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT).

RNT grubu, nitrik oksit (NO^{o}), nitrojen dioksit (NO_2^{o-}) gibi serbest radikaller ve peroksinitrit ($ONOO^{-}$) ve alkil peroksinitrat (RONOO) gibi radikal olmayan molekülleri içermektedir (Ghafourifar ve Cadenas 2005).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Bu radikaller reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılırlar.

En yaygın reaktif oksijen türleri; süperoksit anyonu (O_2^{o-}), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil radikali (LOO^{-}) ve oldukça reaktif hidroksil ($^{\cdot}OH$) radikalidir (Sikka vd. 1996).

2.6.1 Süperoksit anyonu

Canlılarda oluşumu ilk gösterilen radikaldir. Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu serbest süperoksit radikal anyonu (O_2^{o-}) meydana gelir (Gutteridge 1995).

$$O_2 + e^{-} \longrightarrow O_2^{o-}$$

Başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

- İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirlerken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.

- Başta çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali oluşabilir.

- Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.

- Aktive edilen fagositik lökositler, bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve bulundukları ortama verirler (Steinman 1982).

Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Akkuş 1995).

$$Fe_2^{+} + O_2 \longrightarrow Fe_3^{+} + O_2^{o-}$$

$$Cu^{+} + O_2 \longrightarrow Cu_2^{+} + O_2^{o-}$$

2.6.2 Hidrojen peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) meydana getirir. H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (McCord 2000).

$$O_2^{o-} + e^{-} + 2H^{+} \longrightarrow H_2O_2$$

$$O_2 + 2e^{-} + 2H \longrightarrow {}^{+}H_2O_2$$

Hidrojen peroksit yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden serbest radikal özelliği taşımaz. Oksitleyici bir tür olmasının nedeni Cu, Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır (Elstner 1991).

Süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici oksijen radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolayca yıkılabilir. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu katalizör varlığında ya da katalizörsüz gerçekleşebilir. Katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaştır. Demirle katalizlenen ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe_3^+) süperoksit tarafından ferro demire (Fe_2^+) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten ·OH ve OH^-üretilir (Benzie 2000).

$$O_2^{o-} + Fe_3 \longrightarrow O_2 + Fe_2^+$$

$$Fe_2^+ + H_2O_2 \longrightarrow Fe_3^+ + OH^- + \cdot OH$$

$$O_2^{o-} + H_2O_2 \longrightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$$

2.6.3 Hidroksil radikali

Hidroksil radikali (·OH), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir. Suyun, yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur (Gutteridge 1995).

$$H - O - H \longrightarrow H\cdot + \cdot OH$$

Son derece reaktif bir oksijen radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur.

2.6.4 Singlet oksijeni

Singlet oksijeni ($^1O_2$), ortaklanmamış bir elektron içermediği için serbest radikal değildir. Bununla birlikte, dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur ve oksijenden daha hızlı bir biyolojik moleküldür (Gutteridge 1995).

2.7 Reaktif Oksijen Türleri ve Sperm Fizyolojisi

ROT'lerin konsantrasyonuna, konumuna ve ROT'lere maruz kalma süresine bağlı olarak, sperm fonksiyonları üzerinde olumlu ya da olumsuz etkileri olabilir.

Spermatozoanın ürettiği küçük miktarlardaki ROT'nin bazı sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli fizyolojik role sahip olduğu ilk kez Aitken vd. tarafından ortaya konmuştur. Bu araştırmacılar, düşük miktarda ROT'nin spermin zona pellusidaya bağlanma yeteneğini arttırdığını göstermiştir (Aitken 1997).

Diğer bazı çalışmalarla, spermatozoada düşük miktarlardaki H_2O_2'nin sperm kapasitasyonunu, akrozomal reaksiyonu ve oosit füzyonunu uyardığı gösterilmiştir (Agarwal vd. 2003).

Semende ROT'nin iki ana kaynağı bulunur; lökositler ve immatür spermatozoa (Garrido vd. 2004). Lökositin başlıca ROT kaynağı olduğu düşünülmektedir. İmmatür spermatozoa ve ROT üretimi arasında, sperm kalitesini olumsuz yönde etkileyen güçlü bir pozitif korelasyon meydana gelmektedir (Guzman vd. 2001).

Spermatozoa plazma membranı ve sitoplazması fazla miktarda PUFA içerdiğinden, ROT'lere karşı savunmasızdır. Süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve özellikle hidrojen peroksit spermatozoadaki başlıca ROT kaynaklarıdır. H_2O_2'nin yüksek konsantrasyonları lipid peroksidasyonunun uyarılmasına ve hücre ölümüne neden olur (Agarwal 2005).

Spermatozoa 2 yolla ROT üretebilir (Aitken 1994);

1. Sperm plazma membranı düzeyinde NADPH

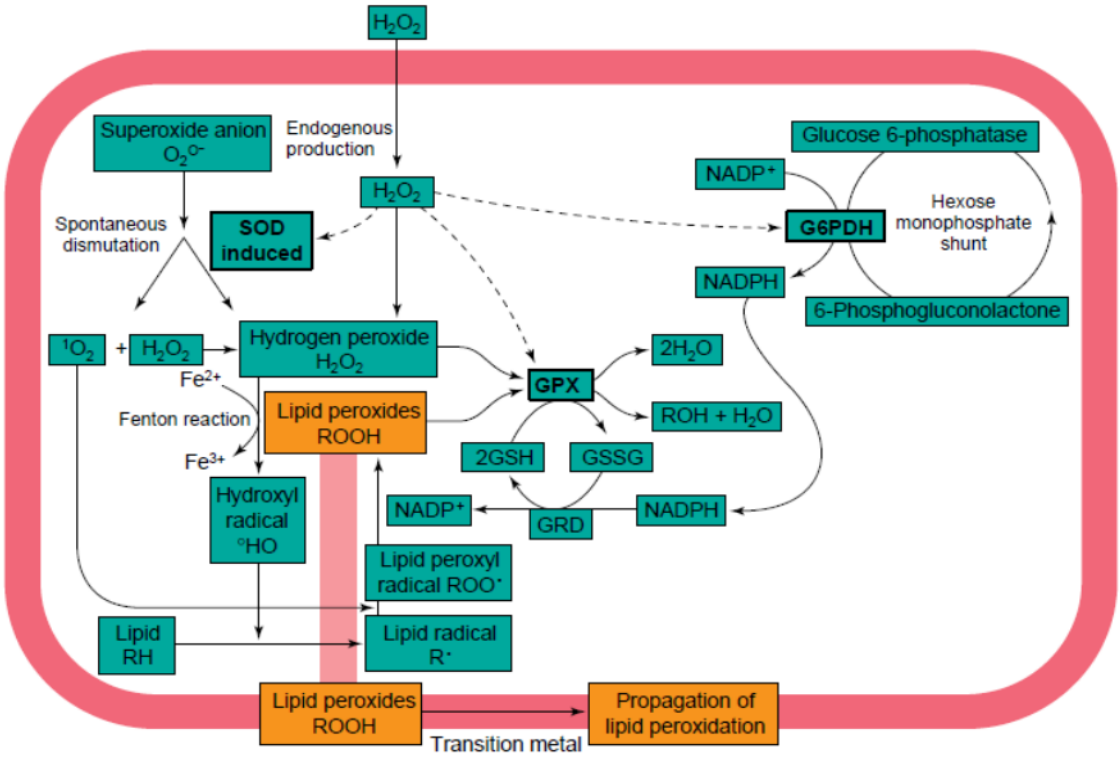
2. Mitokondri plazma membranı düzeyinde NADPH bağımlı oksido-redüktaz (diaforaz)

Redükte NADPH'in, NADPH oksidaz tarafından okside edildiği reaksiyonda oksijen de süperoksit anyonuna redükte edilir (Kavas 1994).

Spermler, hareket için sürekli enerjiye ihtiyaç duyduklarından mitokondri bakımından zengindirler. İşlevsiz mitokondrilerde ROT'nin üretimi fazladır. Bu durum sperm mitokondrial fonksiyonlarını etkiler. Burada karşılıklı bir etki söz konusudur: ROT, mitokondri membranında hasara neden olurken; mitokondri membranındaki hasar ROT üretimin artmasına yol açar (Agarwal 2005).

Çekirdek DNA'sına göre mitokondriyal DNA'da (mtDNA) oksidatif baz hasarının fazla olmasının olası nedenleri, mtDNA'nın en önemli hücre içi ROT kaynağı olması, DNA hasarı onarım sisteminin çekirdek DNA'sına göre yetersiz olması ve yaşa bağlı olarak mtDNA'da mutasyonlarda artış görülmesi olarak bildirilmektedir (Lim vd. 2005).

Artmış ROT seviyeleri, azalmış sperm motilitesi ile ilgili bulunmuş ancak mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Lenzi vd. 1993). Bir hipoteze göre, H_2O_2 hücre membranını geçmekte ve daha sonra spermatozoa tarafından ROT üretimini arttırmak için elektron kaynağı olarak NADPH oksidaz olarak bilinen enzim sistemi tarafından kullanılacak olan NADPH'nin hücre içinde elde edilmesini sağlayan heksoz monofosfat şantı yolu ile glukoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi bazı vital enzimlerin işlevini engellemektedir (Aitken vd. 1997). Bir diğer hipotez ise aksonemal proteinlerin fosforilasyonunda ve sperm hareketliliğinde azalma ile sonuçlanan bir dizi olaya dayanır. Her ikisi de sperm-oosit füzyonunda gerekli olan membran akışkanlığında azalmaya neden olmaktadır (de Lamirande ve Gagnon 1992).



Şekil 2.11 Spermatozoonda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Savunma Sistemleri (Irvine 1996)

2.7.1 Semende ROT'nin üretiminde lökospermi'nin rolü

Lökositler, erkek üreme sistemi boyunca mevcut olup hemen hemen bütün insan ejakulatlarında mevcuttur. Semendeki lökosit infitrasyonunun artması, yani lökospermi, halen tartışma konusu olmasına rağmen lökosperminin zayıf semen kalitesi, düşük sperm hiperaktivasyonu ve sperm yapısında bozukluk gibi durumlarla bağlantılı olduğu bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) kriterlerine göre semende 1 milyon/ml'den fazla lökosit görülmesi lökospermiyi tanımlar.

Peroksidaz-pozitif lökositler, tüm seminal lökositlerin %50 ile %60'ını oluşturur. Peroksidaz-pozitif lökositlerin %50-60'ını polimorfonükleer lökositler, %20-30'unu makrofajlar kapsar. Bu lökositlerin temel kaynağı prostat bezi ve seminal veziküllerdir. (Thomas ve ark 1997). Peroksidaz-pozitif lökositlerin semendeki yüksek ROT üretiminin başlıca kaynağı olduğu tespit edilmiştir. Aktif lökositler aktif olmayanlara göre 100 kat daha fazla miktarda ROT üretir. Lökositler, inflamasyon ve enfeksiyon

gibi çeşitli uyaranlara yanıt olarak aktive edilebilir. Aktive lökositler, heksoz monofosfat yoluyla NADPH üretimini arttırır (Wolff 1995, Agarwal 2003).

2.8 Oksidatif Stres

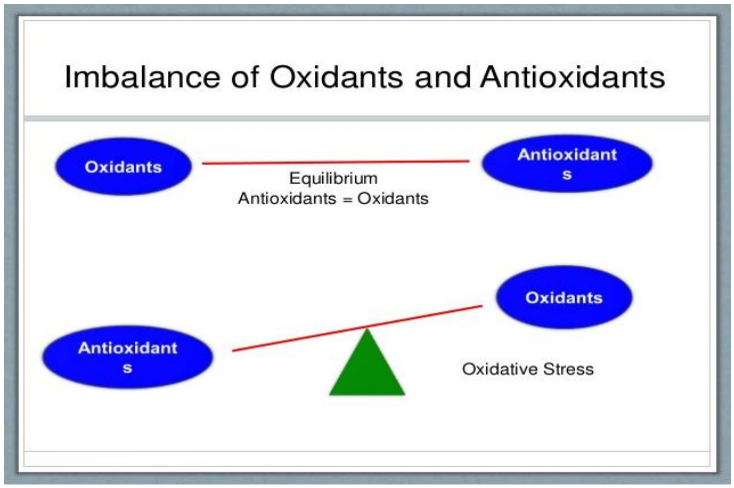
Oksijen yaşamın devamlılığı için gereklidir ancak ROT gibi oksijen metabolitleri hücre fonksiyonlarını değiştirebilir ve hücre canlılığını tehlikeye sokabilir. Sağlıklı organizmalarda üretilen ROT'nin miktarı ve bunları temizleyici sistemler arasında bir denge vardır. Normal hücre yapısını koruyabilmek için ROT, sürekli olarak inaktive edilmelidir. Hücresel temizleyici sistemler ROT artışını elimine edemediğinde bu denge bozulur. Bu dengenin radikaller lehine bozulması sonucu oksidatif stres (OS) ortaya çıkar (Sharma vd. 2012).

Lipidler, proteinler, nükleik asitler ve şekerler de dahil olmak üzere hücrenin bütün bileşenleri OS için potansiyel birer hedeftir.

Aşırı ROT üretimi olduğunda veya antioksidan savunma mekanizması bozulduğunda OS meydana gelir ve spermatozoa için zararlı bir durumdur. OS, bazların modifikasyonu, delesyonlar, çerçeve kaymaları, DNA fragmentasyonu ve proteinlerin çapraz bağlanmasına neden olabilir. Ayrıca nokta mutasyonları ve polimorfizm gibi gen mutasyonlarına sebep olur. Hasarlı DNA'ya sahip sperm ise döllenme yeteneğini kaybeder (Agarwal ve Sharma 2005).

Oksidatif stresin DNA hasar mekanizmaları; tüm bazların değişimi, boş baz alanları oluşumu, silinme, çerçeve kayması, çapraz bağlantılar ve kromozomal değişim şeklindedir. Ayrıca, tek veya çift DNA zincirindeki kırıkların sık tekrarlaması da oksidatif stres ile ilgilidir. ROT ayrıca nokta mutasyonlar, polimorfizm gibi semen kalitesini düşüren mutasyonlar da yapabilir (Duru vd. 2000). Denatürasyon ve DNA baz eşleniği oksidasyonu gibi mekanizmalarla da oluşabilir (Kodama vd. 1997).

DNA hasarı küçük boyutlardayken sperm kendini yenileyebilir. Ancak hasar büyük olduğunda apoptozis meydana gelir. Y kromozomunda DNA hasarı meydana geldiğinde, kromozomda delesyon meydana gelir ve infertiliteye sebep olabilir (Agarwal ve Sharma 2005).



Şekil 2.12 Oksidatif stres (http://www.slideshare.net/)

2.8.1 Oksidatif stres ve apoptozis

Apoptozis, morfolojik ve biyolojik değişikliklerle karakterize bir dizi olaydır ve hücrenin ölümüne neden olur. İçsel ve çevresel faktörler tarafından tetiklenebilir. Işın tedavisi, kemoterapi ve toksinlere maruz kalma çevresel tetikleyicilere örnektir ve testiküler hücre apoptozisi için potansiyel oluştururlar (Grunewald vd. 2005).

Mitokondri de apoptozis mekanizmasında anahtar rol oynar. Mitokondri bütünlüğü, iç zar bölgesinde bulunan sitokrom c varlığı ile kurulur. ROT'lerin aşırı üretimi mitokondri iç ve dış zar membran yapısını bozabilir. Bu durum sitokrom c proteininin sitoplazmaya serbest bırakılması ile sonuçlanır. Serbest kalan sitokrom c, kaspazları aktive eder ve apoptozisi başlatır (Sinha ve Swerdloff 1999).

Normal spermatogenez sırasında hücre gelişimi ve farklanmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu spermatozoon oluşumunda kritik rol oynar. Testiküler

germ hücre apoptozisi fizyolojik ve devamlı olarak hayat boyu meydana gelir. Apoptozisin normal spermatogenez sürecinde iki önemli rolü vardır. Bunlardan ilki Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek germ hücre populasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoonun azalmasında seçici olmaktır (Sakkas vd. 1999).

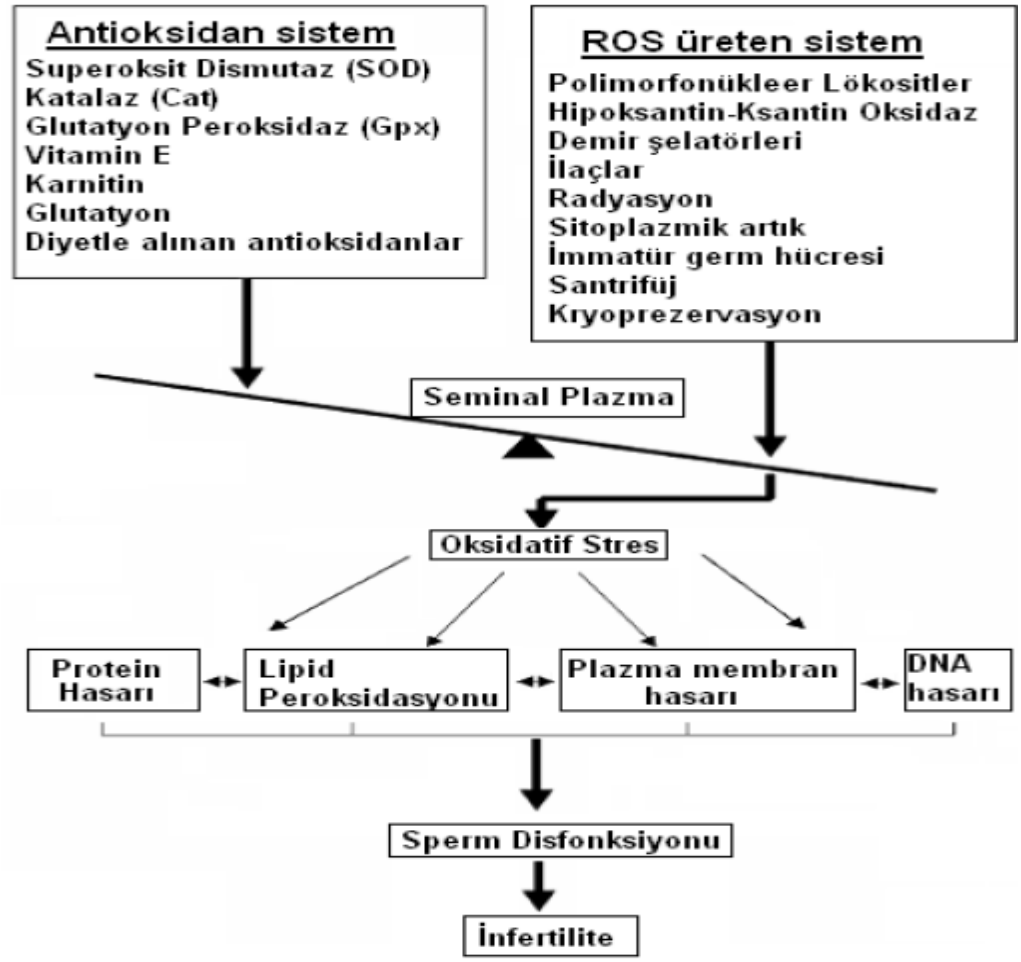
Yapılan bir çalışmada DNA hasarı ve muhtemelen DNA tamirinin azalan seviyeleri karşısında apoptozisin, hatalı genetik bilginin embriyoya geçmesini engelleyen son basamak olduğu düşünülmüştür (Singh 2003).

2.9 Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT'nin saldırılarına karşı, hücreler de güçlü bir antioksidan savunma sistemi ile donatılmıştır. Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı hücreyi koruyan temel savunma faktörleridir (Sikka 1996).

Hücre içi antioksidan savunma sistemi, enzimatik ve enzimatik olmayan komplekslerden oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 2001). Enzimatik antioksidan savunma sistemi, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST) ve sitokrom oksidaz'dan oluşmaktadır (Khan vd. 2010).

Fertil erkeklerin seminal plazmasındaki total antioksidan kapasitesinin (TAC) infertil erkeklerin seminal plazmasındakinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Lewis vd. 1995).



Şekil 2.13 Reaktif oksijen türleri, antioksidanlar ve oksidatif stres

2.9.1 Süperoksit dismutaz

İlk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Fridovich 1983).

$$2\ O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır;

- Sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD). Hücrede en bol bulunan izomerdir. 21 nolu kromozomda lokalize olmuştur.
- Mitokondride bulunan tetramerik, Mn içeren izomer (MnSOD). 6. kromozomda lokalize olmuştur (Perry vd. 2010).

SOD'nin fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylelikle lipid peroksidasyonunu inhibe eder.

2.9.2 Katalaz

Katalaz 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Fonksiyonu, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Böylece hidrojen peroksidin hücresel bileşiklere zarar vermesini engelleyen koruyucu bir enzimdir. Peroksizomlarda lokalizedir. Hidrojen peroksit, katalaz tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan hidroksil radikalinin öncülü olarak davranır ve bu radikal hücrede kalıcı hasarlara neden olur (Mates vd. 1999, Chelikani vd. 2004).

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

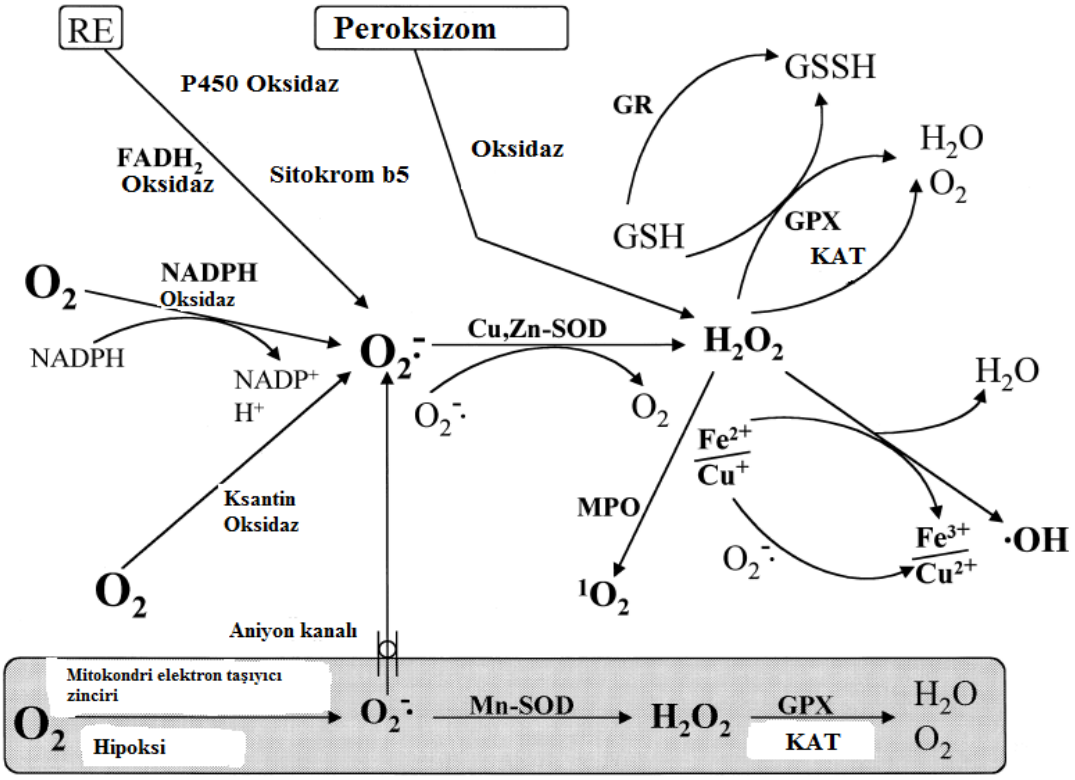
2.9.3 Glutatyon peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik, 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir.

GPx enzimi, redüklenmiş glutatyon tripeptidi (GSH) ile hidrojen peroksit molekülünün reaksiyonunu katalize ederek hidrojen peroksit molekülünün suya çevrilmesini sağlamaktadır. Böylece hücre membranı ve hücre içinde bulunan organelleri oksidatif strese karşı korumaktadır (Drevet 2006).

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

$$2GSH + ROOH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O$$



Şekil 2.14 Antioksidan savunma sistemleri (Mates vd. 1999)

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan, Sodyum karbonat ($Na_2CO_{3)}$,Sodyum hidroksit (NaOH), Bakır sülfat ($CuSO_4.5H_2O$), Sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat), Bovine serum albumin (BSA), Folin reaktifi, Tiyobarbitürik asit (TBA), Trikloroasetik asit (TCA), Malondialdehit (MDA), Hidrojen peroksit ($H_2O_{2)}$, 4-Aminoantipirin (4-AP), Sodyum 3,5 dikloro-2- hidroksi benzen (DHBS), Horseradish Peroksidaz (HRP), Sodyum azid (NaN_3), Etilenediaminetetraasetik asit (EDTA), Glutatyon Redüktaz (GR), Glutatyon (GSH), Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH), Kumil hidroperoksit (CuOOH), Xanthine, Nitroblue Tetrazolium (NBT), Ksantin oksidaz (XOD) Sigma firmasından sağlanmıştır.

Çalışma boyunca; kullanılan kimyasalların miktarlarını tartmak amacıyla hassas terazi (Mettler Toledo/ AL204), ısıtma veya karıştırma amacıyla kullanılan ısıtıcı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica), enzim çalışmalarında kullanılan buz makinesi (Lab312), deneyler sırasında kullanılan tamponlar ve solüsyonların pH'sını sağlamak amacıyla pH metre (Hanna pH 211), spektrofotometrik ölçümler için spektrofotomerte (Analytik Jena/ specord 200) ve kuvars küvet (Hellma) , yüksek devir soğutucu santrifüj (Sigma), araştırmalar sürecinde otomatik pipetler (Gilson p10-p1000), sperm sayımı için kullanılan sperm sayım kamarası (Makler), semen örneklerinin inkübasyonu için inkübatörlerden (Sanyo) faydalanılmıştır.

3.2 Örneklerin Temin Edilmesi ve Gruplandırılması

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'ne infertilite problemi ile müracaat eden hastaların örnekleri kullanılmıştır. Çalışmaya, 35 normozoospermik, 15 oligozoospermik ve 10 azoospermik hasta olmak üzere toplam 60 hasta dahil edildi. Semen örnekleri uygun şartlarda steril, plastik ve ağzı geniş bir semen kabına alınıp embriyoloji laboratuvarına iletilmiş ve hemen steril, non-toksik tüberkülin

enjektörleriyle 0,5'er mL semen, her bir deney grubu için ayrılıp dondurma tüpleri içerisinde kapağı açık şekilde oksijen kontrol özelliği bulunan (%5) ve bulunmayan (%20), aynı sıcaklıkta ve aynı CO_2 (%6) konsantrasyonundaki, inkübatörlerde 1'er saat süreyle bekletilmiştir.

Bekleme sürecinde sperm örneklerinin spermiyogramları yapılıp not edilmiştir. Bir saat bekleme süresinin sonunda, örnekler daha sonra çalışılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır. Çalışma, örneklerin sperm sayılarına göre; normozoospermi, oligozoospermi ve azoospermi olmak üzere 3 farklı grup üzerinden yürütülmüştür.

1. grup normozoospermi (kontrol grubu); Tüm sperm parametreleri normal. Sperm sayısı 20 milyon/ml'den daha fazla.

2. grup oligozoosperm; sperm sayısı 20 milyon/ml'den daha az.

3. grup azoosperm ise hiç sperm bulunmaması durumudur.

Her grup için %5 ve %20 oksijen seviyesinde bekletilen her bir örnek 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra protein miktarları, GPx (Glutatyon peroksidaz), SOD (süperoksit dismutaz), katalaz ve MDA (malondialdehit-lipid peroksidasonu) düzeyleri ölçülmüştür.

3.3 Semen Örneklerinde Protein Tayini

Protein miktarı Lowry metodu ile belirlenmiştir. Alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve $Cu^{+1'}$ e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan aminoasitler Folin reaktifini indirgeyerek mavi renk oluşumuna neden olur. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır, 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Lowry vd. 1951).

Lowry metodunda, protein standardı olarak 1 mg/mL sığır serum albumini (BSA) çözeltisinden faydalanılmış ve 0.1-0.5 mg/mL aralığında BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca, bu metotta kullanılmış olan Lowry reaktifi; A (%2 Na_2CO_3, 0.1N NaOH), B (%1 $CuSO_4.5H_2O$) ve C (%2 Na-K tartarat) tamponlarının sırayla 100:1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi ise 1:1 oranında distile su ile hazırlanmıştır. Sperm örneklerinin protein tayini için 0.5 mL Kör (sadece saf su), standart protein çözeltileri (BSA) ve sperm örneklerini içeren tüplere 2.5 mL Lowry reaktifi eklenerek iyice karıştırılmıştır ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüm deney tüplerine 0.25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüm solüsyonların 660 nm'de Kör'e karşı absorbans ölçümleri alınmıştır. Sperm örneklerinin protein miktarı, BSA konsantrasyonuna karşılık gelen OD_{660} değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.4 Semen Örneklerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Tayini

Örneklerin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Geller ve Winge tarafından geliştirilmiş metot kullanılmıştır. Bu metot, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, nitro blue tetrazolium (NBT) ile meydana getirdiği mavi renkli formazan boyasının 550 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır

SOD enzim aktivitesinin tayini amacıyla 0,3 mM ksantin, 150 mg/mL NBT ve ksantin oksidaz içeren 'Ksantin/ksantin oksidaz sistemi'yle oluşturulacak süperoksit radikalleri SOD enzim sistemince kullanılmadığında ortamda bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin redüksiyonuna ve ortamda renk değişimine neden olacaktır.

Örneklerin SOD enzim aktivitesine olan etkilerinin tespiti için öncelikle Kör hazırlanmıştır. Örnekler için; 40 µL sperm örneğinin üzerine sırasıyla, 600 µL sodyum karbonat (Na_2CO_3) tamponu (200 mM, pH=10.0), 300 µL ksantin (0.3 mM), suyla hazırlanan 40 µL NBT karışımı ve 0.28 U/mL XOD enziminden 20 µL eklenerek

karışımın hacmi 1000 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım 1,5 dakika inkübasyon süresi içerisinde iyice karıştırıldıktan sonra küvet içinde oluşan reaksiyonlar 550 nm dalga boyunda 5 dakika boyunca takibe alınmıştır.

Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

$$EA\ (U/mL) = (OD_{kör}-OD_{numune})/OD_{kör)}\ x\ (seyreltme\ faktörü)$$

3.5 Semen Örneklerinde Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Tayini

Bu metotta GPx etkisiyle glutatyon ve hidrojen peroksitin su ve yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) çevrimi sonrasında açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR'ın NADPH molekülünü NADP'ye oksidasyonunun 340 nm'de spektrofotometrik olarak takibi gerçekleştirilir.

Örneklerin GPx enzim aktivitesine olan etkilerinin tespiti için öncelikle Kör hazırlanmıştır. Örnekler için; küvet içine sırasıyle 815 µL 0.5 mM'lık EDTA içeren Tris.HCl (pH=8.0) tamponu, 25 µL glutatyon redüktaz (20 U/mL) enzimi, 100µL 20 mM'lık GSH, 25 µL 30 mM'lık kumilhidroperoksit (CuOOH), 10 µL sperm örneği ve son olarak 25 µL 10 mM'lık NADPH çözeltisi eklenerek karışımın toplam hacmi 1000 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım 1 dakikalık inkübasyon süresi içerisinde karıştırıldıktan sonra 340 nm'de optik dansitedeki (OD_{340}) düşüş, 5 dakika süresince takibe alınmıştır. Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanır;

$$EA\ (IU/mL) = (OD_{340}/dakika)\ x\ [1/\varepsilon 340\ x\ (seyreltme\ faktörü)]$$

(NADPH için 340 nm'deki sönümleme katsayısı (e340) 0,00622 nM-1.cm-1 olarak alınmıştır).

3.6 Semen Örneklerinde Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini

CAT aktivitesi Aebi tarafından önerilen metoda göre yapılmıştır. Enzim aktivite tayini, hidrojen peroksitin (H_2O_2) 520 nm'deki absorbansının enzim ile etkileşmesinden sonra azalmasının zamana bağlı olarak ölçülmesiyle gerçekleştirilir.

Eppendorflara sırasıyla; 20 µL sperm örneği, 50 mM'lık fosfat tamponundan 55 µL ve 10 mM'lık H_2O_2 çözeltisinden 200 µL eklenerek 2 dakika inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrası karışıma 725 µL 15 mM'lık sodyum azit (NaN_3) ilave edilmiş ve 5 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İkinci inkübasyondan sonra, yani deneyin ikinci aşamasında, her karışımdan 10'ar µL başka eppendorflara alınmış ve bunlara 1000'er µL kromojen+HRP karışımı eklenmiştir. Kromojen karışımı aynı günde kullanmak amacıyla 4-aminoantipirin (4-AP), sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat (DHBS) ve 150 mM fosfat tamponu (1mL:1mL:3mL oranında) ile hazırlanmıştır, total karışıma her 1 mL için 1 µL ve horseradish peroksidaz (HRP) enziminden eklenmiştir. Karışım karanlık ortamda 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, ortamda kalan H_2O_2 ile kromojen arasında oluşan reaksiyondan ortaya çıkan pembe renk 520 nm dalga boyunda okunmuştur.

Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanır;

$$EA(IU/mL) = (\Delta H_2O_2/\text{dakika}) \times (\text{seyreltme faktörü})/ \text{deney hacimi}$$

3.7 Semen Örneklerinde Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşiklerin (TBARS) Oluşumu Üzerine Olan Etkileri

Oksijen radikalleri fosfolipitlerin yapılarında bulunan doymamış serbest yağ asitleri ile reaksiyona girerek, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna neden olmaktadır. Diğer taraftan yüksek ROT düzeyi lipit peroksidasyon ürünlerinin yıkımı sırasında düşük moleküler ağırlıklı aldehitlerin oluşumuna yol açmaktadır. Malondialdehit (MDA) bunlardan birisidir. Bu bileşikler ise tiyobarbitürik asit ile bileşik oluşturma eğilimindedir. Dolayısıyla hücresel lipid peroksidasyonu düzeyinin belirlenmesinde

tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren bileşik (MDA) düzeylerinin tayini hücresel oksidatif stres düzeyi hakkında bilgi vermektedir.

Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için TBARS düzeyleri Okhawa ve arkadaşlarının geliştirdiği metot ile analiz edilmiştir. Bu metotta, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, asidik (pH=3.0-4.0) ve sıcak (95 ºC) bir ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA-TBA kompleksini oluşturmaktadır.

Sperm örneklerinin lipit peroksidasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, deney tüplerine sırasıyla 500 µL sperm örneği, 400 µL %15'lik trikloro asetik asit (TCA), 800 µL % 0.67'lik tiyobarbitürik asit (TBA) eklenip 30 dakika kaynar suda kaynamaya bırakılmıştır. Kaynama sonrası soğumaya bırakılmış ve daha sonra 6000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, oluşan süpernatant alınmış, oluşan pembe renk 532 nm'de Köre karşı spektrofotometrik olarak okunmuştur.

Lipit peroksidasyonu üzerine inhibisyon etkisi, aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır :

$[TBARS] = [(OD_{numune})–(OD_{kör})/\text{Kalibrasyon Eğrisi Eğimi } (\mu M^{-1})]x(\text{seyreltme faktörü}) = \mu M \text{ MDA Ekuvalanı}.$

4. BULGULAR

Grupların kendi içlerindeki (%5-%20) farklılığın belirlenmesi için SPSS programından NPar testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki (normozoosperm-oligozoosperm-azoosperm) farklılığın belirlenmesi için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Sonuçlar [Ortalama ± SD; ortanca (min-max)] olarak verilmiştir**.**

4.1 Yüzde 5 ve yüzde 20' lik Oksijen Seviyeleri İçin Genel Sonuçlar

Çalışmamızda %5 ve %20'lik oksijen seviyesinde bekletilen sperm örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Sonuçlar çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

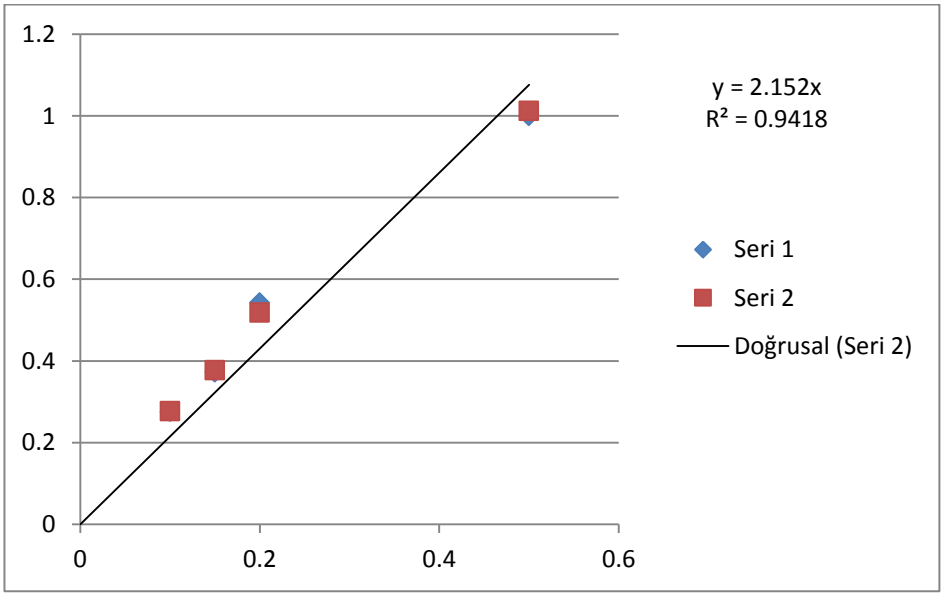
Çizelge 4.1 Yüzde 5 ve yüzde 20'lik oksijen seviyeleri için genel sonuçlar

	Normozoosperm		**Oligozoosperm**		**Azoosperm**	
	%5	**%20**	**%5**	**%20**	**%5**	**%20**
Protein (mg/mL)	34,34 ± 4,96 35,46 (27,43-39,01)	39,28 ± 4,78 37,10 (36,49-46,48)	52,67 ± 8,4 47,87 (47,78-62,37)	49,10 ± 7,38 48,11 (42,26-56,92)	41,38	44,28
GPx (U/mL)	2,47 ± 0,55 2,49 (1,60-3,10)	3,13 ± 0,41 3,05 (2,57-3,61)	2,87 ± 0,42 2,65 (2,61-3,37)	2,43 ± 0,53 2,17 (2,08-3,05)	1,14	1,12
SOD (U/mL)	0,79 ± 0,12 0,81 (0,6-0,96)	0,8 ± 0,16 0,82 (0,99-0,55)	0,6 ± 0,07 0,57 (0,69-0,54)	0,63 ± 0,04 0,64 (0,67-0,58)	0,47	0,47
Katalaz (IU/mL)	4,42 ± 0,35 4,56 (3,9-4,79)	4,40 ± 0,43 4,54 (3,64-4,68)	2,74 ± 0,47 2,47 (2,46-3,29)	2,94 ± 0,83 3,07 (2,05-3,7)	3,52	3,17
MDA nmol/mL	2,72 ± 0,84 2,5 (2,08-4,18)	2,26 ± 1,11 2,18 (0,75-3,8)	4,19 ± 0,84 4,1 (3,39-5,08)	4,48 ± 0,31 4,39 (4,23-4,83)	6,73	6,27

4.2 Semen Örneklerinde Protein Tayini

4.2.1 BSA kalibrasyon eğrisi

Sperm örneklerinin toplam protein miktarı Lowry yöntemine göre çizilmiş kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çizilebilmesi için sığır serum albumininden (BSA) hazırlanmış, farklı konsantrasyonlardaki solüsyonlardan elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır. BSA kalibrasyon eğrisi şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Toplam protein tayini için BSA kalibrasyon eğrisi

4.2.2 Semen örneklerinin toplam protein miktarları

Çizelge 4.2 Semen örneklerinin toplam protein miktarları

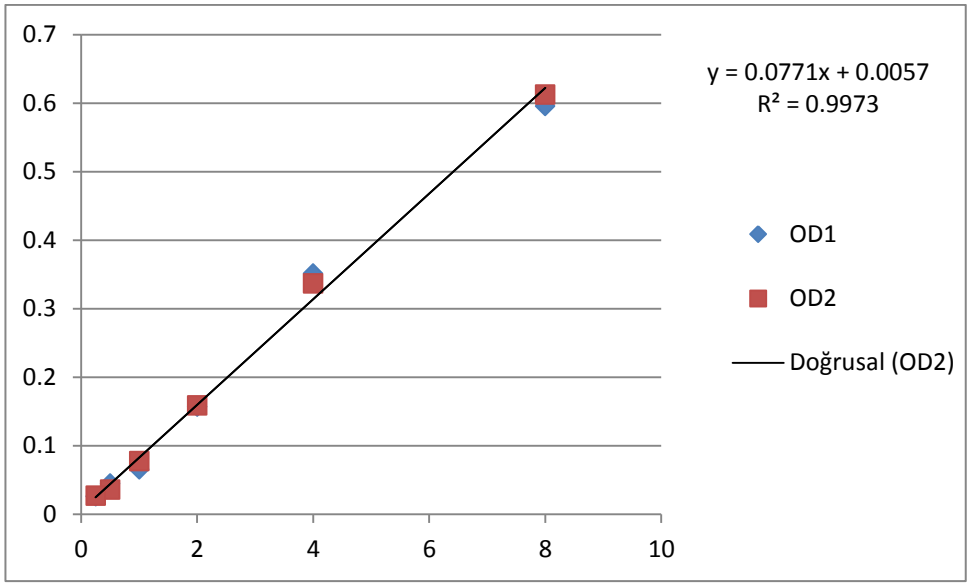
mg/mL	5%	20%
Normozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	34,34 ± 4,96 35,46 (27,43-39,01)	39,28 ± 4,78 37,10 (36,49-46,44)
Oligozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	52,67 ± 8,4 47,87 (47,78-42,26)	49,10 ± 7,38 48,11 (42,24-56-92)
Azoosperm	41,38	41,28

4.3 Semen Örneklerinin Lipid Peroksidasyon Üzerinde Olan Etkileri

4.3.1 MDA kalibrasyon eğrisi

Sperm örneklerinin lipit peroksidasyon üzerinde olan etkilerini belirlemek amacıyla tiyobarbiturik asit (TBARS) metodu kullanılmıştır. Bu metotta, lipit peroksidasyonunun son ürünü olarak bilinen MDA, asidik ve sıcak bir ortamda TBA ile reaksiyona girerek, MDA-TBA kompleksini oluşturmaktadır. Bu kompleksten ortaya çıkan pembe renk spektrofotometrik olarak 532 nm'de MDA miktarındaki düşüşe bağlı olarak absorbsiyondaki görülen azalmanın takibiyle gerçekleştirilmiştir.

Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için MDA'dan hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardan oluşan solüsyonlardan elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır. MDA kalibrasyon eğrisi şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 MDA kalibrasyon eğrisi

4.3.2 Semen örneklerinin lipid peroksidasyon ölçümleri

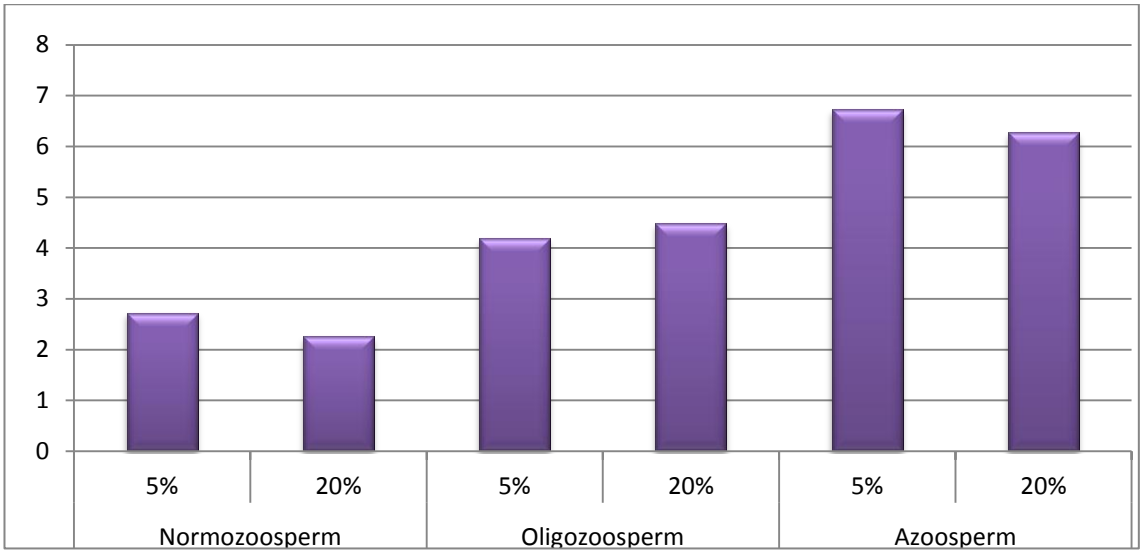
Çizelge 4.3 Sperm örneklerinin lipid peroksidasyon sonuçları

nmol/mL	5%	20%
Normozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	2,72 ± 0,84 2,5 (2,08-4,18)	2,26 ± 1,11 2,18 (0,75-3,8)
Oligozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	4,19 ± 0,84 4,1 (3,39-5,08)	4,48 ± 0,31 4,39 (4,23-4,83)
Azoosperm	6,73	6,27

MDA düzeyleri (%5); normozoospermik grupta ortalama 2,72 (±0,84) nmol/mL iken, oligozoospermik grupta 4,19 (±0,84) nmol/mL ve azoospermik grupta 6,73 nmol/mL

olarak belirlenmiş ve gruplar arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0,05$).

MDA düzeyleri (%20); normozoospermik grupta ortalama 2,26 (±1,11) nmol/mL iken, oligozoospermik grupta 4,48 (±0,31) nmol/mL ve azoospermik grupta 6,27 nmol/mL olarak belirlenmiş ve gruplar arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



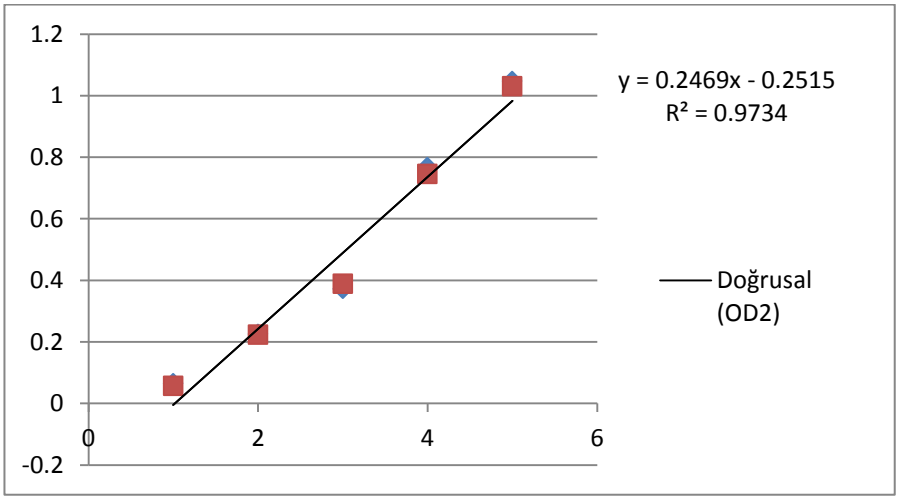
Şekil 4.3 Sperm örneklerinin lipid peroksidasyon sonuçları

4.4 Semen Örneklerinin Katalaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri

4.4.1 H_2O_2 kalibrasyon eğrisi

Sperm örneklerinin katalaz (KAT) enziminin, hidrojen peroksiti suya katalizlediği reaksiyon spektrofotometrik olarak 520 nm'de peroksit miktarındaki düşüşe bağlı olarak absorbsiyondaki görülen azalmanın takibiyle gerçekleştirilmiştir. KAT enziminin aktivitesi H_2O_2 kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için H_2O_2'den hazırlanmış, farklı konsantrasyonlardan oluşan solüsyonlardan elde

edilen absorbans değerleri kullanılmıştır. H2O2 kalibrasyon eğrisi şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 H_2O_2 kalibrasyon eğrisi

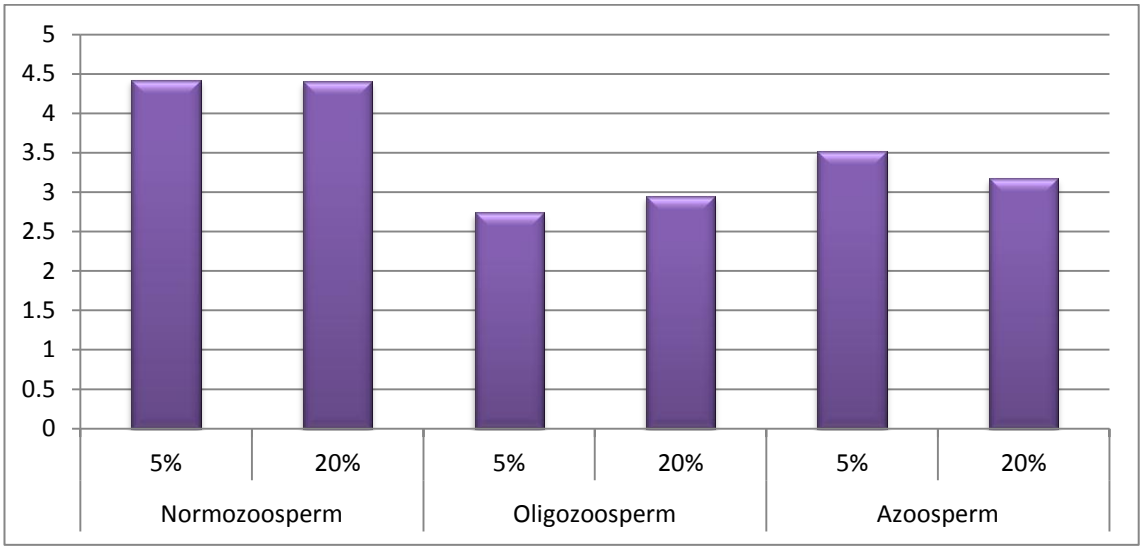
4.4.2 Semen örneklerinin katalaz ölçümleri

Çizelge 4.4 Sperm örneklerinin katalaz miktarları

	5%	20%
Normozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	4,42± 0,35 4,56 (3,9-4,79)	4,40 ± 0,43 4,54 (3,64-4,68)
Oligozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	2,74 ± 0,47 2,47 (2,46-3,29)	2,94 ± 0,83 3,07 (2,05-3,7)
Azoosperm	3,52	3,17

Katalaz düzeyleri (%5); normozoospermik grupta ortalama 4,42 (±0,35) IU/mL iken, oligozoospermik grupta 2,74 (±0,47) IU/ mL ve azoospermik grupta 3,52 IU/mL olarak belirlenmiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Katalaz düzeyleri (%20); normozoospermik grupta ortalama 4,4 (±0,54) IU/mL iken, oligozoospermik grupta 2,94 (±0,83) IU/ mL ve azoospermik grupta 3,17 IU/mL olarak belirlenmiştir. Normozoospermik ve oligozoospermik gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.5 Sperm örneklerinin katalaz miktarları

4.5 Semen Örneklerinin Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Üzerinde Olan Etkileri

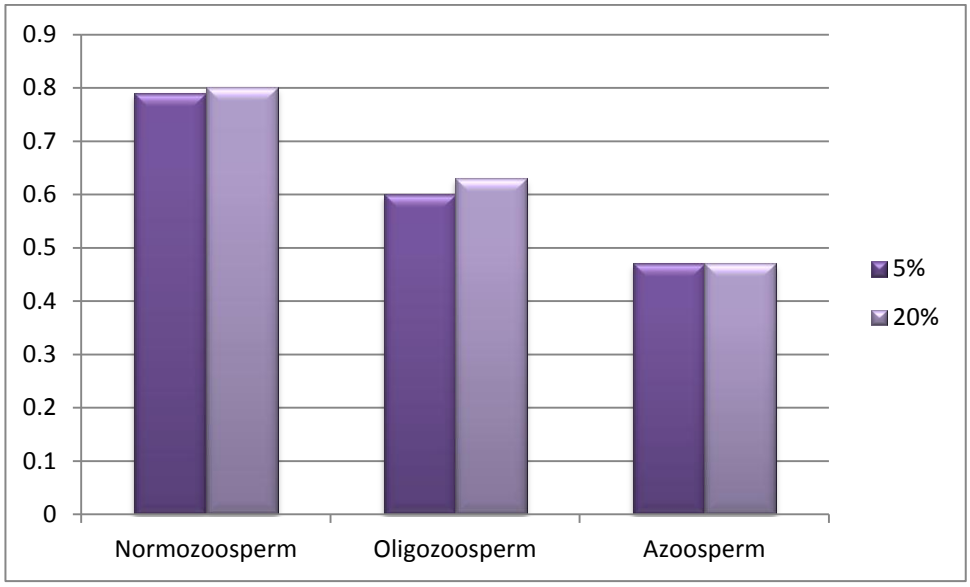
SOD enzim aktivitesini belirtmek amacıyla, Geller ve Wing (1984) tarafından geliştirilmiş metod kullanılmıştır. Bu metotta, 0.3 mM ksantin, 12,5 mM NBT ve ksantin oksidaz içeren ksantin- ksantin oksidaz sisteminden oluşan süperoksit radikalleri SOD enzim sisteminde kullanılmadığı takdirde ortamda bulunan NBT bileşiğinin redüksiyonuna ve dolayısıyla ortamdaki renk değişimine neden olmuştur. Ortamdaki renk değişimi spektrofotometrik olarak 550 nm'de ortamda bulunan redüklenmiş NBT miktarına göre ölçülmüştür.

Çizelge 4.5 Sperm örneklerinin SOD miktarları

	5%	20%
Normozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	0,79 ± 0,12 0,81 (0,6-0,96)	0,80 ± 0,16 0,82 (0,99-0,55)
Oligozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	0,6 ± 0,07 0,57 (0,69-0,54)	0,63±0,04 0,64 (0,67-0,58)
Azoosperm	0,47	0,47

SOD düzeyleri (%5); normozoospermik grupta ortalama 0,79 (±0,12) U/mL iken, oligozoospermik grupta 0,6 (±0,07) U/mL ve azoospermik grupta 0,47 U/mL olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında farklılık vardı ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

SOD düzeyleri (%20); normozoospermik grupta ortalama 0,8 (±0,16) U/mL iken, oligozoospermik grupta 0,63 (±0,04) U/ mL ve azoospermik grupta 0,47 U/mL olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında farklılık vardı ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.



Şekil 4.6 Sperm örneklerinin SOD miktarları

4.6 Semen Örneklerinin Glutatyon Peroksidaz (GPx) Enzimi Üzerinde Olan Etkileri

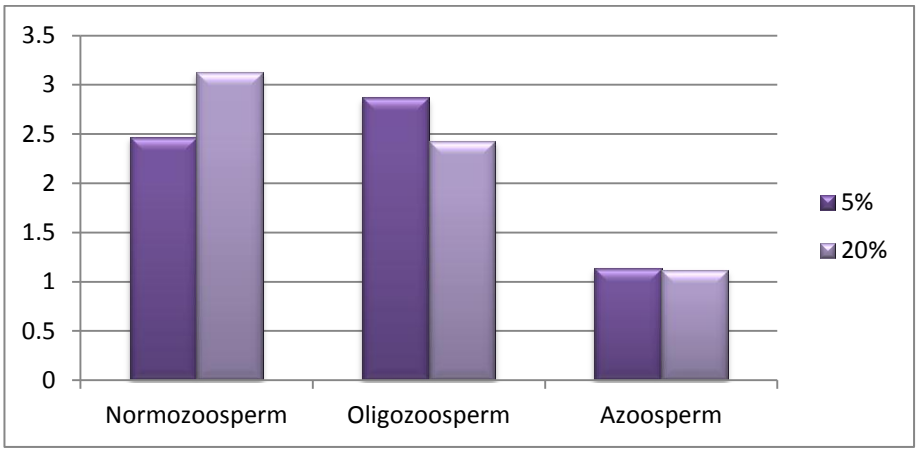
GPx enzim aktivite tayini, glutatyon redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta GPx etkisiyle glutatyon ve hidrojen peroksitin, suya ve yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşü sonrasında açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR'ın NADPH molekülünün NADP'ye oksidasyonu 340 nm'de takibe alınmıştır.

Çizelge 4.6 Sperm örneklerinin GPx miktarları

	5%	20%
Normozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	2,47 ± 0,55 2,49 (1,60-3,10)	3,13 ± 0,41 3,05 (2,57-3,61)
Oligozoosperm Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	2,87 ± 0,42 2,65 (2,61-3,37)	2,43 ± 0,53 2,17 (2,08-3,05)
Azoosperm	1,14	1,12

GPx düzeyleri (%5); normozoospermik grupta ortalama 2.47 (±0,55) IU/mL iken, oligozoospermik grupta 2,87 (±0,42) IU/ mL ve azoospermik grupta 1,14 IU/mL olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında farklılık vardı ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

GPx düzeyleri (%20); normozoospermik grupta ortalama 3,13 (±0,41) U/mL iken, oligozoospermik grupta 2,43 (±0,53) U/ mL ve azoospermik grupta 1,12 U/mL olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında farklılık vardı ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.



Şekil 4.7 Sperm örneklerinin GPx miktarları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Erkek üreme sisteminde reaktif oksijen türlerinin üretimi yüksek seviyede toksik etkilerinden dolayı sperm kalitesini ve yapısını etkiler (Aitken 1997). Reaktif oksijen türlerinin ve reaksiyon mekanizmalarının bilinmesi kontrol altına alınabilmeleri açısından oldukça önemlidir.

Üremeye yardımcı tedaviler sırasında, erkekten alınan semen örneği çeşitli işlemlerden geçirilmeden önce likefaksiyon denilen bir bekleme süresini içerir ve atmosferik oksijen şartlarında yapılır. Likefaksiyon süresi boyunca sperm, atmosferik oksijene maruz kalır. Semen örneğinin düşük oksijen seviyesi sağlayan ortamda bekletilmesi oksijen varlığına bağlı olarak ortaya çıkan hasarları ortadan kaldırabilir ve infertilite tedavilerinde iyileşmeye neden olabilir.

Bu fikirden yola çıkarak, çalışmamızda aynı hastadan alınan sperm örneği hem düşük oksijen seviyesine hem de atmosferik oksijen seviyesine maruz bırakılarak oksidatif stres yanıtlarını, antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu ölçümleriyle değerlendirdik. Çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel anlamda bir farklılık gözlenmedi. Farklı oksijen seviyelerinde inkübasyonun seminal oksidatif stres sonuçlarına bir etkisi olmadığını gösterdi. Bu konuya katkı sağlayabilecek literatür bilgisine de rastlamadık. Konuyla ilgili daha ileri düzey çalışmaların erkekte infertilite değerlendirilmesi için yeni bir bakış açısı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda semen örneklerinin süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ile katalaz enzimlerinin aktiviteleri belirlendi ve lipid peroksidasyon ölçümleri yapıldı.

Hsieh ve ark. nın yaptığı çalışmalar SOD aktivitesi ile semen kalitesi arasında bir bağlantı olmadığını göstermiştir. Shiva ve ark. yaptığı çalışmada ise SOD aktivitesi azoospermik ve oligospermik grupta normozoospermik gruba göre daha düşük bulunmuştur. Mahanta ve ark., seminal plazmadaki SOD aktivitesinin infertil grupta fertil gruba göre daha düşük olduğunu belirtmiştir. Tkaczuk-Wlack ve ark. nın

çalışmasında ise SOD aktivitesinin oligozoospermik grupta kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Hsieh 2006, Shiva 2011).

Bu çalışmada SOD aktivitesi oligozoospermik ve azoospermik gruplarda normozoospermik gruba göre daha düşük bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu düşük seviye çok sayıdaki spermatozoanın ürettiği oksidatif metabolitler olabilir ve sperm konsantrasyonu azaldıkça ortaya çıkan ROT'un da göreceli olarak azalması sonucuna bağlanabilir.

Hsieh, çalışmasında GPx aktiviteleri yönünden fertil ve infertil gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmiştir. Mahanta ve ark. ise seminal plazmadaki GPx aktivitesini infertil grupta fertil gruba göre daha düşük bulmuştur. Giannattasio ve ark. nın çalışmaları, sağlıklı erkeklerin seminal GPx aktivitesinin infertil erkeklere göre 10 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir (Hsieh 2006).
Çalışmamızda, GPx aktivite düzeylerinde normozoospermik, oligozoospermik ve azoospermik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Shiva ve ark.nın yaptığı çalışmada CAT seviyesi normozoospermik, oligozoospermik ve azoospermik gruplar arasında anlamlı bir faklılık göstermemiştir. Khsrowbeygi ve ark. katalaz aktivitesinin sperm motilitesi ve morfolojisi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Khsrowbeygi 2006, Shiva 2011).
Çalışmamızda %20 oksijen seviyesinde bekletilen örneklerde katalaz aktivitesinin, normozoospermik grupta oligozoospermik gruba göre istatistiksel anlamda daha yüksek olduğunu tespit ettik.

Irvine 2000'de yaptığı çalışmasında ise fertil ve infertillerde antioksidan düzeylerinin gruplar arasında farklılık göstermediğini belirtmiştir (Irvine 2000).

Mahanta ve ark., lipid peroksidasyon seviyesini infertil grupta fertil gruba göre daha yüksek seviyede belirlemişlerdir. Shiva ve ark.nın çalışmasında da seminal MDA seviyesi azoospermik ve oligospermik grupta normozoospermik grupla

karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Lipid peroksidasyonu sperm sayısı, motilite ve morfoloji ile negatif korelasyon göstermiştir. Sperm sayısının artması MDA ile negatif korelasyon göstermiş. Khosrowbeygi ve ark. da infertil erkekler de MDA seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçları da bu bilgileri destekler niteliktedir. Gruplar arasındaki lipid peroksidasyon düzeylerinin farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Lipid peroksidasyonu, oligozoospermik ve azoospermik grupta normozoospermik gruba göre daha yüksektir. MDA seviyesi ile ilgili elde ettğimiz bulgular, fertil ve infertil gruplardaki seminal reaktif oksijen türleri düzeyinin farklı olduğu görüşünü desteklemektedir.

İnfertilite tanısı alan çiftlerin büyük kısmında semen parametrelerinde bozukluklar saptanmakta ancak nedenini ortaya koymak her zaman mümkün olmamaktadır. Tedavilerin başarısını arttırabilmek için çalışmalar sürdürülmektedir. Üzerinde çalışılan konulardan birisi de reaktif oksijen türleri ile semen kalitesi arasındaki ilişkidir. Üremeye yardımcı tedaviler ile ilgili çalışmalarda reaktif oksijen türleri ve in vitro fertilizasyon oranları arasında negatif bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir. Ivvasaki vd. infertilite ve artan ROT üretimi arasında negatif bir korelasyonun olduğunu, semendeki artmış ROT seviyelerinin kötü semen kalitesi ile doğru orantılı olduğunu bildirmişlerdir (Ivvasaki 1992). Reaktif oksijen seviyelerinin infertillerde fertillere kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Moein 2007).

Sonuç olarak, reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki dengesizliğin spermde oksidatif strese dolayısıyla da infertiliteye yol açacağı bilinmektedir. Biz çalışmamızda IVF tedavilerine giren ve ICSI ile fertilizasyon hedeflenen hastalarda semenin likefaksiyon şartlarının örnekteki oksidatif stresi artırıp artırmadığını inceledik. Buna göre ÜYTE embriyoloji laboratuvarlarında semen örneklerinin alınmasını takiben, likefaksiyonunun atmosferik oksijen basıncında gerçekleştirilmesinin, bir dezavantaja yol açmadığı ve düşük oksijen seviyesinin ROT oluşumunu engellemede anlamlı katkısı olmadığı tespit edilmiştir. Semendeki spermatozoon konsantrasyonunun bu tercihte bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Erkek infertilitesi ile ilgili çalışmalarda oksidatif stres

parametrelerinin tanımlanması ve elimine edilmesi sperm anormalliklerinin teşhis ve tedavisinde gelişmelere yol açacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Anonymous. Web Sitesi : http://www.biology.lifeeasy.org/ Erişim Tarihi: 10.08.2015

Anonymous. Web Sitesi : http://www.slideshare.net/ Erişim Tarihi: 08.09.2015

Anonymous. Web Sitesi : www.andrologyaustralia.org/ Erişim Tarihi: 15.08.2015

Anonymous. Web Sitesi : http://knarf.english.upenn.edu Erişim Tarihi: 17.09.2015

Anonymous. Web: https://en.wikipedia.org/wiki/Axoneme Erişim Tarihi: 21.11.2015

Anonymous. Web Sitesi : www.sağlıkplatformu.com Erişim Tarihi: 23.12.201

Anonymous. 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. WHO (World Health Organization) Fifth Edition.

Aebi, H. 1984. "Catalase in vitro." Methods Enzymology 105; 121-6.

Altan, N., Sepici Dinçel, A. ve Koca, C. 2006. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Dergisi Turkish Journal of Biochemistry, 31(2); 51-56.

Agarwal, A., Ikemoto, I. and Loughlin, K.R. 1994. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. J Urol, 152:107-110.

Agarwal, A., Ramadan, A., Saleh, M.D., Mohamed, A. and Bedaiwy, M.D. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertility and sterility. No:4.

Agarwal, A. 2005. Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation.

Aitken, R.J. and Fisher, H.M. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. Bioassays, 16;259-262.

Aitken, R.J., Fisher, H.M., Fulton, N., Gomez, E., Knox, W., Lewis, B. Irvine, S. 1997. 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; 468-82.

Aitken, R.J., Krausz, C. and Buckingham, D. 1994. 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. MolReprod Dev. 39:268-79.

Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. 1997. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by humanspermatozoa. J. reprod fertil, 84; 459-69.

Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. and Storey, B.T. 1997. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa.Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. Journal of Andrology, 8(5):338-48.

Atig, F., Raffa, M., Ali, B.H., Abdelhamid, K., Saad, A. and Ajina, M. 2012. Altered antioxida status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma on Tunisian infertile man. İnternational Journal of Biological Sciences. 8(1); 139-149.

Bras, M., Lens, J.W. and Piederiet M.H. 1996. İvf lab-Laboratory aspects of in vitro fertilization. Organon pres.

Chelikani, P., Carpena, X., Fita, I. and Loewen, P.C. 2004. An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. J Biol Chem, 278; 31290-31296.

Cheeseman K.H. and Slater TF. 1993. An ıntroduction to free radical biochemistry, Free radicals in Medicine 81- 493.

de Lamirande, E., Gagnon, C. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J Androl, 13;379-386.

Delilbaşı, L. 2008. İn vitro fertilizasyon laboratuvar yöntemleri. Güneş Tıp Kitapevleri.

Drevet, J.R. 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. Molecular Cell Endocrinology.

Duru, K.N., Morshedi, M. and Oehninger, S. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Fertil Steril;74:1200-7.

Elstern, E.F, 1991. Oxygen radicals-biochemical basis for their efficacy. Klinische Wochenschrift, 69; 949-956.

Fridowich, I. 1983. Superoxide radical: An endogenous toxicant. Annual Review of pharmacology and Toxicology. 23; 239-257.

Garrido, N., Meseguer, M., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi J. 2004. Pro-oxidative And anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. Asian J Androl. 6:59–65.

Gartner, L.P. and Hiatt J.L, 1997. Color Textbook of Histology. 3rd Edition.

Ghafourifar, P. and Cadenas, E. 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends Pharmaceutical Science, 26; 190-195.

Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, MC., Sharma, R.K., Alvarez, J.G., Thomas, A.J. Jr. and Agarwal, A. 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsets of Human spermatozoa at different stages of maturation.Hum Reprod.

Grunewald, S., Paasch, U., Sais, T.M., Sharma, R.K., Glander, H.J. and Agarwal, A. 2005. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. Fertil Steril, 83; 1106-12.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 2001. Free radicals in biology and medicine. (3 rd ed.) Oxford Science Publications, 22-24.

Kavas, G.Ö. 1994. Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. The Journal of the faculty of medicine. 47; 579-592.

Khan, M.A., Tania, M., Zhang, D. and Chen, H. 2010. Antioxidant enzymes and cancer. Chin J Cancer Res, 22(2); 87-92.

Khosrowbeygi, A. and Zarghami, N. 2006. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. 7:6.

Kierszenbaum, L.A. 2002. Histoloji ve hücre biyolojisi.

Kodama, H., Yamaguchi, R., Fukuda, J., Kasai, H. and Tanaka, T. 1997. Increased. Fertil oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients Steril, 68: 519-24.

Lenzi, A., Lombardo, F., Gandini, L., Alfano, P. and Dondero, F. 1993. Computer assisted sperm motility analysis at the moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism. Journal of Endocrinological Investigation, 16; 683-686.

Lewis, S.E., Boyle, P.M., McKinney, K.A., Young, I.S. and Thompson, W. 1995. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertil steril, 64(4);868-70.

Lim, K.S., Jeyaseelan. K., Whiteman, M., Jenner, A. and Halliwell, B. 2005. Oxidative damage mitochondrial DNA is not extensive. Ann N Y Acad Sci. 1042; 210-20.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193; 265-275.

Masella, R., Benedetto, R.D., Varı, R., Filesi, C. and Giovannini, C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems:

involvement glutathione and glutathione-related enzymes. Journal of Nutritional Biochemistry, 16; 577-586.

Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and De Castro, I.N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry, 32; 595-603.

McCord, J.M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am. J. Med. 108(8); 653-9.

Monga, M., Alexandrescu, B., Katz, E.S., Stein, M. and Ganiats, T. 2004. Impact of infertility on quality life, marital adjustment, and sexual function. Urology. 63; 126-30.

Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. and Noguchi, N. 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochemical and Biophysical Research Communications, 338; 668-676.

Ohkawa, S., Fukatsu, K., Miki, S., Hashimoto, T., Sakamoto, J., Doi, T., Nagai, Y. and Aono, T. 1979. 5-aminocoumarans: dual inhibitors of lipid peroxidation and dopamine release with protective effects against central nervous system trauma and ischemia. J Med Chem, 40; 559-573.

Perry, J.J.P., Shin, D.S., Getzoff, E.D. and Tainer, J.A. 2010. The structural Ross, H.M., biochemistry of the superoxide dismutases. Biochimica et Biophysica Acta, 1804; 245-262.

Pawlina, W. 2006. Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology. Sixth edition, chapter 22; 784-816.

Rrumbullaku, L. Semen Analysis, (Semen_analysis_rrumbullaku.htm).

Ruestow, E.G. 1982. Leewenhoek's perception of the spermatozoa. Journal of the history of Biology, Volume 16, issue 2; 185-224.

Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G. and Bianchi, U. 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev reprod, 4; 31-37.

Setchell, B.P. and Maddocks S. 1994. The male reproductive system.

Sharma, P., Gogoi, A., Chaudhury P.N.B., Roy. S. and Bhattacharryya I.K. 2012. Association of oxidative stress biomarkers and antioxidant enzymatic activity in male infertility of north-east India. 62(5); 546-550.

Shiva, M., Gautam, K.A., Verma, Y., Shivgotra V., Doshi H. and Kumar S. 2011. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. Clinical Biochemistry, 44; 319-324.

Sikka, S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Department of urology, Tulane University school of medicine, New Orleans, Louisiana, USA. 78-86.

Singh, N.P., Muller, C. H. and Berger, R.E. 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertil Steril. 80(6); 1420-30.

Sinha, H.A.P. and Swerdloff R.S. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Rev reprod, 4; 38-47.

Steinman, H.M. 1982. Superoxide dismutase: Protein chemistry relationship. In LW Oberley, Superoxide dismutase, Vol 1, CRC Press.

Sukcharoen, N., Keith, J., Irvine, D.S. and Aitken, R.J. 1995. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. Fertil steril. 63; 1293-300.

Thomas, J., Fishel S.B., Hall, J.A., Green, S., Newton, T.A. and Thornton, S.J. 1997. Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. Hum reprod, 12; 2418-2421.

Wolff, H. 1995. The biologic significance of white blood cells in semen. Fertil steril. 63; 1143-57.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D, Mazura, M. and Josh Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39; 44–84.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ezgi GÜNEŞ

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 30.05.1987

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Yahya Kemal Beyatlı Lisesi 2005

Lisans Öğrenimi : Celal Bayar Üniversitesi Biyoloji Bölümü 2011

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Eylül 2011-Ocak 2106)